CSA836241
Organizacion y
Digi... CSA Ltda

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

PCT

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

1/2

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCIÓN

21. **EXPEDIENTE No.** 10-81516

54. **TÍTULO** ANTICUERPOS CONTRA EL VIRUS DE INFLUENZA Y METODOS DE USO DE LOS MISMOS

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL**

71. **SOLICITANTE** DANNA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC., Y BURNHAM INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH

DOMICILIO BOSTON, MASSACHUSETTS, y LA JOLLA, CALIFORNIA, U.S.A Respetectivamente

74. **APODERADO** LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C. 35.456.344 de Usaquén

22. **BOGOTÁ, D.C.,**

(FORMA P-10)

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-081516- -00000-0000
Fecha: 2010-07-06 17:36:45 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 300

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

1 SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención. ☐ Patente de Modelo de Utilidad.
☒ Capítulo I. ☐ Capítulo II.

2 SOLICITANTE (71)

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

Domicilio: Boston,
Massachusetts,
Estados Unidos de América

y

La Jolla,
California,
Estados Unidos de América

respectivamente.

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____
Número _____

3 REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 36 11
Fax: 211 86 50
E-mail: clientes@cavelier.com
Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____
Número 35.456.344 T.P 23.555

4 INVENTOR (ES) (72)

1. Wayne A. MARASCO
43 Rice Street,
Wellesley,
Massachusetts 02481,
Estados Unidos de América

2. Jianhua SUI
1575 Tremont Street, #212,
Boston,
Massachusetts 02120,
Estados Unidos de América

3. Robert C. LIDDINGTON
Burnham Institute For Medical Research,
10901 North Torrey Pines Road,
La Jolla,
California 92037,
Estados Unidos de América

(5) **PCT (86)**
Solicitud Internacional No. PCT/US2008/085876 Fecha: 8 de diciembre de 2008
Publicación Internacional No. WO 2009/079259 A9 Fecha: 25 de junio de 2009

(6) **Título (54)**
ANTICUERPOS CONTRA EL VIRUS DE INFLUENZA Y MÉTODOS DE USO DE LOS MISMOS (Folio 304)

(7) **Clasificación Internacional (51)** C07K 016/010

(8) **Prioridad** SI☒ NO☐

(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
US	6 de diciembre de 2007	61/005,725
US	25 de agosto de 2008	60/091,599

(9)
Comprobante de pago No.: 10-14,398 **Fecha:** 22 de febrero de 2010
Comprobante de pago No.: 10-34,533 **Fecha:** 4 de mayo de 2010
Comprobante de pago No.: 10-48,304 **Fecha:** 15 de junio de 2010
Comprobante de pago No.: 10-52,230 **Fecha:** 28 de junio de 2010
Comprobante de pago No.: 10-52,231 **Fecha:** 28 de junio de 2010

10

Anexos:

- [x] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por $ 554.000.oo.
- [x] Comprobante de pago por 65 reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por $1.690.000.oo.
- [ ] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- [ ] Poderes, si fuere el caso.
- [ ] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- [ ] Declaraciones.
- [x] Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [x] Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [ ] Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- [ ] Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- [ ] De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- [ ] De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- [ ] De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- [x] Arte final 12x12
- [ ] De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- [x] Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA

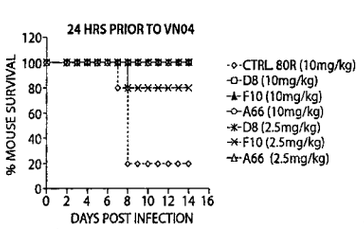


Fig. 7A

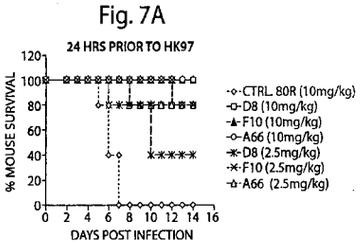


Fig. 7B

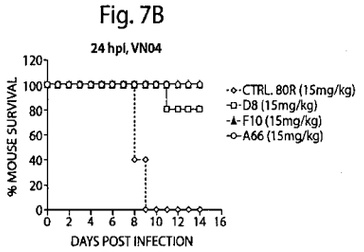


Fig. 7C

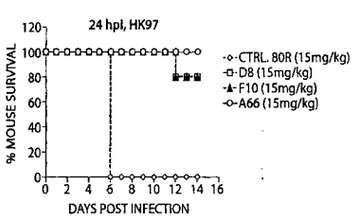


Fig. 7D

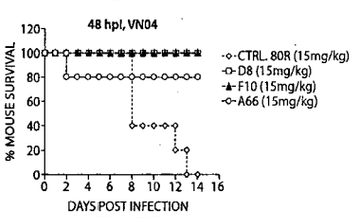


Fig. 7E

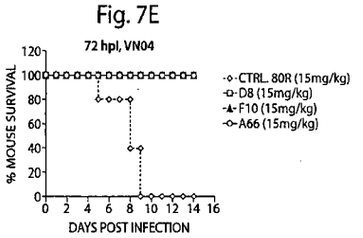


Fig. 7F

12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

FIRMA : Luz Clemencia de Paez

C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P. 23.555

JGG

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2009/079259 A9

   Descripción:

   Páginas 71 en el idioma original

   Páginas 117 en español

   Reivindicaciones: Número (s) 75

   Figuras: Número (s) 13

2. ☒ **Forma PCT/ISA/210.** Informe de Búsqueda Internacional.

3. ☒ Listado de Secuencias.

4. ☒ Extracto de publicación.

NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA FASE INTERNACIONAL

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

CORRECTED VERSION

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
25 June 2009 (25.06.2009)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2009/079259 A9

(51) International Patent Classification:
C07K 16/10 (2006.01) *G01N 33/50* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2008/085876

(22) International Filing Date:
8 December 2008 (08.12.2008)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/005,725 6 December 2007 (06.12.2007) US
61/091,599 25 August 2008 (25.08.2008) US

(63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier application:
US 61/005,725 (CON)
Filed on 6 December 2007 (06.12.2007)

(71) Applicants *(for all designated States except US)*: **DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.** [US/US]; 44 Binney Street, Boston, MA 02115 (US). **BURNHAM INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH** [US/US]; 10901 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **MARASCO, Wayne, A.** [US/US]; 43 Rice Street, Wellesley, MA 02481 (US). **SUI, Jianhua** [CN/US]; 1575 Tremont Street, #212, Boston, MA 02120 (US). **LIDDINGTON, Robert, C.** [US/US]; Burnham Institute For Medical Research, 10901 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037 (US).

(74) Agents: **ELRIFI, Ivor, R.** et al.; Mintz, Levin, Cohn, Ferris, Glovsky And Popeo PC, One Financial Center, Boston, MA 02111 (US).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,

[Continued on next page]

(54) Title: ANTIBODIES AGAINST INFLUENZA VIRUS AND METHODS OF USE THEREOF

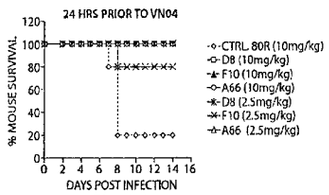


Fig. 7A

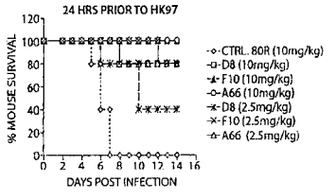


Fig. 7B

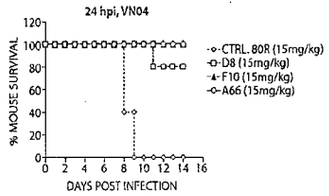


Fig. 7C

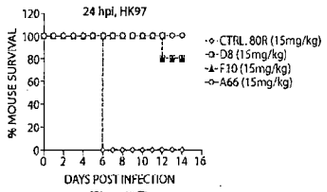


Fig. 7D

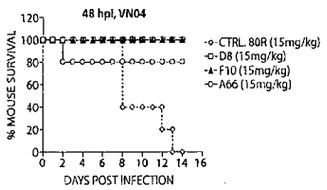


Fig. 7E

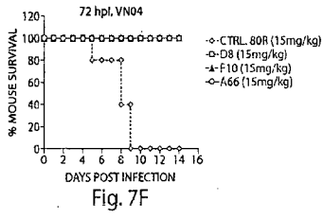


Fig. 7F

(57) Abstract: The invention provides human scFv antibodies and monoclonal antibodies that neutralize influenza virus. Also provided are methods of treating and/or preventing a influenza related disease or disorder such bird flu The invention also provides methods of vaccinating a patient against influenza. Also provided are methods of diagnosing influenza- related diseases or disorders and methods of detecting the presence of a influenza in a sample.

WO 2009/079259 A9

HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) **Designated States** *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— *without international search report and to be republished upon receipt of that report (Rule 48.2(g))*

(48) **Date of publication of this corrected version**:
1 October 2009

(15) **Information about Correction**:
see Notice of 1 October 2009

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
25 June 2009 (25.06.2009)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2009/079259 A3

(51) International Patent Classification:
C07K 16/10 (2006.01) *G01N 33/50* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2008/085876

(22) International Filing Date:
8 December 2008 (08.12.2008)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/005,725 6 December 2007 (06.12.2007) US
61/091,599 25 August 2008 (25.08.2008) US

(63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier application:
US 61/005,725 (CON)
Filed on 6 December 2007 (06.12.2007)

(71) Applicants *(for all designated States except US)*: **DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.** [US/US]; 44 Binney Street, Boston, MA 02115 (US). **BURNHAM INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH** [US/US]; 10901 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **MARASCO, Wayne, A.** [US/US]; 43 Rice Street, Wellesley, MA 02481 (US). **SUI, Jianhua** [CN/US]; 1575 Tremont Street, #212, Boston, MA 02120 (US). **LIDDINGTON, Robert, C.** [US/US]; Burnham Institute For Medical Research, 10901 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037 (US).

(74) Agents: **ELRIFI, Ivor, R.** et al.; Mintz, Levin, Cohn, Ferris, Glovsky And Popeo PC, One Financial Center, Boston, MA 02111 (US).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG,

[Continued on next page]

(54) Title: ANTIBODIES AGAINST INFLUENZA VIRUS AND METHODS OF USE THEREOF

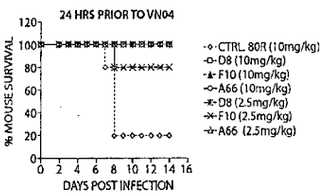


Fig. 7A

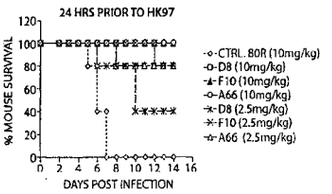


Fig. 7B

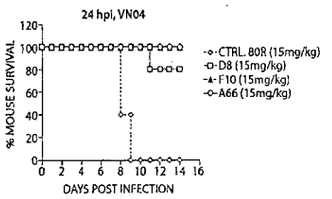


Fig. 7C

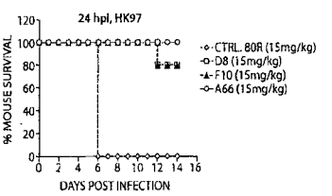


Fig. 7D

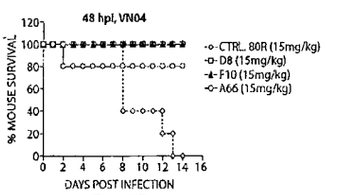


Fig. 7E

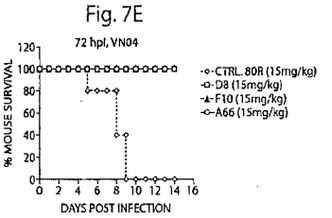


Fig. 7F

(57) Abstract: The invention provides human scFv antibodies and monoclonal antibodies that neutralize influenza virus. The antibodies recognize an epitope in the stem region of the hemagglutinin (HA) protein. Also provided are methods of treating and/or preventing a influenza related disease or disorder such bird flu The invention also provides methods of vaccinating a patient against influenza. Also provided are methods of diagnosing influenza-related diseases or disorders and methods of detecting the presence of a influenza in a sample.

WO 2009/079259 A3

SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) **Designated States** *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— *with international search report (Art. 21(3))*

(88) **Date of publication of the international search report**:
18 February 2010

(15) **Information about Correction**:

Previous Correction:
see Notice of 1 October 2009

Antibodies Against Influenza Virus and Methods of Use Thereof

RELATED APPLICATIONS

This application claims the benefit of USSN 61/005,725 filed December 6, 2007 and USSN 61/091,599 filed August 25, 2008 the contents of which are incorporated herein by reference in their entireties.

GRANT SUPPORT

This invention was made with United States Government support under National Institutes of Health Grants U01 AI074518-01. The United States Government has certain rights in the invention.

FIELD OF THE INVENTION

This invention relates generally to anti-viral antibodies as well as to methods for use thereof.

BACKGROUND

An influenza pandemic represents one of the greatest acute infectious threats to human health. The 1918-1919 influenza pandemic caused an estimated 500,000 deaths in the United States, making it the most fatal event in all of US history. The spread of highly pathogenic avian influenza (HPAI) H5N1 influenza across Asia and now to the middle east and northern Africa creates a substantial risk for a new pandemic to arise.

Natural variation as well as escape mutants suggests that continued evolution of the virus should impact the decision on which strain(s) should be used for passive and active immunization. Although a number of important epitope mapping and neutralization escape studies have been reported new neutralizing antibodies and related structural studies are needed to develop immunization strategies against HPAI H5N1. The challenges to developing a protective vaccine against HPAI H5N1 are formidable and new approaches are needed to prevent and treat human infection by an ever changing enemy. There is a need to rapidly develop therapeutic strategies to elicit protective hosts immunity, both passively and actively.

Tremendous advances in the field of human antibody (Ab) engineering have been made. Monoclonal antibody (Mab) based immunotherapies are now becoming standard of care in an increasing number of human diseases including RSV. The shift toward *de novo* human Mab isolation and their clinical use is in part due to new antibody display and other library screening techniques that are now be exploited to build human antibodies with high affinity and specificity. Human Mab immunotherapies can provide an increasingly important role in clinical management of human diseases.

SUMMARY OF THE INVENTION

The invention is based upon the discovery of monoclonal antibodies which neutralize the influenza virus, e.g. influenza A virus. The influenza A virus is a Group I influenza A virus such as a H1 cluster influenza virus, The H1 cluster influenza virus is an H1a cluster or an H1b cluster. The monoclonal antibody is fully human. In various aspects, the monoclonal antibody is a bivalent antibody, a monovalent antibody, a single chain antibody or fragment thereof. Specifically, such monoclonal bind to an epitope on the stem region of the hemagglutinin protein (HA), such as HA1 or HA2 polypeptide. The epitope is non-linear.

Optionally, the epitope comprises both the HA-1 and HA-2. The epitope is non-linear. In some embodiments the epitope comprises the amino acid position 18, 38, 40, 291 of the HA1 polypeptide and the amino acid at position 18, 19, 20, 21, 38, 41, 42, 45, 49, 52, 53 and 56 of the HA2 polypeptide.

Exemplary monoclonal antibodies include monoclonal antibody D7, D8, F10, G17, H40, A66, D80, E88, E90, or H98 or an antibody that binds to the same epitope as D7, D8, F10, G17, H40, A66, D80, E88, E90, or H98.

The monoclonal antibodies of the invention can have the binding affinity of monoclonal antibody D7, D8, F10, G17, H40, A66, D80, E88, E90, or H98. Alternatively, the binding affinity can range about 1pM to about 200 mM. The monoclonal antibodies of the invention function to inhibit viral and cell membrane fusion.

The monoclonal antibody has a heavy chain variable amino acid sequence containing SEQ ID NOS: 2, 6, 12, 18, 24, 28, 32, and 36 and/or a light chain variable amino acid sequence containing SEQ ID NOS: 4, 8, 14, 16, 20, 22, 26, 30, 34, and 38.

The monoclonal antibody, has a heavy chain variable nucleic acid sequence containing SEQ ID NOS: 1, 5, 13, 15, 21, 23, 29, 33, 37, and 40 and or a light chain variable nucleic acid sequence containing SEQ ID NOS: 3, 9, 11, 17, 19, 25, 27, 31, 35, 39, and 42

Also provided by the invention is an monoclonal anti-influenza hemagglutinin protein antibody or fragment thereof, where the antibody has a V_H CDR1 region having the amino acid sequence SYAFS, TNAFS, AYAFT, SFAIS, SYAIS, GYYIH, MTAFT, or DNAIS; a V_H CDR2 region having the amino acid sequence GIIPMFGTPNYAQKFQG, GVIPLFRTASYAQNVQG, GIIGMFGTANYAQKFQG, GISPMFGTPNYAQKFQG, GIIGVFGVPKYAQKFQG, WINPMTGGTNYAQKFQV, GISPIFRTPKYAQKFQG, or GIIPIFGKPNYAQKFQG; a V_H CDR3 region having the amino acid sequence SSGYYYG GGFDV, SSGYHFGRSHFDS, GLYYYESSLDY, SPSYICSGGTCVFDH, EPGYYVGKNGFDV, GASVLRYFDWQPEALDI, TLSSYQPNNDAFAI, or DSDAYYYGSGGMDV; V_L CDR1 region having amino acid sequence TGSSSNIGNYVA, TGSSSNIAANYVQ, TGTSSDVGGYNSVS, TGNSNNVGNQGAA, TGDSNNVGHQGTA, GGNNIGGYSVH, RASQSVSSYLA, RASQSLSSKYLA, TGSSSNIGNYVA, SGSSSNIGSNTVN, RASQSISSYLN, or TLSSGHSNYIIA; a V_L CDR2 region having the amino acid sequence SNSDRPS, EDDRRPS, EVTKRPS, RNNDRPS, RNGNRPS, DDKDRPS, DASNRAT, GASSRAT, SNNQRPS, AASSLQR, SNEQRPS, or VNSDGSHTKGD and/or a V_L CDR3 region having the amino acid sequence QSYDSLSAYV, QSYDTNNHAV, CSYAGHSAYV, STWDSSLSAVV, SVWDSSLSAWV, QVWDSGNDRPL, QQYGSSPQV, QQYDGVPRT, QSYDSRLSASL, QQYDSSPYT, ASWDDNLSGWV, or ETWDTKIHV.

In a further aspect, the invention provides An isolated an monoclonal anti-influenza hemagglutinin protein antibody or fragment thereof where the antibody has a VH amino acid sequence encoded by the VH germline gene IGHV1-69*01 and the the amino acid at position: a) 27 is a valine; b) 28 is threonine; c) 30 is serine; d) 31 is serine; e) 54 is methionine; f) 55 is phenylalanine; g) 58 is threonine; h) 100 is proloine; i) 101 is serine; j) 102 is tyrosine; k)103 is isoleucine and 105 is serine.

In another aspect, the invention provides a method of preventing or treating a disease or disorder caused by an influenza virus by administering to a person at risk of suffering from said disease or disorder, a therapeutically effective amount of a monoclonal antibody or scFV antibody described herein. The monoclonal antibody or scFV antibody is administered at a dose sufficient to neutralize the influenza virus. In embodiments of the invention, the method also includes administering an anti-viral drug, a viral entry inhibitor or a viral attachment inhibitor. The anti-viral drug is neuraminidase inhibitor such as zanamivir, or oseltamivir phosphate, a HA inhibitor, a sialic acid inhibitor or an M2 ion channel such as amantadine or rimantadine. The antibody is administered prior t or after exposure to an influenza virus

In another aspect, the invention provides a method of detecting the presence of a an influenza virus in a sample by contacting the sample with a monoclonal antibody as described herein, and detecting the presence or absence of an antibody-antigen complex, thereby detecting the presence of a influenza virus in a sample. The test sample is generally obtained from blood, hair, cheek scraping or swab, saliva, biopsy, urine, feces, sputum, nasal aspiration, or semen.

The invention is further based upon the discovery of a protocol for generating broadly neutralizing human antibodies that target a highly conserved epitope in the stem region of HA. By using the trimeric H5 ectodomain expressed in baculovirus which produces shorter N-glycans and uncharged mannoses absorbed on a plastic surface, allowed for the dominant presentation of the stem epitope while masking the normally immunodominat globular head.

Accordingly, also included in the invention is a method of producing an isolated antibody that specifically binds a pathogenic enveloped virus by exposing a single chain or Fab expression library to a membrane fusion protein of the virus, identifying an antibody in the library that specifically binds said protein; and isolating the antibody from the library. Preferably, the fusion protein is immobilized on a solid surface, e.g. plastic. In various aspects the fusion protein has modified glycosylations compared to a wild type fusion protein. For example, the fusion is produced in a non-mammalian cell, such as an insect cell. The fusion protein is for example a trimeric hemagglutinin (HA) protein

The invention further provides a method of vaccinating a subject against pathogenic enveloped virus such as an influenza virus by administering to the subject a membrane fusion protein (e.g., a trimeric hemagglutinin (HA) protein coated) or embedded in a biologically compatible matrix. In various aspects the fusion protein has modified glycosylations compared to a wild type fusion protein.

In another aspect, the invention provides a composition comprising a monoclonal antibody as described herein and kits containing the composition in one or more containers and instructions for use.

Unless otherwise defined, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs. Although methods and materials similar or equivalent to those described herein can be used in the practice or testing of the present invention, suitable methods and materials are described below. All publications, patent applications, patents, and other references mentioned herein are incorporated by reference in their entirety. In the case of conflict, the

present specification, including definitions, will control. In addition, the materials, methods, and examples are illustrative only and are not intended to be limiting.

Other features and advantages of the invention will be apparent from the following detailed description and claims.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 A is an illustration of the structure of the A/Vietnam 1203/04 trimer. The receptor binding site and antigenic variation sites are highlighted on the monomer.

Figure 1B is an illustration showing the location of amino acid residues in the HA of H5N1 influenza viruses that are under positive selection

Figure 2 is a schematic illustration of convergent combination Immunotherapy for H5N1.

Figure 3 is an illustration showing an amino acid sequence comparison of the framework regions 1-4 (FR1-4) and the complementary-determining regions 1-3(CDR1-3) for both the VH and VL of the anti-influenza antibodies of the invention.. FR and CDR regions are defined using Kabat database. The VH and VL gene name are shown on the right (using IMGT database). Dots show sequence identity to the consensus sequence. Hyphens represent gaps.

Figure 4 shows *in vitro* neutralization of anti-H5 antibodies. (a) (Top panel) The 10 nAbs were converted to soluble scFv-Fcs (single chain fragment of variable region linked with Hinge, CH2 and CH3) and evaluated for neutralizing activity against H5-TH04-pseudotyped viruses. The percentage neutralization at 2 concentrations is shown with standard error bars. The mAb $80R^{16}$ was used as the control (Ctrl.). (Middle and bottom panels), Neutralization of wild type H5-VN04 and H5-IN05 by the 10 scFv-Fcs at three concentrations using a plaque reduction assay. Results are consistent with those obtained from a microneutralization assay (data not shown). (b) Cross subtype neutralization. nAbs D8, F10 and A66 all neutralized H5-TH04, H1-SC1918 ((A/South Carolina/1/1918 (H1N1)), H1-PR34 (A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)), H2-JP57 (A/Japan/305/57(H2N2)) and H6-NY98 (A/chicken/New York/14677-13/1998(H6N2)) pseudotyped viruses. **(c)** Microneutralization assay. Neutralization titers of F10 against wild-type H5N1, H1N1 (A/Ohio/83 ("H1-OH83")) and H2N2 (A/Ann Arbor/6/60 ('H2-AA60")) compared with a murine mAb 21G8.6 raised against H5N1 and Ctrl. 80R (1 mg/mL Ab stock solution). "<" indicates a titer of less than 20. Results represent two independent experiments.

Figure 5 shows the Neutralization mechanism. (a) Virus binding inhibition assay using full-length HA of H5-TH04-pseudotyped HIV-1 viruses. The binding of virus to cells in Ab-treated groups were compared with binding to cells in the absence of Ab (defined as 100%). None of the three nAbs (D8, F10 and A66) inhibited virus binding to cells, while a mouse anti-H5 mAb, 17A2.1.2, and ferret anti-H5N1 serum, both of which inhibit haemagglutination and presumably bind to the head, reduced binding significantly. (b) Inhibition of syncytia formation by nAbs. HeLa cells were transfected with H5-TH04-expressing plasmid. Syncytia formation induced by brief exposure to pH 5.0 buffer was completely inhibited by nAbs D8, F10 and A66, at 20 μg/ml, whereas control and an anti-HA1 mAb (2A) at the same concentration had no effect.

Figure 6 show the Structure of the H5-F10 epitope, and sequence/structural conservation. (a) Structure of the H5 trimer bound to F10 (scFv). H5 is very similar to the uncomplexed structure[21] (pairwise RMSD (Cα) = 1.0 and 0.63 Å for 2 independent trimers). HA1, HA2, the αA-helix of HA2, the "fusion peptide" (FP), and F10 (VH and VL) are colour-coded. The third F10 is hidden behind the stem. Note that VL makes no contacts with H5. (b) Surface of the central stem region. One monomer is coloured by chain; the path of FP through the epitope (red) is outlined; mutations not affecting binding are in cyan. The fusion peptide (FP and FP') is visible in two monomers. Epitope residues are labeled white (HA2) or yellow (HA1). (c) Close-up of the epitope showing the tip of F10 (red ribbon) and selected CDR side-chains. Of 1500 $Å^2$ buried surface at the interface, 43% involves hydrophobic interactions. (d) Overlay of HA subtypes: H1, H5 and H9 (Group 1) in shades of red/yellow (1RU7, 2IBX and 1JSD); H3 and H7 (Group 2) in shades of blue (1MQL and 1TI8). RMSDs for pairwise overlays are 0.56±0.11 Å (observed range, Group 1); 0.75 Å (Group 2); and 1.21±0.12 Å between groups. Consistent differences between groups include the orientation of $W21_2$, which is linked to alternate side-chain directions at 18_1 and 38_1, the burial of the larger tyrosine (Group 1) versus histidine (Group 2) at 17_1, and the packing of buried $His111_2$ (Group 1) against $W21_1$. Other epitope residues are indicated by numbered white circles. $N38_1$ is glycosylated in H3 and the H7 cluster. (e) Sequences of the 16 HA subtypes. Circles indicate calculated binding energies: strong=blue, intermediate=orange; weak=blue; unfavorable=black. Coloured highlighting indicates sequence conservation within clusters and groups. The network of inter-helical contacts that stabilize the fusogenic structure[29] are indicated below the sequences.

Figure 7 shows the prophylactic and therapeutic efficacy of anti-H5 nAbs in mice. Mice were treated with different doses of nAb either before or after lethal viral challenge.

Prophylactic efficiacy (a, b, g and h). Mice were treated with anti-H5 nAbs or control mAb 24 hour before lethal challenge by intranasally (i.n.) with 10 median lethal doses (MLD_{50}) of the H5N1 or H1N1s. (a) Intra-peritoneal (i.p.) injection of 10 mg/kg of any of the three nAbs provided complete protection of mice challenged with H5-VN04 (A/Vietnam/1203/04 (H5N1), Clade 1). A lower antibody dose (2.5 mg/kg) was also highly protective. (b) Prophylactic protection against H5-HK97 (A/HongKong/483/97 (H5N1), Clade 0) virus was observed in 80-100% of the mice treated with 10 mg/kg of any of the three nAbs. (g) Any of the three nAbs (at 10 mg/kg of single injection) provided complete protection of mice challenged with H1-WSN33 (A/WSN/1933(H1N1)) viruses. (h) D8 and F10 completely protected mice challenged with H1-PR34 (A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)) when given at 10mg/kg of single injection. A66 provided complete protection of mice when 25mg/kg of antibody was given as a single injection. Therapeutic efficacy (c-f). Mice were inoculated with H5-VN04 and injected with nAbs at 24, 48, 72 hpi (c, e and f) or with H5-HK97 at 24 hpi (d). I.p. treatment with 15 mg/kg (a therapeutically achievable dose in humans) of any of the 3 nAbs at 24h post-inoculation (hpi) protected 80-100% of mice challenged with 10-times the MLD_{50} of either H5-VN04 or H5-HK97 virus.

Figure 8 illustrates SDS-PAGE and gel filtration analysis of HA proteins. (a) Antibody 2A was obtained from a separate HA1-targeted selection against the HA1 (residues 11-325) fragment of H5-TH04 (left panel). . H5 HA (H5-VN04 strain) used for library selection is shown in the right panel, (b) H5-VN04 (H5) and scFv F10 complex. HA0 was fully cleaved into HA1 and HA2 by co-expression with furin (left panel). Complexes were formed by first mixing H5 and F10 at a molar ratio of 1:10, and then purified by gel filtration.

Figure 9 show the binding of anti-H5 scFv-Fcs to H5 or HA1 by ELISA and competition ELISA. (a) 1 μg/mL of anti-H5 scFv-Fcs followed by HRP-anti-human IgG1 were used to detect the binding of anti-H5 scFv-Fcs to HA1 (H5-TH04) or H5 (H5-VN04) coated on an ELISA plate. An antibody selected against the HA1 subunit, mAb 2A scFv-Fc, bound to both HA1 and H5. The 10 potent neutralizing scFv-Fcs bound to H5 but not HA1. (b) 10^{12} pfu of anti-H5 phage-scFvs were mixed with 5 μg/mL of anti-H5 scFv-Fcs and added to H5 (H5-VN04)-coated plates, washed, and followed by HRP-anti-M13 to detect phage-scFvs bound to H5. mAb 2A-Fc did not compete for the epitope recognized by the 10 H5-selected Abs. All H5-selected scFv-Fcs cross-competed. Of these, Ab F10 (phage-scFv) binding to the H5 trimer was the least inhibited by the other scFv-Fcs suggesting that it has the highest affinity among all Abs tested.

Figure 10 shows the kinetic and thermodynamic characterization of the binding of H5 to nAbs D8, F10 and A66-IgG1s. nAbs were captured on a CM4 chip via anti-human IgG1; trimeric H5 (H5-VN04) at various concentrations (20, 10, 5, 2.5, 2.5, 1.25, 0.625 nM) was injected over the chip surface. Binding kinetics were evaluated using a 1:1 Langmuir binding model. The recorded binding curves (with blank reference subtracted) and the calculated curves are closely superimposable. Each *ka, kd* and K_D value represents the mean and standard error of three experiments.

Figure 11 shows the phylogenetic relationships and sequence comparison among HA subtypes. Phylogenetic tree of the 16 HA subtypes of influenza A viruses based on amino-acid sequences. Four clusters of HA subtypes are shaded in different colors. The sequences used for analysis were: 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/N49), H11 (A/duck/England/56), H12 (A/duck/Alberta/60/76), H13 (A/gull/Maryland/704/77), H14 (A/mallard/Astrakhan/263/1982), H15 (A/shearwater/West Australia/2576/79) and H16 (A/black-headed gull/Sweden/2/99).

Figure 12 shows viral titers in lung, spleen and brain of mice treated with anti-H5 nAbs after H5-VN04 challenge. BALB/c mice (n=5) were treated by i.p. injection of 15 mg/kg of mAb at 24, 48 or 72 hrs after i.n. infection with 10 MLD_{50} of H5-VN04. Viral titers were determined in lung, brain, and spleen collected at 96 hpi. Data are displayed in box-and-whiskers form in which the box extends from the 25th to the 75th percentile, with a horizontal line at the median. Whiskers above and below the box indicate the extreme values. Results of Student T-test statistic analysis are noted with a single star (*) for $p<0.05$, and double stars (**) for $p<0.01$. The arrows crossing the Y axis indicate the detection limit of the titration.

Figure 13 shows FACS analysis of anti-H5 nAbs binding to all H1 Cluster HAs including H1, H2, H5, H6, H11, H13 and H16. 293T cells were transiently transfected with different HA-expressing plasmids, and mAb binding to the HA-expressing cells was analyzed by FACS. The anti-SARS mAb 80R was used as a control. 2A-Fc is an H5 HA specific antibody. Lack of binding to a Group 2 HA, H7, was also shown. Viral strain details of H11, H13 and H16 are: H11-MP74 (A/Duck/memphis/546/74 (H11N9)), H13-MD77 (A/Gull/MD/704/77 (H13N6)) and H16-DE06 (A/Shorebird/DE/172/06 (H16N3)).

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Influenza A is a negative-sense, single-stranded RNA virus, with an eight-segment genome encoding 10 proteins. It belongs to the family Orthomyxoviridae which includes the genera of influenza virus A, B and C as defined by the antigenicity of the nucleocapsid and matrix proteins. Generally, influenza A virus is associated with more severe disease in humans. Influenza A virus is further subtyped by two surface proteins, hemagglutinin (HA) which attaches the virion to the host cell for cell entry, and neuraminidase (NA) which facilitates the spread of the progeny virus by cleaving the host sialic acid attached to the progeny virus or cell surface.

There are 16 HA subtypes and 9 NA subtypes which make up all subtypes of influenza A viruses by various combinations of HA and NA. All combinations of the 16 HA and 9 NA virus subtypes are found in water fowl. Of the hundreds of strains of avian influenza A viruses, only four are known to have caused human infections: H5N1, H7N3, H7N7 and H9N2. In general, human infection with these viruses has resulted in mild symptoms and very little severe illness: there has been only one fatal case of pneumonia caused by H7N7. However, the exception is the highly pathogenic H5N1 virus, for which there is no natural immunity in humans. The infidelity of the RNA polymerase and the selective pressure of host immunity can lead to the accumulation of mutations and change in surface antigenicity of these proteins. This antigenic change is called antigenic drift. In addition, as a result of its segmented genome, shuffling of gene segments can occur if two different subtypes of influenza A virus infect the same cell. For example, if a human H3N2 virus and an avian H5N1 virus co-infect a human or other member of a mammalian species, such an event can produce a novel H5N2. This novel virus can then be efficiently transmitted from human to human because all of most of the gene segments come from the human virus. Such genetic reassortment would lead to a major antigen change, a so-called antigenic shift, which would mean that most of the global population would not have any neutralizing antibodies against the reassortant virus. Such a situation, coupled with the high mortality of influenza H5N1 pneumonia, is one of the most feared scenarios in the field of public health.

Influenza virus hemagglutinin (HA) is the most variable antigen of influenza virus, and is responsible for virus entry into cells. It is synthesized as a trimeric precursor polypeptide HA0 which is post-translationally cleaved to two polypeptides HA1 and HA2 linked by a single disulphide bond. The HA1 chain of HA is responsible for the attachment of virus to the cell surface. HA2 mediates the fusion of viral and cell membranes in endosomes,

allowing the release of the ribonucleoprotein complex into the cytoplasm. In contrast to HA1, the HA2 molecule represents a relatively conserved part of HA. A second immunogenic influenza protein is neuraminidase (NA). This tetrameric glycoprotein is responsible for releasing virions from surface sialic acid on producer cells, and may also have a role in promoting access to target cells in the airways. Although neutralizing antibodies against NA are protective in animals and man, there is a paucity of data on their mechanisms of action. A recent report on the crystal structure of N1 neuraminidase demonstrated the presence of a cavity adjacent to its active site that may be exploited to develop new anti-influenza drugs, including antibodies. This finding is particularly important in light of the reports of emergence of drug resistance to oseltamivir (Tamiflu) and zanamivir (Relenza) for H5N1 viruses.

Both the HA1 and HA2 chains of HA are immunogenic and antibodies reactive with both chains have been demonstrated after natural infection in humans. While antibodies specific to HA1 are mostly neutralizing, different mechanism of virus neutralization by HA1 specific Mabs *in vitro* have been described including blocking the receptor site on HA1, intracellular inhibition of virus-cell fusion, or simultaneous attachment inhibition and virus-cell fusion inhibition, depending on antibody concentration. Although less well studied, inhibition of cell fusion by anti-HA2 antibodies has been reported .

More than two decades ago, the HA molecule of the H3 subtype was characterized by sequencing the HA of antigenic drift variants and escape mutants, and the antigenic epitopes were mapped on the molecule's three-dimensional structure. Since then, the antigenic sites on H1, H2 and H5 of an avian pathogenic virus were mapped on the three-dimensional structures of H3. After the outbreak of H5N1 infection in humans in Hong Kong in 1997 and the isolation of H9N2 virus from human cases in 1999, the X-ray structures of both proteins were solved. However, antigenic drift of the 1997 swine isolate (A/Duck/Singapore/3/97) that was used to solve the structure, and more recently isolated highly pathogenic strains, is significant. Indeed, there are 28 minor changes and two potentially major changes between the swine isolate (A/Duck/Singapore/3/97) and the HPAI H5N1 strain (A/Vietnam1203/04).

Phylogenetic analyses of the H5 HA genes from the 2004-2005 outbreak have shown two different lineages of HA genes, termed clades 1 and 2 . HPAI H5N1 strain (A/Vietnam1203/04) is a member of clade 1. Viruses in each of these clades are distributed in non-overlapping geographic regions of Asia. The H5N1 viruses from Indochina are tightly clustered within clade 1, whereas H5N1 isolated from several surrounding countries are

distinct from clade 1 isolates, and belong in a more divergent clade 2. Clade 1 viruses were isolated from humans and birds in Vietnam, Thailand and Cambodia but only from birds in Laos and Malaysia. The clade 2 viruses were found in viruses isolated exclusively from birds in China, Indonesia, Japan, and South Korea. The most recent epidemiologic studies analyzed 82 H5N1 viruses isolated from poultry throughout Indonesia and Vietnam, as well as 11 human isolates from southern Vietnam together with sequence data available in public databases, to address questions relevant to virus introduction, endemicity and evolution[36]. Phylogenetic analysis showed that all viruses from Indonesia form a distinct sublineage of H5N1 genotype Z viruses, suggesting that this outbreak likely originated from a single introduction via spread throughout the country during the past two years. Continued virus activities in Indonesia were attributed to transmission via poultry movement within the country, rather than through repeated introductions by bird migration. Within Indonesia and Vietnam, H5N1 viruses have evolved over time into geographically distinct groups within each country.

Recently, the structure of HA from A/Vietnam1203/4 was solved. Comparison of its amino acid sequences with the HA genes from HPAI 2004 and 2005 isolates from clade 1 and 2 viruses identified 13 positions of antigenic variation that are mainly clustered around the receptor binding domain, while the rest are within the vestigual esterase domain . Regions of antigenic variation have been identified in H1 and H3 serotypes (Figure 1A). For H1, these sites are designated Sa, Sb, Ca and Cb while for H3, sites are designated A, B, C and D. Escape mutants of H5 HAs can be clustered into three epitopes; site 1: an exposed loop (HA1 140-145) that overlaps antigenic sites A of H3 and Ca2 of H^2 ; site 2: HA1 residues 156 and 157 that corresponds to antigenic site B in H3 serotypes; and 3) HA1 129-133, which is restricted to the Sa site in H1 HAsand H9 serotypes. In the recent studies by Smith, detection of positive selection at the amino acid level indicated that eight residues in the HA proteins were under positive selection (Figure 1B). These residues include five in antigenic sites A and E (positions 83, 86, 138, 140 and 141); two involved in receptor binding (positions 129 and 175); and positions 156 is a site for potential N-linked glycosylation that is near the receptor-binding site. The results further revealed that three residues in HA (Val 86, Ser 129 and Thr 156) were more frequently observed in human isolates than in chicken or duck isolates and likely represented early adaptation of H5N1 genotype Z to humans. Another important finding from these studies is that the phylogenetic differences between the Indonesian and Vietnamese sub-lineages was also reflected in significant differences in antigenic cross-reactivity between these two group of viruses. Specifically, viruses from

Indonesia did not react to ferret antisera against A/Vietnam1203/04, and representative viruses from Vietnam did not react with ferret antisera against Indonesian viruses IDN/5/06 and Dk/IDN/MS/04. These findings are in agreement with earlier studies with immune human serum and human 1997 and 2003 H5N1 viruses that these strains were not only phylogenetically but also antigenically distinct. Thus, natural variation as well as escape mutants suggests that continued evolution of the virus should impact the decision on which strain(s) should be used for passive and active immunization.

The instant invention provides methods for the identification, production and characterization of human anti-influenza monoclonal antibodies

Identification and Characterization of scFvs and Monoclonal Antibodies

High affinity, cross-subtype, broadly-neutralizing human anti-HA mAbs have been identified. These nAbs inhibit the post-attachment fusion process by recognizing a novel and highly conserved neutralizing epitope within the stem region at a point where key elements of the conformational change – the fusion peptide and the exposed surface of helix αA – are brought into close apposition. Structural and sequence analysis of all 16 HA subtypes points to the existence of only two variants of this epitope, corresponding to the two phylogenetic groupings of HA (Groups 1 and 2). These results raise the possibility that a small cocktail of nAbs derived from a subset of each group could provide broad protection against both seasonal and pandemic influenza.

A recent report utilized immune cells from H5N1-infected patients to isolate anti-HA nAbs. However, their epitopes and modes of action were not reported. Remarkably, we repeatedly isolated nAbs that utilizes the same VH germline gene, IGHV1-69*01, and encodes a CDR3 loop containing a tyrosine at an equivalent position to Y102, from a non-immune library. This suggests that broad anti-HA cross-immunity pre-exists in the H5-naive population, possibly due to previous exposure to H1, and, for library donors born before 1968, H2 subtypes. The recurrent use of this germline VH segment, the commonality of the CDR3 tyrosine introduced through N insertion and/or germline D gene assembly, and the promiscuous use of VL genes by the nAbs discovered in both studies, suggest that the precursor frequency of rearranged VH segments that could recognize this epitope is significant. This raises the possibility that with suitable exposure to the F10 epitope identified here, these broad-spectrum nAbs may be readily induced *in vivo*. While the genetic and structural complexity of nAbs required to provide universal protection against virus subtypes in both groups is still unknown, our data would seem to point to a surprisingly simple solution.

Three unique anti-HA-1 scFvs were identified by sequencing analysis of the 58 HA-1 positive clones. These scFvs were designated as 38 B and 1C. The VH and VL amino acid sequence of 2A is shown in Figure 4.

Ten unique anti-HA0 scFvs were identified by sequencing analysis of the 97 HA0 positive clones. These scFvs were designated as 7, 8, 10, 17, 40, 66, 80, 88, 90, and 98. Six different VH and 10 diffferent VL genes were revealed. Some scFvs shared the same VH gene. Five out of the six different VH genes belonged to the IGHV1-69 gene family. Three out of ten VL genes were kappa chain.

2A scFv is an moderate neutralizing antibody, 38B and 1C are non-nuetralizing antibodies. Ten scFvs, 7, 8, 10, 17, 40, 66, 80, 88, 90, and 98 are potent neutralizing antibodies. (Figure 6)

The nucleic acid and amino acid sequence of the neutralizing influenza antibodies are provided below:

Table 1A. Antibody 2AVariable Region nucleic acid sequences
V_H chain of 2A (SEQ ID NO:1)
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGG CACCTTCAGTGACAATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCCAGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGGGGCATCATTCCTA TCTTTGGAAAACCAAACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACTGCGGACGAATCCACGAGCACAGCCTAC ATGGACCTGAGGAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCGAGAGATTCAGACGCGTATTACTATGGTTC GGGGGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
V_L chain of 2A (SEQ ID NO:3)
CTGCCTGTGCTGACTCAATCATCCTCTGCCTCTGCTTCCCTGGGATCCTCGGTCAAGCTCACCTGCACTCTGAGCAGTGG GCATAGTAACTACATCATCGCATGGCATCAACAGCAGCCAGGGAAGGCCCCTCGGTACTTGATGAAGGTTAATAGTGATG GCAGCCACACCAAGGGGGACGGGATCCCTGATCGCTTCTCAGGCTCCAGCTCTGGGGCTGACCGCTACCTCACCATCTCC AACCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTAGTTATTTCTGTGAGACCTGGGACACTAAGATTCATGTCTTCGGAACTGGGACCAA GGTCTCCGTCCTCAG

Table 1B. Antibody 2A Variable Region amino acid sequences
V_H chain of 2A (SEQ ID NO: 2)
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSDNAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGKPNYAQKFQGRVTITADESTSTAY MDLRSLRSEDTAVYYCARDSDAYYYGSGGMDVWGQGTLVTVSS
V_L chain of 2A (SEQ ID NO:4)
LPVLTQSSSASASLGSSVKLTCTLSSGHSNYIIAWHQQQPGKAPRYLMKVNSDGSHTKGDGIPDRFSGSSSGADRYLTIS NLQSEDEASYFCETWDTKIHVFGTGTKVSVL

Table 1C. Antibody D7 Variable Region nucleic acid sequences
V_H chain of D7 (SEQ ID NO:5)
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTCCTGGAGG TATCTTCAACACCAATGCTTTCAGCTGGGTCCGACAGGCCCCTGGACAAGGTCTTGAGTGGGTGGGAGGGGTCATCCCTT TGTTTCGAACAGCAAGCTACGCACAGAACGTCCAGGGCAGAGTCACCATTACCGCGGACGAATCCACGAACACAGCCTAC ATGGAGCTTACCAGCCTGAGATCTGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAAGTAGTGGTTACCATTTTAGGAGTCA CTTTGACTCCTGGGGCCTGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

V_L chain of D7 (SEQ ID NO:9)
AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCGGCGTCTCCGGGGAAGACGGTGACCATCTCCTGCACCGGCAGCAGTGG CAACATTGCCGCCAACTATGTGCAGTGGTACCAACAACGTCCGGGCAGTGCCCCCACTACTGTGATCTATGAGGATGACC GAAGACCCTCTGGGGTCCCTGATCGGTTCTCTGGCTCCATCGACAGGTCCTCCAACTCTGCCTCCCTCACCATCTCAGGA CTGAAGACTGAGGACGAGGCTGACTACTACTGTCAGACTTATGATACCAACAATCATGCTGTGTTCGGAGGAGGCACCCA CCTGACCGTCCTC

Table 1D. Antibody H98 Variable Region nucleic acid sequences
V_H chain of H98 (SEQ ID NO:7)
CAGGTGCAGCTGGTGCAATCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTCCTGGAGG TATCTTCAACACCAATGCTTTCAGCTGGGTCCGACAGGCCCCTGGACAAGGTCTTGAGTGGGTGGGAGGGGTCATCCCTT TGTTTCGAACAGCAAGCTACGCACAGAACGTCCAGGGCAGAGTCACCATTACCGCGGACGAATCCACGAACACAGCCTAC ATGGAGCTTACCAGCCTGAGATCTGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAAGTAGTGGTTACCATTTTAGGAGTCA CTTTGACTCCTGGGGCCTGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
V_L chain of H98 (SEQ ID NO:11)
TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGAAACACGGGCAGAGGGTCACCATCTCTTGTTCTGGAGGCACCTC CAACATCGGACGTAATCATGTTAACTGGTACCAGCAACTCCCAGGAACGGCCCCCAAACTCCTCATCTATAGTAATGAAC AGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAATCTGGCACCTCCGCCTCCCTGGCCGTGAGTGGGCTCCAG TCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCATCATGGGATGACAACTTGAGTGGTTGGGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCT GACCGTCCTA

Table 1E. Antibody D7 and H98 Variable Region chain amino acid sequences
V_H chain of D7 and H98 (SEQ ID NO:6)
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAPGGIFNTNAFSWVRQAPGQGLEWVGGVIPLFRTASYAQNVQGRVTITADESTNTAY MELTSLRSADTAVYYCARSSGYHFRSHFDSWGLGTLVTVSS
V_L chain of D7 (SEQ ID NO:8)
NFMLTQPHSVSASPGKTVTISCTGSSGNIAANYVQWYQQRPGSAPTTVIYEDDRRPSGVPDRFSGSIDRSSNSASLTISG LKTEDEADYYCQTYDTNNHAVFGGGTHLTVL
V_L chain of H98 (SEQ ID NO:10)
SYELTQPPSASGKHGQRVTISCSGGTSNIGRNHVNWYQQLPGTAPKLLIYSNEQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAVSGLQ SEDEADYYCASWDDNLSGWVFGGGTKLTVL

Table 1F. Antibody D8 Variable Region nucleic acid sequences
V_H chain of D8 (SEQ ID NO:13)
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGG CACCTTCAGCGCTTATGCTTTCACCTGGGTGCGGCAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGCATCACCGGAA TGTTTGGCACAGCAAACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACGAACTCACGAGCACAGCCTAC ATGGAGTTGAGCTCCCTGACATCTGAAGACACGGCCCTTTATTATTGTGCGAGAGGATTGTATTACTATGAGAGTAGTCT TGACTATTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAG
V_L chain of D8 (SEQ ID NO:17)
CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCCGCGTCCGGGTCTCCTGGACAGTCAGTCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAG TGACGTTGGTGGTTATAACTCTGTCTCCTGGTACCAACAGCACCCAGGCAAAGCCCCCAAACTCATGATTTATGAGGTCA CTAAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGATCGCTTCTCTGCCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACCGTCTCTGGGCTC CAGGCTGAGGATGAGGCTGATTATTTCTGCTGCTCATATGCAGGCCACAGTGCTTATGTCTTCGGAACTGGGACCAAGGT CACCGTCCTG

Table 1G. Antibody D80 Variable Region nucleic acid sequences
V_H chain of D80 (SEQ ID NO:15)
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAGGGCTTCTGGAGG CACCTTCAGCGCTTATGCTTTCACCTGGGTGCGGCAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGCATCACCGGAA TGTTTGGCACAGCAAACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACGAACTCACGAGCACAGCCTAC ATGGAGTTGAGCTCCCTGACATCTGAAGACACGGCCCTTTATTATTGTGCGAGAGGATTGTATTACTATGAGAGTAGTCT

TGACTATTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAG
V_K chain of D80 (SEQ ID NO:19)
GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCA GAGTCTTAGCAGCAAGTACTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCACCATCAGTAGACTGGAG CCTGAAGATTTTGCAGTGTATTCCTGTCAGCAGTATGATGGCGTACCTCGGACGTTCGGCCAAGGGACCACGGTGGAAAT CAAA

Table 1H. Antibody D8 and D80 Variable Region chain amino acid sequences

V_H chain of D8 and D80 (SEQ ID NO:12)
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSAYAFTWVRQAPGQGLEWMGGITGMFGTANYAQKFQGRVTITADELTSTAY MELSSLTSEDTALYYCARGLYYYESSLDYWGQGTLVTVSS
V_L chain of D8 (SEQ ID NO:14)
QSVLTQPPSASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNSVSWYQQHPGKAPKLMIYEVTKRPSGVPDRFSASKSGNTASLTVSGL QAEDEADYFCCSYAGHSAYVFGTGTKVTVL
V_K chain of D80 (SEQ ID NO:16)
EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSLSSKYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYSCQQYDGVPRTFGQGTTVEIK

Table 1I . Antibody F10 Variable Region nucleic acid sequences

V_H chain of F10 (SEQ ID NO:21)
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCACGTCCTCTGAAGT CACCTTCAGTAGTTTTGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGCTGGGAGGGATCAGCCCTA TGTTTGGAACACCTAATTACGCGCAGAAGTTCCAAGGCAGAGTCACCATTACCGCGGACCAGTCCACGAGGACAGCCTAC ATGGACCTGAGGAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTATTGTGCGAGATCTCCTTCTTACATTTGTTCTGGTGG AACCTGCGTCTTTGACCATTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
V_L chain of F10 (SEQ ID NO:25)
CAGCCTGGGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCCAAGGGCTTGAGACAGACCGCCACACTCACCTGCACTGGGAACAGCAA CAATGTTGGCAACCAAGGAGCAGCTTGGCTGCAGCAGCACCAGGGCCACCCTCCCAAACTCCTATCCTACAGGAATAATG ACCGGCCCTCAGGGATCTCAGAGAGATTCTCTGCATCCAGGTCAGGAAACACAGCCTCCCTGACCATTACTGGACTCCAG CCTGAGGACGAGGCTGACTATTACTGCTCAACATGGGACAGCAGCCTCAGTGCTGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCT GACCGTCCTA

Table 1J . Antibody E90 Variable Region nucleic acid sequences

V_H chain of E90 (SEQ ID NO:23)
CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCACGTCCTCTGAAGT CACCTTCAGTAGTTTTGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGCTGGGAGGGATCAGCCCTA TGTTTGGAACACCTAATTACGCGCAGAAGTTCCAAGGCAGAGTCACCATTACCGCGGACCAGTCCACGAGGACAGCCTAC ATGGACCTGAGGAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTATTGTGCGAGATCTCCTTCTTACATTTGTTCTGGTGG AACCTGCGTCTTTGACCATTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
V_L chain of E90 (SEQ ID NO:27)
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCA GAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTT TGCAAAGAGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATTAGCAGCCTGCAGCCT GAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGATAGTTCACCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGGTAGAGATCAA A

Table 1K. Antibody F10 and E90 Variable Region amino acid sequences

V_H chain of F10 and E90 (SEQ ID NO:18)
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCTSSEVTFSSFAISWVRQAPGQGLEWLGGISPMFGTPNYAQKFQGRVTITADQSTRTAY MDLRSLRSEDTAVYYCARSPSYICSGGTCVFDHWGQGTLVTVSS

V_L chain of F10 (SEQ ID NO:20)
QPGLTQPPSVSKGLRQTATLTCTGNSNNVGNQGAAWLQQHQGHPPKLLSYRNNDRPSGISERFSASRSGNTASLTITGLQ PEDEADYYCSTWDSSLSAVVFGGGTKLTVL
V_L chain of E90 (SEQ ID NO:22)
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQRGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFAVYYCQQYDSSPYTFGQGTKVEIK

Table 1L. Antibody G17 Variable Region nucleic acid sequences

V_H chain of G17 (SEQ ID NO:29)
CAGGTGCAGCTGGTGCAATCTGGGGCTGAAGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGACTTCTGGAGT CACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGTTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCGGTG TCTTTGGTGTACCAAAGTACGCGCAGAACTTCCAGGGCAGAGTCACAATTACCGCGGACAAACCGACGAGTACAGTCTAC ATGGAGCTGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAGCCCGGGTACTACGTAGGAAAGAA TGGTTTTGATGTCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCA
V_L chain of G17 (SEQ ID NO:31)
TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCCAAGGGCTTGAGACAGACCGCCATACTCACCTGCACTGGAGACAGCAA CAATGTTGGCCACCAAGGTACAGCTTGGCTGCAACAACACCAGGGCCACCCTCCCAAACTCCTATCCTACAGGAATGGCA ACCGGCCCTCAGGGATCTCAGAGAGATTCTCTGCATCCAGGTCAGGAAATACAGCCTCCCTGACCATTATTGGACTCCAG CCTGAGGACGAGGCTGACTACTACTGCTCAGTATGGGACAGCAGCCTCAGTGCCTGGGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCT GACCGTCCTA

Table 1M. Antibody G17 Variable Region amino acid sequences

V_H chain of G17 (SEQ ID NO:24)
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGVTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIGVFGVPKYAQNFQGRVTITADKPTSTVY MELNSLRAEDTAVYYCAREPGYYVGKNGFDVWGQGTMVTVSS
V_L chain of G17 (SEQ ID NO:26)
SYELTQPPSVSKGLRQTAILTCTGDSNNVGHQGTAWLQQHQGHPPKLLSYRNGNRPSGISERFSASRSGNTASLTIIGLQ PEDEADYYCSVWDSSLSAWVFGGGTKLTVL

Table 1N. Antibody H40 Variable Region nucleic acid sequences

V_H chain of H40 (SEQ ID NO:33)
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAGGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCATGTAAGGCTTCTGGATA CACCTTCACCGGTTATTATATTCACTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGACTTGAGTGGATGGGTTGGATCAACCCTA TGACTGGTGGCACAAACTATGCACAGAAGTTTCAGGTCTGGGTCACCATGACCCGGGACACGTCCATCAACACAGCCTAC ATGGAGGTGAGCAGGCTGACATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGGGGGGCTTCCGTATTACGATATTTTGA CTGGCAGCCCGAGGCTCTTGATATCTGGGGCCTCGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
V_L chain of H40 (SEQ ID NO:35)
CAGCCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGGCCCCAGGACAGACGGCCAGCATTCCCTGTGGGGGGAACAACAT TGGAGGCTACAGTGTACACTGGTACCAACAAAAGCCGGGCCAGGCCCCCCTCTTGGTCATTTATGACGATAAAGACCGGC CCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCGCCAACTCTGGGAGCACGGCCACCCTGACAATCAGCAGGGTCGAAGCCGGG GATGAGGGCGACTACTACTGTCAGGTGTGGGATAGTGGTAATGATCGTCCGCTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGT CCTA

Table 1O. Antibody H40 Variable Region amino acid sequences

V_H chain of H40 (SEQ ID NO:28)
QVQLVQSGAEVRKPGASVKVSCKASGYTFTGYYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPMTGGTNYAQKFQVWVTMTRDTSINTAY MEVSRLTSDDTAVYYCARGASVLRYFDWQPEALDIWGLGTTVTVSS

V_L chain of H40 (SEQ ID NO:30)
QPVLTQPPSVSVAPGQTASIPCGGNNIGGYSVHWYQQKPGQAPLLVIYDDKDRPSGIPERFSGANSGSTATLTISRVEAG DEGDYYCQVWDSGNDRPLFGGGTKLTVL

Table 1P. Antibody A66 Variable Region nucleic acid sequences
V_H chain of A66 (SEQ ID NO:37)
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAAGTGAAGAAGCCTGGCTCCTCGGTGAAGGTTTCCTGCAAGGCTTCTGGAGG CCCCTTCAGCATGACTGCTTTCACCTGGCTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGTGGGATCAGCCCTA TCTTTCGTACACCGAAGTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACGAATCCACGAACACAGCCAAC ATGGAGCTGACCAGCCTGAAATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAACCCTTTCCTCCTACCAACCGAATAA TGATGCTTTTGCTATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCA
V_K chain of A66(SEQ ID NO:39)
GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCA GAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACA GGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCT GAAGATTTTGCAGTCTATTTCTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCTCAATTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA

Table 1Q. Antibody A66 Variable Region amino acid sequences
V_H chain of A66 (SEQ ID NO:32)
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGPFSMTAFTWLRQAPGQGLEWMGGISPIFRTPKYAQKFQGRVTITADESTNTAN MELTSLKSEDTAVYYCARTLSSYQPNNDAFAIWGQGTMVTVSS
V_K chain of A66 (SEQ ID NO:34)
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEP EDFAVYFCQQYGSSPQFGQGTRLEIK

Table 1R. Antibody E88 Variable Region nucleic acid sequences
V_H chain of E88 (SEQ ID NO:40)
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAAGTGAAGAAGCCTGGCTCCTCGGTGAAGGTTTCCTGCAAGGCTTCTGGAGG CCCCTTCAGCATGACTGCTTTCACCTGGCTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGTGGGATCAGCCCTA TCTTTCGTACACCGAAGTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACGAATCCACGAACACAGCCAAC ATGGAGCTGACCAGCCTGAAATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAACCCTTTCCTCCTACCAACCGAATAA TGATGCTTTTGCTATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCA
V_L chain of E88 (SEQ ID NO:42)
CTGCCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTTGTTCTGGAAGCAGCTC CAACATCGGAAGTAATACTGTAAACTGGTACCAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACTCCTCATCTATAGTAATAATC AGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAGGTCAGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCATTGGACTCCGG CCTGAGGATGAAGCTGATTATTACTGTCAGTCGTATGACAGCAGGCTCAGTGCTTCTCTCTTCGGAACTGGGACCACGGT CACCGTCCTC

Table 1S. Antibody E88 Variable Region amino acid sequences
V_H chain of E88 (SEQ ID NO:36)
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGPFSMTAFTWLRQAPGQGLEWMGGISPIFRTPKYAQKFQGRVTITADESTNTAN MELTSLKSEDTAVYYCARTLSSYQPNNDAFAIWGQGTMVTVSS
V_L chain of E88 (SEQ ID NO:38)
LPVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFSGSRSGTSASLAIIGLR PEDEADYYCQSYDSRLSASLFGTGTTVTVL

The amino acid sequences of the heavy and light chain complementarity determining regions of the neutralizing influenza antibodies are shown in Table 2 below and Figure 4.

Table 2

Antibody	CDR1	CDR2	CDR3
CONSENSUS	SYAFS (SEQ ID NO: 43)	GIIPMFGTPNYAQKFQG (SEQ ID NO: 51)	SSGYYYG GGFDV (SEQ ID NO: 59)
D7/H98VH	TNAFS (SEQ ID NO: 44)	GVIPLFRTASYAQNVQG (SEQ ID NO: 52)	SSGYHFGRSHFDS (SEQ ID NO: 60)
D8/D80VH	AYAFT (SEQ ID NO: 45)	GIIGMFGTANYAQKFQG (SEQ ID NO: 53)	GLYYYESSLDY (SEQ ID NO: 61)
F10/90VH	SFAIS (SEQ ID NO: 46)	GISPMFGTPNYAQKFQG (SEQ ID NO: 54)	SPSYICSGGTCVFDH (SEQ ID NO: 62)
G17VH	SYAIS (SEQ ID NO: 47)	GIIGVFGVPKYAQKFQG (SEQ ID NO: 55)	EPGYYVGKNGFDV (SEQ ID NO: 63)
H40VH	GYYIH (SEQ ID NO: 48)	WINPMTGGTNYAQKFQ[illegible] (SEQ ID NO: 56)	GASVLRYFDWQPEALDI (SEQ ID NO: 64)
A66VH	MTAFT (SEQ ID NO: 49)	GISPIFRTPKYAQKFQG (SEQ ID NO: 57)	TLSSYQPNNDAFAI (SEQ ID NO: 65)
2AVH	DNAIS (SEQ ID NO: 50)	GIIPIFGKPNYAQKFQG (SEQ ID NO: 58)	DSDAYYYGSGGMDV (SEQ ID NO: 66)
CONSENSUS	TGSSSNIGNYVA (SEQ ID NO: 67)	SNSDRPS (SEQ ID NO: [illegible])	QSYDSLSAYV (SEQ ID NO: 91)
D7VL	TGSSSNIAANYVQ (SEQ ID NO: 68)	EDDRRPS (SEQ ID NO: [illegible])	QSYDTNNHAV (SEQ ID NO: 92)
DD8VL	TGTSSDVGGYNSVS (SEQ ID NO: 69)	EVTKRPS (SEQ ID NO: [illegible])	CSYAGHSAYV (SEQ ID NO: 93)
F10VL	TGNSNNVGNQGAA (SEQ ID NO: 70)	RNNDRPS (SEQ ID NO: [illegible])	STWDSSLSAVV (SEQ ID NO: 94)
G17VH	TGDSNNVGHQGTA (SEQ ID NO: 71)	RNGNRPS (SEQ ID NO: [illegible])	SVWDSSLSAWV (SEQ ID NO: 95)
H40VH	GGNNIGGYSVH (SEQ ID NO: 72)	DDKDRPS (SEQ ID NO: [illegible])	QVWDSGNDRPL (SEQ ID NO: 96)
A66VH	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 73)	DASNRAT (SEQ ID NO: [illegible])	QQYGSSPQV (SEQ ID NO: 97)
D80VL	RASQSLSSKYLA (SEQ ID NO: 74)	GASSRAT (SEQ ID NO: [illegible])	QQYDGVPRT (SEQ ID NO: 98)
E88VL	TGSSSNIGNYVA (SEQ ID NO: 75)	SNNQRPS (SEQ ID NO: [illegible])	QSYDSRLSASL (SEQ ID NO: 99)
E90VK	SGSSSNIGSNTVN (SEQ ID NO: 76)	AASSLQR (SEQ ID NO: [illegible])	QQYDSSPYT (SEQ ID NO: 100)
H98VL	RASQSISSYLN (SEQ ID NO: 77)	SNEQRPS (SEQ ID NO: [illegible])	ASWDDNLSGWV (SEQ ID NO: 101)
2AVL	TLSSGHSNYIIA (SEQ ID NO: 78)	VNSDGSHTKGD (SEQ ID NO: 90)	ETWDTKIHV (SEQ ID NO: 102)

Those skilled in the art will recognize that additional scFvs and monoclonal antibodies having different binding affinities may also be therapeutically effective. For example, antibodies and scFvs having binding affinities ranging from about 1 pM to about 200 mM may also be therapeutically effective.

Neutralization of H5N1 with anti- influenza antibodies.

RECTIFIED SHEET (RULE 91) ISA/EP

H-5 pseudotyped viruses were incubated with bivalent scFv and full length antibodies and the antibody-virus mixture was contacted with 293T cells. Infectivity was quantified by measuring luciferase activity in the target cells. The D1, D8, F10, G17, H40, A66, D80, H88, E90, and H98, antibodies have potent neutralization activity against H5. D8, F10 and A66 antibodies also crossed neutralized H1N1, potently neutralized strain H1-SC/1918 and moderately neutralized strain H1-PR-34 (Figure 6)

Characterization of the 8, 10 and 66 epitope.

Primary epitope mapping of 8,10 and 66 binding to the influenza hemagglutinin (HA) protein showed that epitopes of these three antibodies were similar and are located at positions 307 on HA1 and at positions 52, 59, 65, and 93 on HA2. This epitope is comprised.

4632107v.1

of the hemagglutinin protein which is not shed by the virus. This is unlike most other known ant- influenza antibodies which bind the neuraminidase protein which is shed by the virus.

Structural characterization of the nAb epitope

The epitope and mode of binding of one of the nAbs, F10, by solving the crystal structure of its scFv fragment in complex with HA (H5-VN04) at 3.2 Å resolution, and by mutagenesis. (Fig. 6 and Table 4)

In the complex, each H5 trimer binds three molecules of F10, at symmetry-related sites, burying ~1500 $Å^2$ of protein surface per antibody; the structure of H5 itself is not significantly altered by F10 binding. HA is synthesized as a single chain, HA0, that is activated by proteolytic cleavage into two subunits, HA1 and HA2. Cleavage leads to the burial of the "fusion peptide" (comprising the first ~21 residues of HA2) into the membrane-proximal stem. F10 binding occurs exclusively in this region (Fig. 6), making intimate contacts with the fusion peptide, elements of HA1 and HA2 (both of which are integral to the structure of this region) that lock the peptide into place in the neutral pH conformation, as well as the large helical hairpin of HA2 that undergoes a massive conformation change at acidic pH in order to propel the fusion peptide from its viral membrane-proximal pocket to the distal surface of the virus, where it can trigger fusion with the endosomal membrane.

The heavy chain of F10 plays the major role in H5 binding, utilizing the tips of its three complementarity-determining regions (CDRs). Each F10 molecule make contacts with both the HA1 and HA2 subunits within a single monomer of the HA trimer (Fig 6). The contact region comprises a pocket formed by part of the HA2 fusion peptide, with elements of HA1 on one side and an exposed face of helix αA of HA2 on the other (Figs. 4 and 6). A triad of antibody residues - F55 and M54 from CDR H2, and Y102 from CDR H3 - form major contact points. The phenyl ring of F55 lies across a flat surface formed by a prominent loop of the fusion peptide loop (HA2 residues DGW 19_2-21_2 (H3 numbering scheme; subscripts 1 and 2 refer to HA1 and HA2 chains)) and the aromatic side-chains of two flanking histidines (residues 18_1 and 38_1) and a tryptophan, $W21_2$, which forms the back of the pocket. The side-chain of M54 also contacts the aromatic rings of $W21_2$ and $H38_1$, as well as the side-chain of $I45_2$ from helix αA, while its main-chain carbonyl oxygen hydrogen-bonds with the side-chain of $H38_1$. Y102 inserts its side-chain into a hydrophobic crevice created by four side-chains of the αA helix, and also hydrogen-bonds to a backbone carbonyl ($D19_2$) of the fusion peptide. The CDR H1 loop makes multiple contacts with the C-terminal end of helix αA and a loop of HA1 at the base of the head region (Fig.12d,e).

In parallel, mutagenesis experiments were carried out on helix αA to help define the epitope (Fig. 6). Mutations in 3 residues that directly contact the antibody: V52A/E, N53A and I56A, significantly reduced or ablated antibody binding, while the conservative mutation, V52L, had no effect. As controls, mutations on a different exposed face of the helix, which does not contact the antibody, had no effect on antibody binding (Fig.12b-c). Thus, mutagenesis of the αA helix is fully consistent with the epitope defined crystallographically for F10. Furthermore, the other two nAbs, for which no structural data exist, showed an almost identical mutant-nAb binding profile, indicative of a closely overlapping epitope and consistent with competitive binding (Fig. 6, Fig. 9). Taken together, we conclude that all three nAbs neutralize virus by stabilizing the neutral pH conformation of HA in a region that provides the trigger (most likely release of the fusion peptide from its pocket) for conformational changes that lead to the fusogenic state.

Antibodies

As used herein, the term "antibody" refers to immunoglobulin molecules and immunologically active portions of immunoglobulin (Ig) molecules, *i.e.*, molecules that contain an antigen binding site that specifically binds (immunoreacts with) an antigen. By "specifically binds" or "immunoreacts with" is meant that the antibody reacts with one or more antigenic determinants of the desired antigen and does not react with other polypeptides. Antibodies include, but are not limited to, polyclonal, monoclonal, chimeric, dAb (domain antibody), single chain, F_{ab}, $F_{ab'}$ and $F_{(ab')2}$ fragments, scFvs, and F_{ab} expression libraries.

A single chain Fv ("scFv") polypeptide molecule is a covalently linked V_H : :V_L heterodimer, which can be expressed from a gene fusion including V_H- and V_L-encoding genes linked by a peptide-encoding linker. (*See* Huston et al. (1988) Proc Nat Acad Sci USA 85(16):5879-5883). A number of methods have been described to discern chemical structures for converting the naturally aggregated, but chemically separated, light and heavy polypeptide chains from an antibody V region into an scFv molecule, which will fold into a three dimensional structure substantially similar to the structure of an antigen-binding site. *See, e.g.,* U.S. Patent Nos. 5,091,513; 5,132,405; and 4,946,778.

Very large naïve human scFv libraries have been and can be created to offer a large source of rearranged antibody genes against a plethora of target molecules. Smaller libraries can be constructed from individuals with infectious diseases in order to isolate disease-specific antibodies. (*See* Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:9339-43 (1992); Zebedee et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:3175-79 (1992)).

In general, antibody molecules obtained from humans relate to any of the classes IgG, IgM, IgA, IgE and IgD, which differ from one another by the nature of the heavy chain present in the molecule. Certain classes have subclasses as well, such as IgG_1, IgG_2, and others. Furthermore, in humans, the light chain may be a kappa chain or a lambda chain.

The term "antigen-binding site," or "binding portion" refers to the part of the immunoglobulin molecule that participates in antigen binding. The antigen binding site is formed by amino acid residues of the N-terminal variable ("V") regions of the heavy ("H") and light ("L") chains. Three highly divergent stretches within the V regions of the heavy and light chains, referred to as "hypervariable regions," are interposed between more conserved flanking stretches known as "framework regions," or "FRs". Thus, the term "FR" refers to amino acid sequences which are naturally found between, and adjacent to, hypervariable regions in immunoglobulins. In an antibody molecule, the three hypervariable regions of a light chain and the three hypervariable regions of a heavy chain are disposed relative to each other in three dimensional space to form an antigen-binding surface. The antigen-binding surface is complementary to the three-dimensional surface of a bound antigen, and the three hypervariable regions of each of the heavy and light chains are referred to as "complementarity-determining regions," or "CDRs." CDRs for the VH and VL regions of the 11A and 256 antibody are shown in Figure 1 and Figure 6 respectively .

As used herein, the term "epitope" includes any protein determinant capable of specific binding to an immunoglobulin, an scFv, or a T-cell receptor. Epitopic determinants usually consist of chemically active surface groupings of molecules such as amino acids or sugar side chains and usually have specific three dimensional structural characteristics, as well as specific charge characteristics. For example, antibodies may be raised against N-terminal or C-terminal peptides of a polypeptide.

As used herein, the terms "immunological binding," and "immunological binding properties" refer to the non-covalent interactions of the type which occur between an immunoglobulin molecule and an antigen for which the immunoglobulin is specific. The strength, or affinity of immunological binding interactions can be expressed in terms of the dissociation constant (K_d) of the interaction, wherein a smaller K_d represents a greater affinity. Immunological binding properties of selected polypeptides can be quantified using methods well known in the art. One such method entails measuring the rates of antigen-binding site/antigen complex formation and dissociation, wherein those rates depend on the concentrations of the complex partners, the affinity of the interaction, and geometric parameters that equally influence the rate in both directions. Thus, both the "on rate constant"

(K_{on}) and the "off rate constant" (K_{off}) can be determined by calculation of the concentrations and the actual rates of association and dissociation. (*See* Nature 361:186-87 (1993)). The ratio of K_{off} /K_{on} enables the cancellation of all parameters not related to affinity, and is equal to the dissociation constant K_d. (*See, generally*, Davies et al. (1990) Annual Rev Biochem 59:439-473). An antibody of the present invention is said to specifically bind to a influenza epitope when the equilibrium binding constant (K_d) is ≤1 μM, preferably ≤ 100 nM, more preferably ≤ 10 nM, and most preferably ≤ 100 pM to about 1 pM, as measured by assays such as radioligand binding assays or similar assays known to those skilled in the art.

A influenza protein (*e.g.*, HA or neuramindase) of the invention, or a derivative, fragment, analog, homolog or ortholog thereof, may be utilized as an immunogen in the generation of antibodies that immunospecifically bind these protein components.

Those skilled in the art will recognize that it is possible to determine, without undue experimentation, if a human monoclonal antibody has the same specificity as a human monoclonal antibody of the invention by ascertaining whether the former prevents the latter from binding to the HA protein of the influenza virus. If the human monoclonal antibody being tested competes with the human monoclonal antibody of the invention, as shown by a decrease in binding by the human monoclonal antibody of the invention, then it is likely that the two monoclonal antibodies bind to the same, or to a closely related, epitope.

Another way to determine whether a human monoclonal antibody has the specificity of a human monoclonal antibody of the invention is to pre-incubate the human monoclonal antibody of the invention with the influenza HA protein, with which it is normally reactive, and then add the human monoclonal antibody being tested to determine if the human monoclonal antibody being tested is inhibited in its ability to bind the HA protein. If the human monoclonal antibody being tested is inhibited then, in all likelihood, it has the same, or functionally equivalent, epitopic specificity as the monoclonal antibody of the invention. Screening of human monoclonal antibodies of the invention, can be also carried out by utilizing the influenza virus and determining whether the test monoclonal antibody is able to neutralize the influenza virus.

Various procedures known within the art may be used for the production of polyclonal or monoclonal antibodies directed against a protein of the invention, or against derivatives, fragments, analogs homologs or orthologs thereof. (*See, for example,* Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow E, and Lane D, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, incorporated herein by reference).

Antibodies can be purified by well-known techniques, such as affinity chromatography using protein A or protein G, which provide primarily the IgG fraction of immune serum. Subsequently, or alternatively, the specific antigen which is the target of the immunoglobulin sought, or an epitope thereof, may be immobilized on a column to purify the immune specific antibody by immunoaffinity chromatography. Purification of immunoglobulins is discussed, for example, by D. Wilkinson (The Scientist, published by The Scientist, Inc., Philadelphia PA, Vol. 14, No. 8 (April 17, 2000), pp. 25-28).

The term "monoclonal antibody" or "MAb" or "monoclonal antibody composition", as used herein, refers to a population of antibody molecules that contain only one molecular species of antibody molecule consisting of a unique light chain gene product and a unique heavy chain gene product. In particular, the complementarity determining regions (CDRs) of the monoclonal antibody are identical in all the molecules of the population. MAbs contain an antigen binding site capable of immunoreacting with a particular epitope of the antigen characterized by a unique binding affinity for it.

Monoclonal antibodies can be prepared using hybridoma methods, such as those described by Kohler and Milstein, Nature, 256:495 (1975). In a hybridoma method, a mouse, hamster, or other appropriate host animal, is typically immunized with an immunizing agent to elicit lymphocytes that produce or are capable of producing antibodies that will specifically bind to the immunizing agent. Alternatively, the lymphocytes can be immunized *in vitro*.

The immunizing agent will typically include the protein antigen, a fragment thereof or a fusion protein thereof. Generally, either peripheral blood lymphocytes are used if cells of human origin are desired, or spleen cells or lymph node cells are used if non-human mammalian sources are desired. The lymphocytes are then fused with an immortalized cell line using a suitable fusing agent, such as polyethylene glycol, to form a hybridoma cell (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103). Immortalized cell lines are usually transformed mammalian cells, particularly myeloma cells of rodent, bovine and human origin. Usually, rat or mouse myeloma cell lines are employed. The hybridoma cells can be cultured in a suitable culture medium that preferably contains one or more substances that inhibit the growth or survival of the unfused, immortalized cells. For example, if the parental cells lack the enzyme hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT or HPRT), the culture medium for the hybridomas typically will include hypoxanthine, aminopterin, and thymidine ("HAT medium"), which substances prevent the growth of HGPRT-deficient cells.

Preferred immortalized cell lines are those that fuse efficiently, support stable high level expression of antibody by the selected antibody-producing cells, and are sensitive to a medium such as HAT medium. More preferred immortalized cell lines are murine myeloma lines, which can be obtained, for instance, from the Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California and the American Type Culture Collection, Manassas, Virginia. Human myeloma and mouse-human heteromyeloma cell lines also have been described for the production of human monoclonal antibodies. (*See* Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63)).

The culture medium in which the hybridoma cells are cultured can then be assayed for the presence of monoclonal antibodies directed against the antigen. Preferably, the binding specificity of monoclonal antibodies produced by the hybridoma cells is determined by immunoprecipitation or by an *in vitro* binding assay, such as radioimmunoassay (RIA) or enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA). Such techniques and assays are known in the art. The binding affinity of the monoclonal antibody can, for example, be determined by the Scatchard analysis of Munson and Pollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980). Moreover, in therapeutic applications of monoclonal antibodies, it is important to identify antibodies having a high degree of specificity and a high binding affinity for the target antigen.

After the desired hybridoma cells are identified, the clones can be subcloned by limiting dilution procedures and grown by standard methods. (*See* Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103). Suitable culture media for this purpose include, for example, Dulbecco's Modified Eagle's Medium and RPMI-1640 medium. Alternatively, the hybridoma cells can be grown *in vivo* as ascites in a mammal.

The monoclonal antibodies secreted by the subclones can be isolated or purified from the culture medium or ascites fluid by conventional immunoglobulin purification procedures such as, for example, protein A-Sepharose, hydroxylapatite chromatography, gel electrophoresis, dialysis, or affinity chromatography.

Monoclonal antibodies can also be made by recombinant DNA methods, such as those described in U.S. Patent No. 4,816,567. DNA encoding the monoclonal antibodies of the invention can be readily isolated and sequenced using conventional procedures (*e.g.*, by using oligonucleotide probes that are capable of binding specifically to genes encoding the heavy and light chains of murine antibodies). The hybridoma cells of the invention serve as a preferred source of such DNA. Once isolated, the DNA can be placed into expression

vectors, which are then transfected into host cells such as simian COS cells, Chinese hamster ovary (CHO) cells, or myeloma cells that do not otherwise produce immunoglobulin protein, to obtain the synthesis of monoclonal antibodies in the recombinant host cells. The DNA also can be modified, for example, by substituting the coding sequence for human heavy and light chain constant domains in place of the homologous murine sequences (*see* U.S. Patent No. 4,816,567; Morrison, Nature 368, 812-13 (1994)) or by covalently joining to the immunoglobulin coding sequence all or part of the coding sequence for a non-immunoglobulin polypeptide. Such a non-immunoglobulin polypeptide can be substituted for the constant domains of an antibody of the invention, or can be substituted for the variable domains of one antigen-combining site of an antibody of the invention to create a chimeric bivalent antibody.

Fully human antibodies are antibody molecules in which the entire sequence of both the light chain and the heavy chain, including the CDRs, arise from human genes. Such antibodies are termed "human antibodies", or "fully human antibodies" herein. Human monoclonal antibodies can be prepared by using trioma technique; the human B-cell hybridoma technique (*see* Kozbor, et al., 1983 Immunol Today 4: 72); and the EBV hybridoma technique to produce human monoclonal antibodies (*see* Cole, et al., 1985 In: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Human monoclonal antibodies may be utilized and may be produced by using human hybridomas (*see* Cote, et al., 1983. Proc Natl Acad Sci USA 80: 2026-2030) or by transforming human B-cells with Epstein Barr Virus *in vitro* (see Cole, et al., 1985 In: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96).

In addition, human antibodies can also be produced using additional techniques, including phage display libraries. (*See* Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991)). Similarly, human antibodies can be made by introducing human immunoglobulin loci into transgenic animals, *e.g.*, mice in which the endogenous immunoglobulin genes have been partially or completely inactivated. Upon challenge, human antibody production is observed, which closely resembles that seen in humans in all respects, including gene rearrangement, assembly, and antibody repertoire. This approach is described, for example, in U.S. Patent Nos. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016, and in 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); and Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13 65-93 (1995).

Human antibodies may additionally be produced using transgenic nonhuman animals which are modified so as to produce fully human antibodies rather than the animal's endogenous antibodies in response to challenge by an antigen. (*See* PCT publication WO94/02602). The endogenous genes encoding the heavy and light immunoglobulin chains in the nonhuman host have been incapacitated, and active loci encoding human heavy and light chain immunoglobulins are inserted into the host's genome. The human genes are incorporated, for example, using yeast artificial chromosomes containing the requisite human DNA segments. An animal which provides all the desired modifications is then obtained as progeny by crossbreeding intermediate transgenic animals containing fewer than the full complement of the modifications. The preferred embodiment of such a nonhuman animal is a mouse, and is termed the Xenomouse™ as disclosed in PCT publications WO 96/33735 and WO 96/34096. This animal produces B cells which secrete fully human immunoglobulins. The antibodies can be obtained directly from the animal after immunization with an immunogen of interest, as, for example, a preparation of a polyclonal antibody, or alternatively from immortalized B cells derived from the animal, such as hybridomas producing monoclonal antibodies. Additionally, the genes encoding the immunoglobulins with human variable regions can be recovered and expressed to obtain the antibodies directly, or can be further modified to obtain analogs of antibodies such as, for example, single chain Fv (scFv) molecules.

An example of a method of producing a nonhuman host, exemplified as a mouse, lacking expression of an endogenous immunoglobulin heavy chain is disclosed in U.S. Patent No. 5,939,598. It can be obtained by a method, which includes deleting the J segment genes from at least one endogenous heavy chain locus in an embryonic stem cell to prevent rearrangement of the locus and to prevent formation of a transcript of a rearranged immunoglobulin heavy chain locus, the deletion being effected by a targeting vector containing a gene encoding a selectable marker; and producing from the embryonic stem cell a transgenic mouse whose somatic and germ cells contain the gene encoding the selectable marker.

One method for producing an antibody of interest, such as a human antibody, is disclosed in U.S. Patent No. 5,916,771. This method includes introducing an expression vector that contains a nucleotide sequence encoding a heavy chain into one mammalian host cell in culture, introducing an expression vector containing a nucleotide sequence encoding a

light chain into another mammalian host cell, and fusing the two cells to form a hybrid cell. The hybrid cell expresses an antibody containing the heavy chain and the light chain.

In a further improvement on this procedure, a method for identifying a clinically relevant epitope on an immunogen, and a correlative method for selecting an antibody that binds immunospecifically to the relevant epitope with high affinity, are disclosed in PCT publication WO 99/53049.

The antibody can be expressed by a vector containing a DNA segment encoding the single chain antibody described above.

These can include vectors, liposomes, naked DNA, adjuvant-assisted DNA, gene gun, catheters, *etc.* Vectors include chemical conjugates such as described in WO 93/64701, which has targeting moiety (*e.g.* a ligand to a cellular surface receptor), and a nucleic acid binding moiety (*e.g.* polylysine), viral vector (*e.g.* a DNA or RNA viral vector), fusion proteins such as described in PCT/US 95/02140 (WO 95/22618) which is a fusion protein containing a target moiety (*e.g.* an antibody specific for a target cell) and a nucleic acid binding moiety (*e.g.* a protamine), plasmids, phage, etc. The vectors can be chromosomal, non-chromosomal or synthetic.

Preferred vectors include viral vectors, fusion proteins and chemical conjugates. Retroviral vectors include moloney murine leukemia viruses. DNA viral vectors are preferred. These vectors include pox vectors such as orthopox or avipox vectors, herpesvirus vectors such as a herpes simplex I virus (HSV) vector (*see* 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), Adenovirus Vectors (*see* LeGal LaSalle et al., Science, 259:988 (1993); Davidson, et al., Nat. Genet 3:219 (1993); Yang, et al., J. Virol. 69:2004 (1995) and Adeno-associated Virus Vectors (*see* Kaplitt, M. G.. et al., Nat. Genet. 8:148 (1994).

Pox viral vectors introduce the gene into the cells cytoplasm. Avipox virus vectors result in only a short term expression of the nucleic acid. Adenovirus vectors, adeno-associated virus vectors and herpes simplex virus (HSV) vectors are preferred for introducing the nucleic acid into neural cells. The adenovirus vector results in a shorter term expression (about 2 months) than adeno-associated virus (about 4 months), which in turn is shorter than HSV vectors. The particular vector chosen will depend upon the target cell and the condition being treated. The introduction can be by standard techniques, *e.g.* infection, transfection, transduction or transformation. Examples of modes of gene transfer include *e.g.*, naked DNA,

$CaPO_4$ precipitation, DEAE dextran, electroporation, protoplast fusion, lipofection, cell microinjection, and viral vectors.

The vector can be employed to target essentially any desired target cell. For example, stereotaxic injection can be used to direct the vectors (*e.g.* adenovirus, HSV) to a desired location. Additionally, the particles can be delivered by intracerebroventricular (icv) infusion using a minipump infusion system, such as a SynchroMed Infusion System. A method based on bulk flow, termed convection, has also proven effective at delivering large molecules to extended areas of the brain and may be useful in delivering the vector to the target cell. (*See* Bobo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:2076-2080 (1994); Morrison et al., Am. J. Physiol. 266:292-305 (1994)). Other methods that can be used include catheters, intravenous, parenteral, intraperitoneal and subcutaneous injection, and oral or other known routes of administration.

These vectors can be used to express large quantities of antibodies that can be used in a variety of ways. For example, to detect the presence ofan influenza virus in a sample. The antibody can also be used to try to bind to and disrupt influenza virus cell membrane fusion.

Techniques can be adapted for the production of single-chain antibodies specific to an antigenic protein of the invention (*see e.g.*, U.S. Patent No. 4,946,778). In addition, methods can be adapted for the construction of F_{ab} expression libraries (*see e.g.*, Huse, et al., 1989 Science 246: 1275-1281) to allow rapid and effective identification of monoclonal F_{ab} fragments with the desired specificity for a protein or derivatives, fragments, analogs or homologs thereof. Antibody fragments that contain the idiotypes to a protein antigen may be produced by techniques known in the art including, but not limited to: (i) an $F_{(ab')2}$ fragment produced by pepsin digestion of an antibody molecule; (ii) an F_{ab} fragment generated by reducing the disulfide bridges of an $F_{(ab')2}$ fragment; (iii) an F_{ab} fragment generated by the treatment of the antibody molecule with papain and a reducing agent and (iv) F_v fragments.

Heteroconjugate antibodies are also within the scope of the present invention. Heteroconjugate antibodies are composed of two covalently joined antibodies. Such antibodies have, for example, been proposed to target immune system cells to unwanted cells (*see* U.S. Patent No. 4,676,980), and for treatment of HIV infection (*see* WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089). It is contemplated that the antibodies can be prepared *in vitro* using known methods in synthetic protein chemistry, including those involving crosslinking agents. For example, immunotoxins can be constructed using a disulfide exchange reaction or by forming a thioether bond. Examples of suitable reagents for this purpose include

iminothiolate and methyl-4-mercaptobutyrimidate and those disclosed, for example, in U.S. Patent No. 4,676,980.

It can be desirable to modify the antibody of the invention with respect to effector function, so as to enhance, *e.g.*, the effectiveness of the antibody in treating influenza. For example, cysteine residue(s) can be introduced into the Fc region, thereby allowing interchain disulfide bond formation in this region. The homodimeric antibody thus generated can have improved internalization capability and/or increased complement-mediated cell killing and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). (*See* Caron et al., J. Exp Med., 176: 1191-1195 (1992) and Shopes, J. Immunol., 148: 2918-2922 (1992)). Alternatively, an antibody can be engineered that has dual Fc regions and can thereby have enhanced complement lysis and ADCC capabilities. (*See* Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design, 3: 219-230 (1989)).

The invention also pertains to immunoconjugates comprising an antibody conjugated to a cytotoxic agent such as a toxin (*e.g.*, an enzymatically active toxin of bacterial, fungal, plant, or animal origin, or fragments thereof), or a radioactive isotope (*i.e.*, a radioconjugate).

Enzymatically active toxins and fragments thereof that can be used include diphtheria A chain, nonbinding active fragments of diphtheria toxin, exotoxin A chain (from Pseudomonas aeruginosa), ricin A chain, abrin A chain, modeccin A chain, alpha-sarcin, Aleurites fordii proteins, dianthin proteins, Phytolaca americana proteins (PAPI, PAPII, and PAP-S), momordica charantia inhibitor, curcin, crotin, sapaonaria officinalis inhibitor, gelonin, mitogellin, restrictocin, phenomycin, enomycin, and the tricothecenes. A variety of radionuclides are available for the production of radioconjugated antibodies. Examples include ^{212}Bi, ^{131}I, ^{131}In, ^{90}Y, and ^{186}Re.

Conjugates of the antibody and cytotoxic agent are made using a variety of bifunctional protein-coupling agents such as N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithiol) propionate (SPDP), iminothiolane (IT), bifunctional derivatives of imidoesters (such as dimethyl adipimidate HCL), active esters (such as disuccinimidyl suberate), aldehydes (such as glutareldehyde), bis-azido compounds (such as bis (p-azidobenzoyl) hexanediamine), bis-diazonium derivatives (such as bis-(p-diazoniumbenzoyl)-ethylenediamine), diisocyanates (such as tolyene 2,6-diisocyanate), and bis-active fluorine compounds (such as 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene). For example, a ricin immunotoxin can be prepared as described in Vitetta et al., Science 238: 1098 (1987). Carbon-14-labeled 1-isothiocyanatobenzyl-3-methyldiethylene triaminepentaacetic acid (MX-DTPA) is an

exemplary chelating agent for conjugation of radionucleotide to the antibody. (*See* WO94/11026).

Those of ordinary skill in the art will recognize that a large variety of possible moieties can be coupled to the resultant antibodies or to other molecules of the invention. (*See, for example*, "Conjugate Vaccines", Contributions to Microbiology and Immunology, J. M. Cruse and R. E. Lewis, Jr (eds), Carger Press, New York, (1989), the entire contents of which are incorporated herein by reference).

Coupling may be accomplished by any chemical reaction that will bind the two molecules so long as the antibody and the other moiety retain their respective activities. This linkage can include many chemical mechanisms, for instance covalent binding, affinity binding, intercalation, coordinate binding and complexation. The preferred binding is, however, covalent binding. Covalent binding can be achieved either by direct condensation of existing side chains or by the incorporation of external bridging molecules. Many bivalent or polyvalent linking agents are useful in coupling protein molecules, such as the antibodies of the present invention, to other molecules. For example, representative coupling agents can include organic compounds such as thioesters, carbodiimides, succinimide esters, diisocyanates, glutaraldehyde, diazobenzenes and hexamethylene diamines. This listing is not intended to be exhaustive of the various classes of coupling agents known in the art but, rather, is exemplary of the more common coupling agents. (*See* Killen and Lindstrom, Jour. Immun. 133:1335-2549 (1984); Jansen et al., Immunological Reviews 62:185-216 (1982); and Vitetta et al., Science 238:1098 (1987)). Preferred linkers are described in the literature. (*See, for example*, Ramakrishnan, S. et al., Cancer Res. 44:201-208 (1984) describing use of MBS (M-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester). *See also*, U.S. Patent No. 5,030,719, describing use of halogenated acetyl hydrazide derivative coupled to an antibody by way of an oligopeptide linker. Particularly preferred linkers include: (i) EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl) carbodiimide hydrochloride; (ii) SMPT (4-succinimidyloxycarbonyl-alpha-methyl-alpha-(2-pridyl-dithio)-toluene (Pierce Chem. Co., Cat. (21558G); (iii) SPDP (succinimidyl-6 [3-(2-pyridyldithio) propionamido]hexanoate (Pierce Chem. Co., Cat #21651G); (iv) Sulfo-LC-SPDP (sulfosuccinimidyl 6 [3-(2-pyridyldithio)-propianamide] hexanoate (Pierce Chem. Co. Cat. #2165-G); and (v) sulfo-NHS (N-hydroxysulfo-succinimide: Pierce Chem. Co., Cat. #24510) conjugated to EDC.

The linkers described above contain components that have different attributes, thus leading to conjugates with differing physio-chemical properties. For example, sulfo-NHS esters of alkyl carboxylates are more stable than sulfo-NHS esters of aromatic carboxylates.

NHS-ester containing linkers are less soluble than sulfo-NHS esters. Further, the linker SMPT contains a sterically hindered disulfide bond, and can form conjugates with increased stability. Disulfide linkages, are in general, less stable than other linkages because the disulfide linkage is cleaved *in vitro*, resulting in less conjugate available. Sulfo-NHS, in particular, can enhance the stability of carbodimide couplings. Carbodimide couplings (such as EDC) when used in conjunction with sulfo-NHS, forms esters that are more resistant to hydrolysis than the carbodimide coupling reaction alone.

The antibodies disclosed herein can also be formulated as immunoliposomes. Liposomes containing the antibody are prepared by methods known in the art, such as described in Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); and U.S. Pat. Nos. 4,485,045 and 4,544,545. Liposomes with enhanced circulation time are disclosed in U.S. Patent No. 5,013,556.

Particularly useful liposomes can be generated by the reverse-phase evaporation method with a lipid composition comprising phosphatidylcholine, cholesterol, and PEG-derivatized phosphatidylethanolamine (PEG-PE). Liposomes are extruded through filters of defined pore size to yield liposomes with the desired diameter. Fab' fragments of the antibody of the present invention can be conjugated to the liposomes as described in Martin et al., J. Biol. Chem., 257: 286-288 (1982) via a disulfide-interchange reaction.

Use of Antibodies Against Influenza Virus

Methods for the screening of antibodies that possess the desired specificity include, but are not limited to, enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and other immunologically mediated techniques known within the art.

Antibodies directed against a influenza virus protein such as HA (or a fragment thereof) may be used in methods known within the art relating to the localization and/or quantitation of a influenza virus protein (*e.g.*, for use in measuring levels of the influenza virus protein within appropriate physiological samples, for use in diagnostic methods, for use in imaging the protein, and the like). In a given embodiment, antibodies specific to an influenza virus protein, or derivative, fragment, analog or homolog thereof, that contain the antibody derived antigen binding domain, are utilized as pharmacologically active compounds (referred to hereinafter as "Therapeutics").

An antibody specific for an influenza virus protein of the invention can be used to isolate an influenza virus polypeptide by standard techniques, such as immunoaffinity, chromatography or immunoprecipitation. Antibodies directed against an influenza virus protein (or a fragment thereof) can be used diagnostically to monitor protein levels in tissue

as part of a clinical testing procedure, *e.g.*, to, for example, determine the efficacy of a given treatment regimen. Detection can be facilitated by coupling (*i.e.*, physically linking) the antibody to a detectable substance. Examples of detectable substances include various enzymes, prosthetic groups, fluorescent materials, luminescent materials, bioluminescent materials, and radioactive materials. Examples of suitable enzymes include horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, β-galactosidase, or acetylcholinesterase; examples of suitable prosthetic group complexes include streptavidin/biotin and avidin/biotin; examples of suitable fluorescent materials include umbelliferone, fluorescein, fluorescein isothiocyanate, rhodamine, dichlorotriazinylamine fluorescein, dansyl chloride or phycoerythrin; an example of a luminescent material includes luminol; examples of bioluminescent materials include luciferase, luciferin, and aequorin, and examples of suitable radioactive material include ^{125}I, ^{131}I, ^{35}S or ^{3}H.

Antibodies of the invention, including polyclonal, monoclonal, humanized and fully human antibodies, may used as therapeutic agents. Such agents will generally be employed to treat or prevent an influenza virus -related disease or pathology (*e.g.,* bird flu) in a subject. An antibody preparation, preferably one having high specificity and high affinity for its target antigen, is administered to the subject and will generally have an effect due to its binding with the target. Administration of the antibody may abrogate or inhibit or interfere with the internalization of the virus into a cell In this case, the antibody binds to the target and masks a binding site of the naturally occurring ligand, thereby blocking fusion the virus to the cell membrane inhibiting internalization of the virus.

A therapeutically effective amount of an antibody of the invention relates generally to the amount needed to achieve a therapeutic objective. As noted above, this may be a binding interaction between the antibody and its target antigen that, in certain cases, interferes with the functioning of the target. The amount required to be administered will furthermore depend on the binding affinity of the antibody for its specific antigen, and will also depend on the rate at which an administered antibody is depleted from the free volume other subject to which it is administered. Common ranges for therapeutically effective dosing of an antibody or antibody fragment of the invention may be, by way of nonlimiting example, from about 0.1 mg/kg body weight to about 50 mg/kg body weight. Common dosing frequencies may range, for example, from twice daily to once a week.

Antibodies specifically binding an influenza virus protein or a fragment thereof of the invention, as well as other molecules identified by the screening assays disclosed herein, can be administered for the treatment of an influenza virus -related disorders in the form of

pharmaceutical compositions. Principles and considerations involved in preparing such compositions, as well as guidance in the choice of components are provided, for example, in 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, Langhorne, Pa., 1994; and Peptide And Protein Drug Delivery (Advances In Parenteral Sciences, Vol. 4), 1991, M. Dekker, New York.

Where antibody fragments are used, the smallest inhibitory fragment that specifically binds to the binding domain of the target protein is preferred. For example, based upon the variable-region sequences of an antibody, peptide molecules can be designed that retain the ability to bind the target protein sequence. Such peptides can be synthesized chemically and/or produced by recombinant DNA technology. (*See, e.g.*, Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993)). The formulation can also contain more than one active compound as necessary for the particular indication being treated, preferably those with complementary activities that do not adversely affect each other. Alternatively, or in addition, the composition can comprise an agent that enhances its function, such as, for example, a cytotoxic agent, cytokine, chemotherapeutic agent, or growth-inhibitory agent. Such molecules are suitably present in combination in amounts that are effective for the purpose intended.

The active ingredients can also be entrapped in microcapsules prepared, for example, by coacervation techniques or by interfacial polymerization, for example, hydroxymethylcellulose or gelatin-microcapsules and poly-(methylmethacrylate) microcapsules, respectively, in colloidal drug delivery systems (for example, liposomes, albumin microspheres, microemulsions, nano-particles, and nanocapsules) or in macroemulsions.

The formulations to be used for *in vivo* administration must be sterile. This is readily accomplished by filtration through sterile filtration membranes.

Sustained-release preparations can be prepared. Suitable examples of sustained-release preparations include semipermeable matrices of solid hydrophobic polymers containing the antibody, which matrices are in the form of shaped articles, *e.g.*, films, or microcapsules. Examples of sustained-release matrices include polyesters, hydrogels (for example, poly(2-hydroxyethyl-methacrylate), or poly(vinylalcohol)), polylactides (U.S. Pat. No. 3,773,919), copolymers of L-glutamic acid and γ ethyl-L-glutamate, non-degradable ethylene-vinyl acetate, degradable lactic acid-glycolic

acid copolymers such as the LUPRON DEPOT ™ (injectable microspheres composed of lactic acid-glycolic acid copolymer and leuprolide acetate), and poly-D-(-)-3-hydroxybutyric acid. While polymers such as ethylene-vinyl acetate and lactic acid-glycolic acid enable release of molecules for over 100 days, certain hydrogels release proteins for shorter time periods.

An antibody according to the invention can be used as an agent for detecting the presence of an influenza virus (or a protein or a protein fragment thereof) in a sample. Preferably, the antibody contains a detectable label. Antibodies can be polyclonal, or more preferably, monoclonal. An intact antibody, or a fragment thereof (*e.g.*, F_{ab}, scFv, or $F_{(ab)2}$) can be used. The term "labeled", with regard to the probe or antibody, is intended to encompass direct labeling of the probe or antibody by coupling (*i.e.*, physically linking) a detectable substance to the probe or antibody, as well as indirect labeling of the probe or antibody by reactivity with another reagent that is directly labeled. Examples of indirect labeling include detection of a primary antibody using a fluorescently-labeled secondary antibody and end-labeling of a DNA probe with biotin such that it can be detected with fluorescently-labeled streptavidin. The term "biological sample" is intended to include tissues, cells and biological fluids isolated from a subject, as well as tissues, cells and fluids present within a subject. Included within the usage of the term "biological sample", therefore, is blood and a fraction or component of blood including blood serum, blood plasma, or lymph. That is, the detection method of the invention can be used to detect an analyte mRNA, protein, or genomic DNA in a biological sample *in vitro* as well as *in vivo*. For example, *in vitro* techniques for detection of an analyte mRNA include Northern hybridizations and *in situ* hybridizations. *In vitro* techniques for detection of an analyte protein include enzyme linked immunosorbent assays (ELISAs), Western blots, immunoprecipitations, and immunofluorescence. *In vitro* techniques for detection of an analyte genomic DNA include Southern hybridizations. Procedures for conducting immunoassays are described, for example in "ELISA: Theory and Practice: Methods in Molecular Biology", Vol. 42, J. R. Crowther (Ed.) Human Press, Totowa, NJ, 1995; "Immunoassay", E. Diamandis and T. Christopoulus, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1996; and "Practice and Theory of Enzyme Immunoassays", P. Tijssen, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1985. Furthermore, *in vivo* techniques for detection of an analyte protein include introducing into a subject a labeled anti-analyte protein antibody. For example, the antibody can be labeled with a radioactive marker whose presence and location in a subject can be detected by standard imaging techniques.

Pharmaceutical compositions

The antibodies or agents of the invention (also referred to herein as "active compounds"), and derivatives, fragments, analogs and homologs thereof, can be incorporated into pharmaceutical compositions suitable for administration. Such compositions typically comprise the antibody or agent and a pharmaceutically acceptable carrier. As used herein, the term "pharmaceutically acceptable carrier" is intended to include any and all solvents, dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents, and the like, compatible with pharmaceutical administration. Suitable carriers are described in the most recent edition of Remington's Pharmaceutical Sciences, a standard reference text in the field, which is incorporated herein by reference. Preferred examples of such carriers or diluents include, but are not limited to, water, saline, ringer's solutions, dextrose solution, and 5% human serum albumin. Liposomes and non-aqueous vehicles such as fixed oils may also be used. The use of such media and agents for pharmaceutically active substances is well known in the art. Except insofar as any conventional media or agent is incompatible with the active compound, use thereof in the compositions is contemplated. Supplementary active compounds can also be incorporated into the compositions.

A pharmaceutical composition of the invention is formulated to be compatible with its intended route of administration. Examples of routes of administration include parenteral, *e.g.*, intravenous, intradermal, subcutaneous, oral (*e.g.*, inhalation), transdermal (*i.e.*, topical), transmucosal, and rectal administration. Solutions or suspensions used for parenteral, intradermal, or subcutaneous application can include the following components: a sterile diluent such as water for injection, saline solution, fixed oils, polyethylene glycols, glycerine, propylene glycol or other synthetic solvents; antibacterial agents such as benzyl alcohol or methyl parabens; antioxidants such as ascorbic acid or sodium bisulfite; chelating agents such as ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA); buffers such as acetates, citrates or phosphates, and agents for the adjustment of tonicity such as sodium chloride or dextrose. The pH can be adjusted with acids or bases, such as hydrochloric acid or sodium hydroxide. The parenteral preparation can be enclosed in ampoules, disposable syringes or multiple dose vials made of glass or plastic.

Pharmaceutical compositions suitable for injectable use include sterile aqueous solutions (where water soluble) or dispersions and sterile powders for the extemporaneous preparation of sterile injectable solutions or dispersion. For intravenous administration, suitable carriers include physiological saline, bacteriostatic water, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) or phosphate buffered saline (PBS). In all cases, the composition must be

sterile and should be fluid to the extent that easy syringeability exists. It must be stable under the conditions of manufacture and storage and must be preserved against the contaminating action of microorganisms such as bacteria and fungi. The carrier can be a solvent or dispersion medium containing, for example, water, ethanol, polyol (for example, glycerol, propylene glycol, and liquid polyethylene glycol, and the like), and suitable mixtures thereof. The proper fluidity can be maintained, for example, by the use of a coating such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersion and by the use of surfactants. Prevention of the action of microorganisms can be achieved by various antibacterial and antifungal agents, for example, parabens, chlorobutanol, phenol, ascorbic acid, thimerosal, and the like. In many cases, it will be preferable to include isotonic agents, for example, sugars, polyalcohols such as manitol, sorbitol, sodium chloride in the composition. Prolonged absorption of the injectable compositions can be brought about by including in the composition an agent which delays absorption, for example, aluminum monostearate and gelatin.

Sterile injectable solutions can be prepared by incorporating the active compound in the required amount in an appropriate solvent with one or a combination of ingredients enumerated above, as required, followed by filtered sterilization. Generally, dispersions are prepared by incorporating the active compound into a sterile vehicle that contains a basic dispersion medium and the required other ingredients from those enumerated above. In the case of sterile powders for the preparation of sterile injectable solutions, methods of preparation are vacuum drying and freeze-drying that yields a powder of the active ingredient plus any additional desired ingredient from a previously sterile-filtered solution thereof.

Oral compositions generally include an inert diluent or an edible carrier. They can be enclosed in gelatin capsules or compressed into tablets. For the purpose of oral therapeutic administration, the active compound can be incorporated with excipients and used in the form of tablets, troches, or capsules. Oral compositions can also be prepared using a fluid carrier for use as a mouthwash, wherein the compound in the fluid carrier is applied orally and swished and expectorated or swallowed. Pharmaceutically compatible binding agents, and/or adjuvant materials can be included as part of the composition. The tablets, pills, capsules, troches and the like can contain any of the following ingredients, or compounds of a similar nature: a binder such as microcrystalline cellulose, gum tragacanth or gelatin; an excipient such as starch or lactose, a disintegrating agent such as alginic acid, Primogel, or corn starch; a lubricant such as magnesium stearate or Sterotes; a glidant such as colloidal silicon dioxide;

a sweetening agent such as sucrose or saccharin; or a flavoring agent such as peppermint, methyl salicylate, or orange flavoring.

For administration by inhalation, the compounds are delivered in the form of an aerosol spray from pressured container or dispenser which contains a suitable propellant, *e.g.*, a gas such as carbon dioxide, or a nebulizer.

Systemic administration can also be by transmucosal or transdermal means. For transmucosal or transdermal administration, penetrants appropriate to the barrier to be permeated are used in the formulation. Such penetrants are generally known in the art, and include, for example, for transmucosal administration, detergents, bile salts, and fusidic acid derivatives. Transmucosal administration can be accomplished through the use of nasal sprays or suppositories. For transdermal administration, the active compounds are formulated into ointments, salves, gels, or creams as generally known in the art.

The compounds can also be prepared in the form of suppositories (*e.g.*, with conventional suppository bases such as cocoa butter and other glycerides) or retention enemas for rectal delivery.

In one embodiment, the active compounds are prepared with carriers that will protect the compound against rapid elimination from the body, such as a controlled release formulation, including implants and microencapsulated delivery systems. Biodegradable, biocompatible polymers can be used, such as ethylene vinyl acetate, polyanhydrides, polyglycolic acid, collagen, polyorthoesters, and polylactic acid. Methods for preparation of such formulations will be apparent to those skilled in the art. The materials can also be obtained commercially from Alza Corporation and Nova Pharmaceuticals, Inc. Liposomal suspensions (including liposomes targeted to infected cells with monoclonal antibodies to viral antigens) can also be used as pharmaceutically acceptable carriers. These can be prepared according to methods known to those skilled in the art, for example, as described in U.S. Patent No. 4,522,811.

It is especially advantageous to formulate oral or parenteral compositions in dosage unit form for ease of administration and uniformity of dosage. Dosage unit form as used herein refers to physically discrete units suited as unitary dosages for the subject to be treated; each unit containing a predetermined quantity of active compound calculated to produce the desired therapeutic effect in association with the required pharmaceutical carrier. The specification for the dosage unit forms of the invention are dictated by and directly dependent on the unique characteristics of the active compound and the particular therapeutic

effect to be achieved, and the limitations inherent in the art of compounding such an active compound for the treatment of individuals.

The pharmaceutical compositions can be included in a container, pack, or dispenser together with instructions for administration.

Screening Methods

The invention provides methods (also referred to herein as "screening assays") for identifying modulators, *i.e.*, candidate or test compounds or agents (*e.g.*, peptides, peptidomimetics, small molecules or other drugs) that modulate or otherwise interfere with the fusion of an influenza virus to the cell membrane. Also provided are methods of indentifying compounds useful to treat influenza infection. The invention also encompasses compounds identified using the screening assays described herein.

For example, the invention provides assays for screening candidate or test compounds which modulate the interaction between the influenza virus and the cell membrane. The test compounds of the invention can be obtained using any of the numerous approaches in combinatorial library methods known in the art, including: biological libraries; spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries; synthetic library methods requiring deconvolution; the "one-bead one-compound" library method; and synthetic library methods using affinity chromatography selection. The biological library approach is limited to peptide libraries, while the other four approaches are applicable to peptide, non-peptide oligomer or small molecule libraries of compounds. (*See, e.g.,* Lam, 1997. Anticancer Drug Design 12: 145).

A "small molecule" as used herein, is meant to refer to a composition that has a molecular weight of less.than about 5 kD and most preferably less than about 4 kD. Small molecules can be, *e.g.*, nucleic acids, peptides, polypeptides, peptidomimetics, carbohydrates, lipids or other organic or inorganic molecules. Libraries of chemical and/or biological mixtures, such as fungal, bacterial, or algal extracts, are known in the art and can be screened with any of the assays of the invention.

Examples of methods for the synthesis of molecular libraries can be found in the art, for example in: 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; and Gallop, et al., 1994. J. Med. Chem. 37: 1233.

Libraries of compounds may be presented in solution (*see e.g.*, Houghten, 1992. Biotechniques 13: 412-421), or on beads (*see* Lam, 1991. Nature 354: 82-84), on chips (*see* Fodor, 1993. Nature 364: 555-556), bacteria (*see* U.S. Patent No. 5,223,409), spores (*see* U.S. Patent 5,233,409), plasmids (*see* Cull, et al., 1992. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1865-1869) or on phage (*see* 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; and U.S. Patent No. 5,233,409.).

In one embodiment, a candidate compound is introduced to an antibody-antigen complex and determining whether the candidate compound disrupts the antibody-antigen complex, wherein a disruption of this complex indicates that the candidate compound modulates the interaction between an influenza virus and the cell membrane. For example, the antibody may be monoclonal antibody D7, D8, F10, G17, H40, A66, D80, E88, E90, and H98 and the antigen may be located on the HA protein of an influenza virus.

In another embodiment, at least one HA protein is provided, which is exposed to at least one neutralizing monoclonal antibody. Formation of an antibody-antigen complex is detected, and one or more candidate compounds are introduced to the complex. If the antibody-antigen complex is disrupted following introduction of the one or more candidate compounds, the candidate compounds is useful to treat a an influenza virus -related disease or disorder, *e.g.* bird flu. For example, the at least one influenza virus protein may be provided as an influenza virus molecule.

Determining the ability of the test compound to interfere with or disrupt the antibody-antigen complex can be accomplished, for example, by coupling the test compound with a radioisotope or enzymatic label such that binding of the test compound to the antigen or biologically-active portion thereof can be determined by detecting the labeled compound in a complex. For example, test compounds can be labeled with ^{125}I, ^{35}S, ^{14}C, or ^{3}H, either directly or indirectly, and the radioisotope detected by direct counting of radioemission or by scintillation counting. Alternatively, test compounds can be enzymatically-labeled with, for example, horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, or luciferase, and the enzymatic label detected by determination of conversion of an appropriate substrate to product.

In one embodiment, the assay comprises contacting an antibody-antigen complex with a test compound, and determining the ability of the test compound to interact with the antigen or otherwise disrupt the existing antibody-antigen complex. In this embodiment, determining the ability of the test compound to interact with the antigen and/or disrupt the antibody-

antigen complex comprises determining the ability of the test compound to preferentially bind to the antigen or a biologically-active portion thereof, as compared to the antibody.

In another embodiment, the assay comprises contacting an antibody-antigen complex with a test compound and determining the ability of the test compound to modulate the antibody-antigen complex. Determining the ability of the test compound to modulate the antibody-antigen complex can be accomplished, for example, by determining the ability of the antigen to bind to or interact with the antibody, in the presence of the test compound.

Those skilled in the art will recognize that, in any of the screening methods disclosed herein, the antibody may be a an influenza virus neutralizing antibody, such as monoclonal antibody D7, D8, F10, G17, H40, A66, D80, E88, E90, and H98. Additionally, the antigen may be a HA protein, or a portion thereof In any of the assays described herein, the ability of a candidate compound to interfere with the binding between the D7, D8, F10, G17, H40, A66, D80, E88, E90, and H98 monoclonal antibody and the HA protein indicates that the candidate compound will be able to interfere with or modulate the fusion of the influenza virus and the cell membrane Moreover, because the binding of the HA protein to cell is responsible for influenza virus entry into cells such candidate compounds will also be useful in the treatment of a influenza virus related disease or disorder, *e.g.* bird flu..

The screening methods disclosed herein may be performed as a cell-based assay or as a cell-free assay. The cell-free assays of the invention are amenable to use of both the soluble form or the membrane-bound form of the HA proteins and fragments thereof. In the case of cell-free assays comprising the membrane-bound forms of the HA proteins, it may be desirable to utilize a solubilizing agent such that the membrane-bound form of the proteins are maintained in solution. Examples of such solubilizing agents include non-ionic detergents such as 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), or 3-(3-cholamidopropyl)dimethylamminiol-2-hydroxy-1-propane sulfonate (CHAPSO).

In more than one embodiment, it may be desirable to immobilize either the antibody or the antigen to facilitate separation of complexed from uncomplexed forms of one or both following introduction of the candidate compound, as well as to accommodate automation of the assay. Observation of the antibody-antigen complex in the presence and absence of a candidate compound, can be accomplished in any vessel suitable for containing the reactants.

Examples of such vessels include microtiter plates, test tubes, and micro-centrifuge tubes. In one embodiment, a fusion protein can be provided that adds a domain that allows one or both of the proteins to be bound to a matrix. For example, GST-antibody fusion proteins or GST-antigen fusion proteins can be adsorbed onto glutathione sepharose beads (Sigma Chemical, St. Louis, MO) or glutathione derivatized microtiter plates, that are then combined with the test compound, and the mixture is incubated under conditions conducive to complex formation (*e.g.*, at physiological conditions for salt and pH). Following incubation, the beads or microtiter plate wells are washed to remove any unbound components, the matrix immobilized in the case of beads, complex determined either directly or indirectly. Alternatively, the complexes can be dissociated from the matrix, and the level of antibody-antigen complex formation can be determined using standard techniques.

Other techniques for immobilizing proteins on matrices can also be used in the screening assays of the invention. For example, either the antibody or the antigen (*e.g.* the can be immobilized utilizing conjugation of biotin and streptavidin. Biotinylated antibody or antigen molecules can be prepared from biotin-NHS (N-hydroxy-succinimide) using techniques well-known within the art (*e.g.*, biotinylation kit, Pierce Chemicals, Rockford, Ill.), and immobilized in the wells of streptavidin-coated 96 well plates (Pierce Chemical). Alternatively, other antibodies reactive with the antibody or antigen of interest, but which do not interfere with the formation of the antibody-antigen complex of interest, can be derivatized to the wells of the plate, and unbound antibody or antigen trapped in the wells by antibody conjugation. Methods for detecting such complexes, in addition to those described above for the GST-immobilized complexes, include immunodetection of complexes using such other antibodies reactive with the antibody or antigen.

The invention further pertains to novel agents identified by any of the aforementioned screening assays and uses thereof for treatments as described herein.

Diagnostic Assays

Antibodies of the present invention can be detected by appropriate assays, *e.g.*, conventional types of immunoassays. For example, a an assay can be performed in which a influenza protein (*e.g.*, HA1, HA 2 or neurominidase) or fragment thereof is affixed to a solid phase. Incubation is maintained for a sufficient period of time to allow the antibody in the sample to bind to the immobilized polypeptide on the solid phase. After this first incubation, the solid phase is separated from the sample. The solid phase is washed to remove unbound materials and interfering substances such as non-specific proteins which may also be present in the sample. The solid phase containing the antibody of interest bound to the immobilized

polypeptide is subsequently incubated with a second, labeled antibody or antibody bound to a coupling agent such as biotin or avidin. This second antibody may be another anti-influenza antibody or another antibody. Labels for antibodies are well-known in the art and include radionuclides, enzymes (*e.g.* maleate dehydrogenase, horseradish peroxidase, glucose oxidase, catalase), fluors (fluorescein isothiocyanate, rhodamine, phycocyanin, fluorescarmine), biotin, and the like. The labeled antibodies are incubated with the solid and the label bound to the solid phase is measured. These and other immunoassays can be easily performed by those of ordinary skill in the art.

An exemplary method for detecting the presence or absence of a influenza virus (in a biological sample involves obtaining a biological sample from a test subject and contacting the biological sample with a labeled monoclonal or scFv antibody according to the invention such that the presence of the influenza virus is detected in the biological sample.

As used herein, the term "labeled", with regard to the probe or antibody, is intended to encompass direct labeling of the probe or antibody by coupling (*i.e.*, physically linking) a detectable substance to the probe or antibody, as well as indirect labeling of the probe or antibody by reactivity with another reagent that is directly labeled. Examples of indirect labeling include detection of a primary antibody using a fluorescently-labeled secondary antibody and end-labeling of a DNA probe with biotin such that it can be detected with fluorescently-labeled streptavidin. The term "biological sample" is intended to include tissues, cells and biological fluids isolated from a subject, as well as tissues, cells and fluids present within a subject. That is, the detection method of the invention can be used to detect an influenza virus in a biological sample *in vitro* as well as *in vivo*. For example, *in vitro* techniques for detection of an influenza virus include enzyme linked immunosorbent assays (ELISAs), Western blots, immunoprecipitations, and immunofluorescence. Furthermore, *in vivo* techniques for detection of an influenza virus include introducing into a subject a labeled anti-influenza virus antibody. For example, the antibody can be labeled with a radioactive marker whose presence and location in a subject can be detected by standard imaging techniques.

In one embodiment, the biological sample contains protein molecules from the test subject. One preferred biological sample is a peripheral blood leukocyte sample isolated by conventional means from a subject.

The invention also encompasses kits for detecting the presence of an influenza virus in a biological sample. For example, the kit can comprise: a labeled compound or agent capable of detecting an influenza virus (*e.g.*, an anti-influenza scFv or monoclonal antibody)

in a biological sample; means for determining the amount of an influenza virus in the sample; and means for comparing the amount of an influenza virus in the sample with a standard. The compound or agent can be packaged in a suitable container. The kit can further comprise instructions for using the kit to detect an influenza virus in a sample.

Passive Immunization

Passive immunization has proven to be an effective and safe strategy for the prevention and treatment of viral diseases. (*See* 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); and Igarashi et al., Nat. Med. 5:211-16 (1999), each of which are incorporated herein by reference)). Passive immunization using neutralizing human monoclonal antibodies could provide an immediate treatment strategy for emergency prophylaxis and treatment of influenza such as bird flu while the alternative and more time-consuming development of vaccines and new drugs in underway.

Subunit vaccines potentially offer significant advantages over conventional immunogens. They avoid the safety hazards inherent in production, distribution, and delivery of conventional killed or attenuated whole-pathogen vaccines. Furthermore, they can be rationally designed to include only confirmed protective epitopes, thereby avoiding suppressive T epitopes (*see* Steward et al., J. Virol. 69:7668 (1995)) or immunodominant B epitopes that subvert the immune system by inducing futile, non-protective responses (*e.g.* "decoy" epitopes). (*See* Garrity et al., J. Immunol. 159:279 (1997)).

Moreover, those skilled in the art will recognize that good correlation exists between the antibody neutralizing activity *in vitro* and the protection *in vivo* for many different viruses, challenge routes, and animal models. (*See* Burton, Natl. Rev. Immunol. 2:706-13 (2002); Parren et al., Adv. Immunol. 77:195-262 (2001)). The data presented herein demonstrate that the D7, D8, F10, G17, H40, A66, D80, E88, E90, and H98 human monoclonal antibodies can be further developed and tested in *in vivo* animal studies to determine its clinical utility as a potent viral entry inhibitor for emergency prophylaxis and treatment of influenza.

Antigen-Ig chimeras in vaccination

It has been over a decade since the first antibodies were used as scaffolds for the efficient presentation of antigenic determinants to the immune systems. (*See* Zanetti, Nature 355:476-77 (1992); Zaghouani et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:631-35 (1995)). When a peptide is included as an integral part of an IgG molecule (*e.g.*, the 11A or 256 IgG1 monoclonal antibody described herein), the antigenicity and immunogenicity of the peptide

epitopes are greatly enhanced as compared to the free peptide. Such enhancement is possibly due to the antigen-IgG chimeras longer half-life, better presentation and constrained conformation, which mimic their native structures.

Moreover, an added advantage of using an antigen-Ig chimera is that either the variable or the Fc region of the antigen-Ig chimera can be used for targeting professional antigen-presenting cells (APCs). To date, recombinant Igs have been generated in which the complementarity-determining regions (CDRs) of the heavy chain variable gene (V_H) are replaced with various antigenic peptides recognized by B or T cells. Such antigen-Ig chimeras have been used to induce both humoral and cellular immune responses. (*See* Bona et al., Immunol. Today 19:126-33 (1998)).

Chimeras with specific epitopes engrafted into the CDR3 loop have been used to induce humoral responses to either HIV-1 gp120 V3-loop or the first extracellular domain (D1) of human CD4 receptor. (*See* Lanza et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:11683-87 (1993); Zaghouani et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:631-35 (1995)). The immune sera were able to prevent infection of CD4 SupT1 cells by HIV-1MN (anti-gp120 V3C) or inhibit syncytia formation (anti-CD4-D1). The CDR2 and CDR3 can be replaced with peptide epitopes simultaneously, and the length of peptide inserted can be up to 19 amino acids long.

Alternatively, one group has developed a "troybody" strategy in which peptide antigens are presented in the loops of the Ig constant (C) region and the variable region of the chimera can be used to target IgD on the surface of B-cells or MHC class II molecules on professional APCs including B-cells, dendritic cells (DC) and macrophages. (*See* Lunde et al., Biochem. Soc. Trans. 30:500-6 (2002)).

An antigen-Ig chimera can also be made by directly fusing the antigen with the Fc portion of an IgG molecule. You et al., Cancer Res. 61:3704-11 (2001) were able to obtain all arms of specific immune response, including very high levels of antibodies to hepatitis B virus core antigen using this method.

DNA vaccination

DNA vaccines are stable, can provide the antigen an opportunity to be naturally processed, and can induce a longer-lasting response. Although a very attractive immunization strategy, DNA vaccines often have very limited potency to induce immune responses. Poor uptake of injected DNA by professional APCs, such as dendritic cells (DCs), may be the main cause of such limitation. Combined with the antigen-Ig chimera vaccines, a promising new DNA vaccine strategy based on the enhancement of APC antigen presentation has been reported (*see* 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)), which takes advantage of the presence of Fc receptors (FcγRs) on the surface of DCs.

It is possible to generate a DNA vaccine encoding an antigen (Ag)-Ig chimera. Upon immunization, Ag-Ig fusion proteins will be expressed and secreted by the cells taking up the DNA molecules. The secreted Ag-Ig fusion proteins, while inducing B-cell responses, can be captured and internalized by interaction of the Fc fragment with FcγRs on DC surface, which will promote efficient antigen presentation and greatly enhance antigen-specific immune responses. Applying the same principle, DNA encoding antigen-Ig chimeras carrying a functional anti-MHC II specific scFv region gene can also target the immunogens to all three types of APCs. The immune responses could be further boosted with use of the same protein antigens generated *in vitro* (*i.e.*,"prime and boost"), if necessary. Using this strategy, specific cellular and humoral immune responses against infection of influenza virus were accomplished through intramuscular (i.m.) injection of a DNA vaccine. (*See* Casares et al., Viral. Immunol. 10:129-36 (1997)).

Vaccine compositions

Therapeutic or prophylactic compositions are provided herein, which generally comprise mixtures of one or more monoclonal antibodies or ScFvs and combinations thereof. The prophylactic vaccines can be used to prevent an influenza virus infection and the therapeutic vaccines can be used to treat individuals following an influenza virus infection. Prophylactic uses include the provision of increased antibody titer to an influenza virus in a vaccination subject. In this manner, subjects at high risk of contracting influenza can be provided with passive immunity to an influenza virus

These vaccine compositions can be administered in conjunction with ancillary immunoregulatory agents. For example, cytokines, lymphokines, and chemokines, including, but not limited to, IL-2, modified IL-2 (Cys125 → Ser125), GM-CSF, IL-12, γ-interferon, IP-10, MIP1β, and RANTES.

Methods of Immunization

The vaccines of the present invention have superior immunoprotective and immunotherapeutic properties over other anti-viral vaccines

The invention provides a method of immunization, e.g., inducing an immune response, of a subject. A subject is immunized by administration to the subject a composition containing a membrane fusion protein of a pathogenic enveloped virus. The fusion protein is coated or embedded in a biologically compatible matrix.

The fusion protein is glycosylated, e.g. contains acarbohydrate moiety. The carbohydrate moiety may be in the form of a monosaccharide, disaccharide(s). oligosaccharide(s), polysaccharide(s), or their derivatives (e.g. sulfo- or phospho-substituted). The carbohydrate is linear or branched. The carbohydrate moiety is N-linked or O-linked to a polypeptide. N-linked glycosylation is to the amide nitrogen of asparagine side chains and O-linked glycosylation is to the hydroxy oxygen of serine and threonine side chains.

The carbohydrate moiety is endogenous to the subject being vaccinated. Alternatively, the carbohydrate moiety is exogenous to the subject being vaccinated. The carbohydrate moiety are carbohydrate moieties that are not typically expressed on polypeptides of the subject being vaccinated. For example, the carbohydrate moieties are plant-specific carbohydrates. Plant specific carbohydrate moieties include for example N-linked glycan having a core bound α1,3 fucose or a core bound β 1,2 xylose. Alternatively, the carbohydrate moiety are carbohydrate moieties that are expressed on polypeptides or lipids of the subject being vaccinate. For example many host cells have been genetically engineered to produce human proteins with human-like sugar attachments.

For example, the fusion protein is a trimeric hemagglutinin protein. Optionally, the hemagglutinin protein is produced in a non-mammalian cell such as a plant cell.
The subject is at risk of developing or suffering from a viral infection. Enveloped viruses include for example, epstein-barr virus, herpes simplex virus, type 1 and 2, human cytomegalovirus, human herpesvirus, type 8, varicella zoster virus, hepatitis B virus, hepatitis C virus, human immunodeficiency virus, influenza virus, measles virus, mumps virus, parainfluenza virus, respiratory syncytial virus, rabies virus, and rubella virus
The methods described herein lead to a reduction in the severity or the alleviation of one or more symptoms of a viral infection. Infections are diagnosed and or monitored, typically by a physician using standard methodologies A subject requiring immunization is identified by methods know in the art. For example subjects are immunized as outlined in the CDC's General Recommendation on Immunization (51(RR02) pp1-36) Cancer is diagnosed for example by physical exam, biopsy, blood test, or x-ray.
The subject is *e.g.*, any mammal, *e.g.*, a human, a primate, mouse, rat, dog, cat, cow, horse, pig, a fish or a bird. The treatment is administered prior to diagnosis of the infection. Alternatively, treatment is administered after diagnosis.

Efficaciousness of treatment is determined in association with any known method for diagnosing or treating the particular disorder or infection. Alleviation of one or more symptoms of the disorder indicates that the compound confers a clinical benefit.

Evaluation of Antigenic Protein Fragments (APFs) for Vaccine Potential

A vaccine candidate targeting humoral immunity must fulfill at least three criteria to be successful: it must provoke a strong antibody response ("immunogenicity"); a significant fraction of the antibodies it provokes must cross-react with the pathogen ("immunogenic fitness"); and the antibodies it provokes must be protective. While immunogenicity can often be enhanced using adjuvants or carriers, immunogenic fitness and the ability to induce protection (as evidenced by neutralization) are intrinsic properties of an antigen which will ultimately determine the success of that antigen as a vaccine component.

Evaluation of Immunogenic Fitness

"Immunogenic fitness" is defined as the fraction of antibodies induced by an antigen that cross-react with the pathogen. (*See* Matthews et al., J. Immunol. 169:837 (2002)). It is distinct from immunogenicity, which is gauged by the titer of all of the antibodies induced by an antigen, including those antibodies that do not cross-react with the pathogen. Inadequate immunogenic fitness has probably contributed to the disappointing track record of peptide vaccines to date. Peptides that bind with high affinity to antibodies and provoke high antibody titers frequently lack adequate immunogenic fitness, and, therefore, they fail as potential vaccine components. Therefore, it is important to include immunogenic fitness as one of the criteria for selecting influenza vaccine candidates.

A common explanation for poor immunogenic fitness is the conformational flexibility of most short peptides. Specifically, a flexible peptide may bind well to antibodies from patients, and elicit substantial antibody titers in naïve subjects. However, if the peptide has a large repertoire of conformations, a preponderance of the antibodies it induces in naïve subjects may fail to cross-react with the corresponding native epitope on intact pathogen.

Like short peptides, some APFs may be highly flexible and, therefore may fail as vaccine components. The most immunogenically fit APFs are likely to consist of self-folding protein subdomains that are intrinsically constrained outside the context of the whole protein.

Because immunogenic fitness is primarily a property of the APF itself, and not of the responding immune system, immunogenic fitness can be evaluated in an animal model (*e.g.* in mice) even though ultimately the APF will have to perform in humans.

The immunogenic fitness achieved by APFs is evaluated by immunosorption of anti-APF sera with purified spike or membrane protein, in a procedure analogous to that described in Matthews et al., J. Immunol. 169:837 (2002). IgG is purified from sera collected from mice that have been immunized. Purified, biotinylated proteins (as appropriate, depending on the particular APF with which the mice were immunized) are mixed with the mouse IgG and

incubated. Streptavidin-coated sepharose beads are then added in sufficient quantity to capture all of the biotinylated protein, along with any bound IgG. The streptavidin-coated beads are removed by centrifugation at 13,000 rpm in a microcentrifuge, leaving IgG that has been depleted of antibodies directed against the protein, respectively. Mock immunoabsorptions are performed in parallel in the same way, except that biotinylated BSA will be substituted for influenza protein as a mock absorbent.

To measure the immunogenic fitness of APFs, the absorbed antibodies and the mock-absorbed antibodies are titered side-by-side in ELISA against the immunizing APF. For APFs affinity selected from a phage display NPL, the antigen for these ELISAs will be purified APF-GST fusion proteins. For the potentially glycosylated APFs from the mammalian cell display NPL, the antigen for these ELISAs will be APF-Fc fusion proteins secreted by mammalian cells and purified with protein A. The percentage decrease in the anti-APF titer of absorbed antibodies compared with the mock-absorbed antibodies will provide a measure of the immunogenic fitness of the APF.

Methods of Treatment

The invention provides for both prophylactic and therapeutic methods of treating a subject at risk of (or susceptible to) an influenza virus-related disease or disorder. Such diseases or disorders include but are not limited to, *e.g.*, bird flu.

Prophylactic Methods

In one aspect, the invention provides methods for preventing an influenza virus -related disease or disorder in a subject by administering to the subject a monoclonal antibody or scFv antibody of the invention or an agent identified according to the methods of the invention. For example, scFv and/or monoclonal antibody D7, D8, F10, G17, H40, A66, D80, E88, E90, and H98 may be administered in therapeutically effective amounts. Optionally, two or more anti-influenza antibodies are co-administered

Subjects at risk for an influenza virus -related diseases or disorders include patients who have come into contact with an infected person or who have been exposed to the influenza virus in some other way. Administration of a prophylactic agent can occur prior to the manifestation of symptoms characteristic of the influenza virus -related disease or disorder, such that a disease or disorder is prevented or, alternatively, delayed in its progression.

The appropriate agent can be determined based on screening assays described herein. Alternatively, or in addition, the agent to be administered is a scFv or monoclonal antibody

that neutralizes an influenza virus that has been identified according to the methods of the invention.

Therapeutic Methods

Another aspect of the invention pertains to methods of treating an influenza virus-related disease or disorder in a patient. In one embodiment, the method involves administering an agent (*e.g.*, an agent identified by a screening assay described herein and/or an scFv antibody or monoclonal antibody identified according to the methods of the invention), or combination of agents that neutralize the influenza to a patient suffering from the disease or disorder.

Combinatory Methods

The invention provides treating an influenza-related disease or disorder, such as bird flu, in a patient by administering two or more antibodies, such as D7, D8, F10, G17, H40, A66, D80, E88, E90, and H98 that bind to the same epitope of the HA protein.

The invention will be further described in the following examples, which do not limit the scope of the invention described in the claims.

EXAMPLES

Example 1: General Methods

Expression and preparation of various panning antigens for selection of phage display antibody library.

HA1. HA1 is the N-terminal fragment (aa17-338) of (A/Thailand/2(SP-33)/2004(H5N1). The gene was codon-optimized and expressed as fusion protein with a C-terminal 9 amino-acids tag (C9-tag:GTETSQVAPA). The fusion protein HA1-C9 was expressed in 293T cells transiently and the secreted protein was purified from supernatant by affinity chromatography. Protein A Sepharose covalently coupled with anti-C9 antibody 1D4 (National Cell Culture Center) was used for purification of HA1-C9.

Trimeric HA0. The ectodomain (HA0) of hamagglutinin (HA) gene of A/Viet Nam/1203/2004 was expressed in insect cells as a fusion protein by adapting the protocol described previously[33]. This construct contains a C-terminal trimerizing 'foldon' sequence from the bacteriophage T4 fibritin to stabilize the trimeric structure, followed by a thrombin site and a His6 tag. The cDNA of the fusion protein was cloned into the baculovirus transfer vector, pAcGP67A (BD Biosciences, Bedford, MA) to allow for efficient secretion of

recombinant protein. $9x10^6$ cells were infected with the viral stock. 3 days after infection, the cells were spun down and the supernatant was incubated with 6 ml Ni-NTA beads (Qiagen Inc,, Valencia, CA). The beads were washed with TBS buffer (10 mM Tris.HCl/ 80 mM NaCl, pH8.0) with 10 mM imidazole and eluted with TBS with 250 mM Imidazole. The eluted HA5 protein was dialyzed against TBS buffer and further purified by ion-exchange using Mono Q HR10/10 column (GE Healthcare, Piscataway, NJ). The purified HA5 were digested by thrombin overnight. The integrity and property of HA0 trimer was examined using Gel filtration (Superdex 200 column) and SDS-PAGE.

Selection of phage antibody libraries and screening of antibodies against H5.

Two human non-immune scFv libraries (a total of $2.7x10^{10}$ members) constructed from B-cells of 57 un-immunized donors were used for selection of scFvs against the purified HA1 or trimeric HA0. $5x10^{11}$ pfu of phage-scFvs prepared from each library were incubated with immunotubes (Nunc, Naperville, IL) coated with 10 μg of HA1 or HA0, separately. The selection procedures were the same as described previously. After two rounds of selection, randomly picked single phage-scFv clones were screened for specific binding to HA1 or HA0 by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as described previously. Clones that bound to HA1 or HA0 with A_{450} values of >1.0 were scored as positive, whereas negative clones gave values of <0.1. For HA1or HA0 specific binding clones, the genes of variable regions of heavy (VH) and light (VL) chain were sequenced and their corresponding amino acid sequences were aligned to identify antibodies with different sequence for further characterization.

Expression and purification of soluble scFv-Fcs and full-length human IgG1.

Phage-scFvs of individual clones were produced for neutralization assay using the same method as making phage library. Phage particles were concentrated 25 times by using PEG/NaCl precipitation. scFv-Fcs and whole human IgG1s were produced as described previously. In brief, selected scFvs were converted to scFv-Fcs by subcloning the scFv into a Fc expression vector pcDNA 3.1-Hinge which contains the hinge, CH2, and CH3 domains of human IgG1 but lacks CH1. For whole human IgG1s, the VH and VL gene fragments of scFv were separately subcloned into human IgG1 kappa light chain or lambda light chain expression vector TCAE5 or TCAE6. scFv-Fcs or IgG1s were expressed in 293T or 293F cells (Invitrogen) by transient transfection and purified by protein A sepharose affinity chromatography.

Surface Plasmon Resonance (SPR) analysis

Kinetic analyses of H5 HA Mabs binding to recombinant HA0 (VietNam1203/04) trimer were performed on a Biacore T100 (Biacore) at 25 °C. Anti-human IgG Fc antibody (Biacore) was covalently coated to individual flow cell surfaces of a CM4 sensor chip by amine-coupling using the amine coupling kit (Biacore). HA Mabs were captured onto anti-human IgG Fc surfaces at the flow rate of 10ul/min in HBS buffer (Biacore) to ensure that the Mab-HA0 binding occurred as a homogenous 1:1 Langmuir interaction. HA0 was injected over each flow cell at the flow rate of 30ul/min in HBS buffer, and at concentrations ranging from to 0.31 to 20 nM. A buffer injection served as a negative control. All experiments contained an additional anti-human IgG Fc antibody control surface that served to account for changes in the buffer refractive index and to test for potential nonspecific interactions between HA0 and anti-human IgG Fc. Upon completion of each association and dissociation cycle, surfaces were regenerated with 3M $MgCl_2$ solution. The association rates (*ka*), dissociation rate constants (*kd*), and affinity constants (*KD*) were calculated using Biacore T100 evaluation software. The goodness of each fit was based on the agreement between experimental data and the calculated fits, where the Chi^2 values were below 1.0. Surface densities of Mabs against HA0 were optimized to minimize mass transfer and avoid any contribution of avidity effects. All *ka, kd, KD* reported here represent the means and standard errors of three experiments.

Viruses and cells

Wild type influenza A/Vietnam/1203/2004 (H5N1; H5-VN04), A/HongKong/483/1997 (H5N1; H5-HK97), A/Netherlands/219/2003 (H7N7; H7-NL03), and A/Ohio/4/1983 (H1N1; H1-OH83) viruses as well as a cold-adapted vaccine strain of A/Ann Arbor/6/1960 (H2N2) were obtained from the WHO Global Influenza Surveillance Network and provided by Alexander Klimov (CDC, Atlanta, USA). H1-PR34 and Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells were obtained from the American Type Culture Collection and propagated in Dulbecco's Modification of Eagle's Medium with 10% fetal bovine serum. Viral infectivity was determined by plaque assay on MDCK cells. Live wildtype H5N1 viruses were handled in biosafety level 3 containment, including enhancements required by the U.S. Department of Agriculture and the Select Agents program http://www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/bmbl5/bmbl5toc.htm.

Neutralization assay with HA-pseudotyped viruses

Plasmids and constructs

The full length HA gene of A/Thailand/2(SP-33)/2004(H5N1)), H5-SP33, and neuramidase gene of A/Vietnam 1203/2004, N1, were codon-optimized and cloned into pcDNA3.1 vector to obtain the pcDNA3.1-H5-SP33 and pcDNA3.1-N1 expression plasmid, separately. The pCAGGS-H1(SC) plasmid encoding A/South Carolina/1/1918 (H1N1) full length HA protein was kindly provided by form Dr. P.Palese (Mount Sinai School of Medicine, US). The pCAGGS-H1(PR) plasmid encoding A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) HA protein was a generous gift from Dr. M. Farzan (Harvard Medical School, US).

Making the HA-pseudotyped viruses.

The single-round HIV luciferase reporter viruses of H5N1 or H1N1 pseudotyped by H5-SP33, H1-SC/1918 or H1-PR/34 were made by co-transfection of 293T cells with 4 plasmids that are pcDNA3.1-H5-SP33, HIV packaging vector pCMVΔR 8.2 encoding HIV-1 Gag-Pol[57], transfer vector pHIV-Luc encoding the firefly luciferase reporter gene under control of the HIV-1 LTR, and expressing plasmid pcDNA3.1-N1. 36 hours post-transfection, viral supernatants were harvested and stored at 4°C.

Neutralization assay.

Before transducing cells, viral supernatant of H1-SC/1918 or H1-PR/34F pseudotyped viruses was incubated with 16μg/mL TPCK-treated trpsin for one hour at 25°C and then neutralized with trypsin neutralizing solution (TNS, Cambrex) at the ratio of 1:1 (V/V). Testing antibodies or sera were incubated with adequate amount of H5-SP33 pseudotyped or trpsin-treated H1 pseudotyped viruses for 30mins at RT. The mixture was then added to 293T cells in 96 well plates and continued the culture for 48 hours. Viral entry level was evaluated by measuring the luciferase activity in the target cells with a microplate luminometer.

Epitope mapping of antibody 8, 10 and 66

Plasmids and constructs. pcDNA3.1-H5-SP33, pCAGGS-H1(SC) and pCAGGS-H1(PR) were described as above. pCAGGS-H7 (FPV) which encodes HA proteins for A/FPV/Rostock/34 (H7N1) was kindly provided by Dr. X. Yang (Beth Israel Deaconess Medical Center). All the mutants of pcDNA3.1-H5-SP33 or pCAGGS-H7 (FPV) were constructed by the QuikChange method (Stratagene). Flow cytometry analysis of the binding of anti-H5 antibodies to HA expressing cells. Various full-length wild type HA and HA mutants expressing plasmids for H1, H5 or H7 were transfected transiently into 293T cells. 48 hours after transfection, anti-H5 antibodies (10ug/ml) were incubated with transfected 293T cells at 4 °C for 1 hour. Cells were then washed three times with PBS containing 0.5%

BSA and 0.1% NaN3. For the detection of anti-H5 antibodies' binding to HA transfected cells, FITC-labeled goat anti-human IgG (Pierce) was used as secondary antibody and incubated with cells at 4 °C for 30 min. Cells were washed again as above and analyzed using a Becton Dickinson FACScaliber with CellQuest software.

Microneutralization assay

The method was performed as described previously[48]. Briefly, 100 $TCID_{50}$ (median tissue culture infectious doses) of virus were mixed in equal volume with log2 dilutions of antibody stock solution (1 mg/ml) in 96-well tissue culture plates, and incubated for 1h at 37°C. Indicator MDCK cells (1.5×10^4 cells/well) were added to the plates, followed by incubation at 37°C for 20 hours. To establish the endpoint, cell monolayers were then washed with PBS, fixed in acetone, and viral antigen detected by indirect ELISA with a mAb against influenza A NP (A-3, Accurate).

Plaque Reduction Assay

A/Viet Nam 1203/2004 (H5N1) or A/Netherland/219/03 (H7N7) viruses (10,000 pfu) were incubated with anti-H5 scFv-Fcs at three different concentrations 100ug/ml, 10ug/ml and 1ug/ml at 37 °C for 30 mins. The virus-antibody mixture was transferred onto MDCK cell monolayers in 12-well plates and incubated at 37°C for 1 h and cells were then washed and overlaid with agar. After 4 days of incubation, the agar overlay was discarded, and plaques were visualized by crystal violet staining.

Hemagglutination inhibition (HI) assay

Avian influenza viruses preferentially bind to sialic acid receptors that contain N-acteylneuraminic acid α2,3-galactose (α2,3Gal) linkages while human viruses preferentially bind to those containing N-acetylneuaminic acid α2,6-galactose ((α2,6Gal) linkages. The molecular basis for receptor specificity is most likely determined by a complex set of residues in the viral HA. Hemagglutination-inhibition (HI) tests are a simple and widely used method to assess antibody responses to influenza hemagglutinin. Stephenson et al. reported that by using horse erythrocytes and thereby increasing the proportion of α2,3Gal linkages available for binding, the sensitivity of the hemagglutination assay was improved. In addition, the titers of the HI assay correlated well with the titers of the micro-neutralization assay. The pseudotyped viruses will be first titered using hemagglutination of horse erythrocytes as described . The initial high-throughput screens will be similarly performed using horse erythrocyte suspensions and assaying for the ability of the phage antibodies to inhibit the HI endpoint of the titered H5/N1 viruses. More detailed secondary screens for inhibition of H5N1 reporter virus entry and HI will be preformed using dose response studies with soluble

scFvFc proteins produced by transiently transfected 293T cells and purified by protein A beads.

Viral binding inhibition assay

$0.5x10^6$ 293T cells were incubated with H5-TH04-pseudotyped HIV viruses (~ 500 ng of p24) in the presence of anti-H5 mAbs, control mAbs, or in the absence of antibodies, in a buffer of PBS containing 0.5% BSA and 0.02% NaN_3 at 4°C. After an hour of incubation, cells were spun down. Supernatants were collected and tested for p24 levels using a HIV-1 $p24^{CA}$ capture ELISA kit (NCI, Frederick, NIH) to quantify the unbound viruses. The cells were then washed one or two times and lysed to quantify the cell-bound virus using the same method.

Cell fusion inhibition assay

293T cells, ~90% confluent in six-well plates, were transfected with pcDNA3.1-H5-TH04 plasmid and pcDNA 3.1-N1 at a ratio of 4:1 (3 μg total DNA/ well) using lipofectamine 2000 (Invitrogen). The culture medium was supplemented with 1 ml of anti-H5, control or mock mAbs at 6 hours post-transfection, and cells cultured for 36 hours. Cells were observed for syncytia formation with a phase-contrast microscope. Photomicrographs were taken at 10x magnification.

Expression and preparation of various HA proteins for panning

HA1 is an N-terminal fragment of HA of H5N1 A/Thailand/2(SP-33)/2004 (H5-TH04), residues 11 to 325 (H3 numbering). The gene was codon-optimized and expressed as fusion protein with a C-terminal 9 amino-acids tag (C9-tag:GTETSQVAPA). The fusion protein HA1-C9 was expressed in 293T cells transiently and the secreted proteins in supernatant were harvested 48 hours after transfection and purified from the supernatant by affinity chromatography using Protein A Sepharose that coupled covalently with anti-C9 antibody 1D4 (National Cell Culture Center). The method to produce HA0 protein of H5-VN04 is the same as described below for crystallization of H5-F10 complex but without the baculovirus coinfection for furin-cleavage.

ELISA

0.2μg of pure H5 HA proteins was coated onto 96-well Maxisorb ELISA plate (Nunc, NY) at 2μg/mL in PBS at 4°C overnight. The plate was washed with PBS for 3 times to remove uncoated proteins. For regular ELISA, 1 μg/mL of anti-H5 scFv-Fcs followed by HRP-anti-human IgG1 were used to detect the binding of anti-H5 scFv-Fcs to H5 HA proteins. For competition ELISA, 50 μL(10^{12}pfu) of anti-H5 phage-scFvs were mixed with 5 μg/mL of anti-H5 scFv-Fcs and applied to H5-VN04 HA coated ELISA plate. The

competition of scFv-Fcs for the binding of phage-scFvs to HA0 were determined by measuring the remaining binding of phage-scFvs using HRP-anti-M13. The optical density at 450 nm was measured after incubation of peroxidase tetramethylbenzidine (TMB) substrate system (KPL, Gaithersburg MD).

Expression, purification, and crystallization of the H5-F10 complex

The gene encoding single chain (VH-linker-VL) F10 (scFv) was cloned into pSynI vector containing an N-terminal periplasmic secretion signal pelB, and a C-terminal 6xHis tag. F10 scFv was expressed in XL10 cells in 2YT media containing 0.1% glucose (w/v) at 25°C for 15 hours with 0.5 mM IPTG. Protein was purified first by Hisbind Ni-NTA (Novagen) according to the manufacturer's instructions, and then by Superdex 200 (Amersham Biosciences) in 50 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, pH 8.

The ectodomain of H5-VN04 HA gene was expressed in insect cells as a fusion protein by adapting the protocol described previously[6]. This construct contains a C-terminal trimerizing 'foldon' sequence from the bacteriophage T4 fibritin to stabilize the trimeric structure, followed by a thrombin site and a His_6 tag. The cDNA of the fusion protein was cloned into the baculovirus transfer vector, pAcGP67A (BD Biosciences, Bedford, MA), to allow for efficient secretion of recombinant protein. To obtain fully cleaved HA (as HA1-HA2 trimers), sf9 cells were co-infected with baculovirus stocks of HA0 and furin at an empirically derived ratio. The furin cDNA was a gift from Dr. Robert Fuller (University of Michigan). Three days after infection, the cells were spun down and the supernatant was incubated with Ni-NTA beads (Qiagen Inc., Valencia, CA). The beads were washed with TBS buffer (10 mM Tris.HCl, 80 mM NaCl, pH8.0) with 10 mM imidazole, and eluted with TBS with 250 mM Imidazole. The eluted H5 protein was dialyzed against TBS buffer and further purified by ion-exchange using Mono Q HR10/10 column (GE Healthcare, Piscataway, NJ). The purified H5 was digested by thrombin overnight and further purified by Superdex 200 column in TBS buffer.

H5-F10 complexes were formed by mixing the two purified components, and isolated by Superdex 200 in TBS buffer (Supplementary Figure 1b). Peak fractions were pooled and concentrated to ~11 mg/ml. The integrity of the H5 trimer was examined using Gel filtration (Superdex 200 column) and SDS-PAGE. Crystals grew by the hanging drop vapor diffusion method at 22°C. Two μL of H5-F10 were mixed with an equal volume of 12.5% PEG 1K, 25% ethylene glycol, 100 mM Tris, pH 8.5. Crystals were flash-frozen in liquid nitrogen prior to data collection.

Co-crystallization of the H5-F10 complex

For co-crystallization of the H5-F10 complex, F10 was expressed in *E. coli* and purified by Ni-NTA and gel filtration. H5 was expressed by co-infection of H5 and furin baculovirus stocks in sf9 cells, and purified by Ni-NTA, anion ion exchange, and gel filtration chromatography. H5-F10 complexes were obtained by mixing H5 with an excess of F10 and isolated by gel filtration. Crystals were grown by mixing 2 □L of complex (~11 mg/ml) with an equal volume of 12.5% PEG 1K, 25% ethylene glycol, 100 mM Tris, pH 8.5 using the hanging drop vapor diffusion method at 22°C. The crystal structure was determined at 3.2 Å resolution by Molecular Replacement and refined to an R_{FREE} of .29 with excellent geometry.

Data collection, structure determination, and refinement

X-ray diffraction data were collected at the Stanford Synchrotron Radiation Laboratory (SSRL) beam-lines 7.1 and 9.2. Data were processed with XDS[7] and the HKL2000 package.

The structure of the H5-F10 complex was determined by molecular replacement with PHASER using the structure of H5 (A/Vietnam/1194/04; PDB code 2IBX) and the scFv structure of SARS nAb 80R (PDB code 2GHW) as search models. The scFv structure homology model was build with WHATIF[9]. The asymmetric unit contains two H5 trimers and six F10 molecules.

Solutions from molecular replacement were subjected to several rounds of refinement with the program REFMAC5 with simulated annealing in CNS and manual model rebuilding with Coot and Xtalview. The final model includes 506/503/503/496/495/496 residues for 6 independent copies of HA, respectively, 233 residues for each nAb10, 24 N-acetyl-d-glucosamine and 6 β-d-mannose, 0 water molecules. Geometric parameters were assessed with PROCHECK and Rampage.

Protection of mice with hMabs against H5

All mouse studies were performed in USDA and CDC accredited biosafety level 3 (BSL3) animal facility in accordance with protocols approved by the CDC Animal Care and Use Committee. Female 8-10 weeks old Balb/C mice (5 per group) were used in all experiments. For all groups, mice were observed for 2 weeks, weighted and deaths noted daily.

Prophylactic mouse study. Three hMabs (D8-IgG1, F10-IgG1 and A66-IgG1) or control hMab 80R-IgG1 at 2 doses of 10 mg/kg and 2.5 mg/kg [53] were administered into mice intraperitoneally (i.p.). 24 hours after hMabs administration, all groups of mice were

challenged with A/Vietnam/1203/04(H5N1) or A/HK/483/97 (H5N1) intranasally (i.n.) at dose of 10 MLD_{50} (50% mouse lethal dose) viruses under light anesthesia.

Therapeutic mouse study. Mice were first infected i.n. with 10 MLD_{50} of A/Vietnam/1203/04(H5N1) or A/HK/483/97 (H5N1). Three hMabs againt H5 or control hMab at 10 mg/kg were then i.p. administered into mice 24, 48 and 72 hours after A/Vietnam/1203/04(H5N1) infection. For A/HK/483/97 (H5N1) infected mice, hMabs were only injected 24 hours after viral challenge.

Identification of anti-H5 phage antibodies

Antibodies against HA1. Purified recombinant HA1 was used to select antibodies from two non-immune human scFv libraries separately. After two rounds of selection on HA1, 58 out of 96 clones screened by ELISA were HA1 specific positive clones. Three unique anti-HA1 scFvs were identified (38B and 1C) by sequencing analysis of the 58 HA1-positive clones. Similar selection and screening experiments were repeated; no new clones were identified but obtained the same three scFvs as described above. Amino acid sequence of 2A is showed in Figure 4

Antibodies against ectodomain of H5 (HA0). Purified recombinant trimeric HA0 was used to select the same antibody libraries as that used for HA1. After two rounds of selection on HA0, a total of 392 clones were screened for HA0 specific binding by ELISA. 97 clones recognized HA0 protein specifically. Ten unique anti-HA0 scFvs (7, 8, 10, 17, 40, 66, 80, 88, 90 and 98) were identified by sequence analysis. Six different VH and 10 different VL genes were revealed (some scFvs shared the same VH gene). Five out of the six different VH belong to one gene family, IGHV1-69. The VL genes were much diverse than the VH genes, three out of the 10 VL are Kappa chain. (Figure 4).

Establishment of a reliable single-round reporter virus system

The single-round HIV luciferase reporter viruses of H5N1 or H1N1 pseudotyped by H5-SP33, H1-SC/1918 or H1-PR/34 were made by co-transfection of 293T cells with 4 plasmids that are pcDNA3.1-H5-SP33, HIV packaging vector pCMVΔR 8.2 encoding HIV-1 Gag-Pol, transfer vector pHIV-Luc encoding the firefly luciferase reporter gene under control of the HIV-1 LTR, and expressing plasmid pcDNA3.1-N1. 36 hours post-transfection, viral supernatants were harvested and stored at 4°C. The titer of HA0-pseudotyped viruses was measured by infecting 293T cells. Including the N1 expressing plasmid in the tranfection of making pseudotyped viruses can dramatically increase the titer of H5-pseudotyped viruses The proper behavior of the H5-pseudotyped viruses was examined by using ferret immune serum against H5N1 (A/VietNam/ 2004). These viruses can be neutralized potently by anti-

serum, while not by pre-bleeding serum. Thus a reliable single-round high efficient reporter virus system was established for efficient screening of neutralizing antibody

Example 2: Identification of neutralizing antibodies against H5N1 using viruses pseudotyped with H5-SP33 and microneutralization assay.

Results of neutralization assay using pseudotyped viruses.

Bivalent scFvFcs of anti-H5 antibodies were produced and tested for neutralization activities against HA0-pseudotyped viruses. We found that 2A is a moderate neutralizing antibody, 38B and 1C are non-neutralizing antibodies (data not shown). The 2A antibody has been used as a useful anti-HA reagent for other assays (epitope mapping) described below.) By using HA0 trimer as a target, we have identified 10 new unique antibodies against HA0. These Abs were screened for neutralization activity by using a novel high-throughput phage-scFvs screening method that has been recently set up in our lab. Briefly, the phage-scFvs of individual clones were directly used in a neutralization assay immediately following being screened by ELISA for positive clones in 96-well plates. In this schema, neutralization activity will be known in 48 hours. By doing this, we bypass steps of subcloning and expressing of soluble Abs which are time-consuming.

As shown in the figure, neutralizing Abs that were indicated by phage-scFvs (Figure 6 top left panel) turned out to be potent neutralizing when confirmed with soluble scFvFc Abs (Figure 6 top middle panel). All the 10 antibodies screened by phage-scFvs are potent neutralizing Abs. We also converted three of the 10 antibodies (D8, F10 and A66) into full-length human IgG1, the potent neutralization activity were again seen with H5-SP33 pseudotyped viruses (Figure 6 bottom left panel). The three antibodies also cross-neutralized H1N1: potently neutralized stain of H1-SC/1918 (Figure 6 bottom left panel) and moderately neutralized strain of H1-PR/34 (Figure 6 bottom right panel).

Results of microneutralization assay. As shown in Figure 6 the top right panel, the 10 anti-H5 antibodies exhibited different levels of neutralization. F10-Fc, A66-Fc, E88-Fc and E90-Fc appeared to be the most potent inhibitors, which neutralize more than 95% of 10,000pfu virus at 10ug/ml and more than 50% at 1ug/ml. We also have seen complete plaque reduction when 100pfu was used for these four antibodies at 10ug/ml or 1ug/ml (data not shown).

The 10 antibodies (scFv-Fcs) were found to neutralize H5 pseudo-viruses (virus-like particles with HIV-1 only cores that display H5 on their surface), in this case from the clade 1 virus, A/Thailand/2-SP-33/2004 (H5N1) ("H5-TH04"). All 10 antibodies also exhibited high but distinct levels of neutralization against H5-VN04 (Clade 1) and A/Indonesia/5/2005

("H5-IN05", Clade 2.1) viruses in a stringent plaque reduction assay (Fig.9), suggesting that the neutralization epitope(s) is conserved across different H5 clades. However, none of the Abs neutralized a Group 2 virus, HPAI H7N7 strain, A/Netherlands/219/03 (H7N7) (H7-NL03) (Figure 4).

All 10 nAbs bound to trimeric H5 and cross-competed against each other (Fig.16), indicating that they recognize an overlapping epitope. Based on this finding as well as VH sequence diversity and neutralization potency, three nAbs (D8, F10 and A66) were selected and converted into full-length human IgG1. All three nAb IgG1s bound to recombinant H5 (H5-VN04) *in vitro* with high affinity (Kd~100-200 pM) and very slow dissociation rates (kd ~ 10^{-4} s^{-1}) (Fig.17).

Example 3: Kinetic characterization of the binding of HA0 (the ectodomain of HA of A/Vietnam1203/04) to D8-IgG1, F10-IgG1 and A66-IgG1 by using BIAcore T-100

Mabs were captured on a CM4 chip via anti-human IgG1, and trimeric HA0 at various concentrations (20, 10, 5, 2.5, 2.5, 1.25, 0.625 nM) was injected over the chip surface. Binding kinetics was evaluated using a 1:1 Laugmuir binding model. The recorded binding curves (with blank reference subtracted) are shown in black and the calculated curves in red. All *ka, kd, KD* represent the means and standard errors of three experiments. Using Biacore T100 and Biacore T100 evaluation software, we determined the kinetic rates and affinity constants for the three anti-HA MAbs by fitting to a 1:1 Langmuir model. As shown in the figure below, similar *ka*, *kd*, and *KD* of D8 and F10 were observed, and A66 had a 1.8 fold lower KD than 8 and 10 due to a relative faster dissociation rate than the other two antibodies. The complexes between Mabs and HA0 were stable as illustrated by a very slow dissociation rate ($8.8\pm1.1\times10^{-5}$ s^{-1} ~ $1.8\pm0.3\times10^{-4}$ s^{-1}) and high affinity binding with H5 trimer at pM level. (Figure 7)

Example 4: Prophylactic and therapeutic effect of anti-H5 antibodies

The protective efficacy of human nAbs against H5N1 and H1N1 virus infection was evaluated in a BALB/c mouse model. Mice were treated with different doses of nAb either before or after lethal viral challenge.

Prophylactic efficiacy (Figure 7 a, b, g and h). Mice were treated with anti-H5 nAbs or control mAb 24 hour before lethal challenge by intranasally (i.n.) with 10 median lethal doses (MLD_{50}) of the H5N1 or H1N1s. Intra-peritoneal (i.p.) injection of 10 mg/kg of any of the three nAbs provided complete protection of mice challenged with H5-VN04 (A/Vietnam/1203/04 (H5N1), Clade 1). A lower antibody dose (2.5 mg/kg) was also highly

protective.(Figure 7a) Prophylactic protection against H5-HK97 (A/HongKong/483/97 (H5N1), Clade 0) virus was observed in 80-100% of the mice treated with 10 mg/kg of any of the three nAbs. (Figure 7b) Any of the three nAbs (at 10 mg/kg of single injection) provided complete protection of mice challenged with H1-WSN33 (A/WSN/1933(H1N1)) viruses. (Figure 7g) D8 and F10 completely protected mice challenged with H1-PR34 (A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)) when given at 10mg/kg of single injection. A66 provided complete protection of mice when 25mg/kg of antibody was given as a single injection. (Figure 7h) Therapeutic efficacy (Figure 7c-f). Mice were inoculated with H5-VN04 and injected with nAbs at 24, 48, 72 hpi (Figure 7 c, e and f) or with H5-HK97 at 24 hpi (Figure 7 d). I.p. treatment with 15 mg/kg (a therapeutically achievable dose in humans) of any of the 3 nAbs at 24h post-inoculation (hpi) protected 80-100% of mice challenged with 10-times the MLD_{50} of either H5-VN04 or H5-HK97 virus (Figure 7c-d). Mice treated with the same dose of nAbs at 48 or 72 hpi with H5-VN04 showed similar or higher levels of protection (Figure 7 2e-f). Surviving mice in all anti-H5 nAb treatment groups remained healthy and showed minimal body weight loss over the 2-week observation period (data not shown).

Example 5: Suppression of viral titer in tissues by anti-H5 antibodies in a therapeutic animal study

The anti-viral effect of nAbs used therapeutically was further investigated by measuring virus titer 4 days post-challenge either in lungs, as an indicator of inhibition of local replication, or in spleen and brain, indicative of the systemic spread that is characteristic of H5N1 infection. The nAbs mediated a significant suppression of viral replication in lungs of H5 nAb treated mice as compared to controls when given within 48 hours of challenge (Fig. 12). Notably, two of the nAbs, D8 and F10, also showed antiviral effect when given at 72 hpi. Systemic virus spread to the brain was low in control animals, obscuring any effect of nAb treatment. However, the impact of nAb therapy on systemic spread was dramatically demonstrated by ≥1000-fold suppression of virus spread to the spleen even when the three nAbs were given within 72 hpi.

Example 6: Initial Epitope mapping of antibody D8, F10 and A66.

Various full-length wild type HA and HA mutants expressing plasmids for H5-SP33 were transfected transiently into 293T cells. 48 hours after transfection, anti-H5 antibodies (10ug/ml) were incubated with transfected 293T cells at 4 °C for 1 hour. Cells were then washed three times with PBS containing 0.5% BSA and 0.1% NaN3. For the detection of anti-H5 antibodies' binding to HA transfected cells, FITC-labeled goat anti-human IgG

(Pierce) was used as secondary antibody and incubated with cells at 4 °C for 30 min. Antibody 2A was used as a control antibody to indicate the expression of each mutant. As we can see from the table below, the epitopes for Mab D8, 1F0 and A66 are similar and they are located at positions of 307 on HA1 and 52, 59, 65, 93 on HA2. The position of these amino acids were highlighted in the crystal structure of H5 (A/Vietnam/1203/04(H5N1))

Example 7: Binding and neutralization of Cluster H1 viruses.

The cross-clade neutralization of H5N1 viruses (Figure 4) prompted testing for neutralization of other HA subtypes within the Group 1 H1 cluster (Figure 11). All three nAbs bound to cells expressing full-length H1 ((A/South Carolina/1/1918 (H1N1) ("H1-SC1918") and 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), but not a Group 2 subtype, H7 ((A/FPV/Rostock/34 (H7N1) ("H7-FP34")) (Figure 4). They also neutralized H1-SC1918- and H1-PR34-pseudotyped virus infection (Figure 4); and in addition, F10 neutralized PR34 (H1N1), A/Ohio/83 (H1N1) ("H1-OH83") and A/Ann Arbor/6/60 (H2N2) infection (Fig. 4). These results suggest that these nAbs recognize an epitope on HA that is not only highly conserved among H5 clades, but is also present on H1, H2 and H6 subtypes, and potentially subtypes within other clusters. We therefore decided to investigate the mechanism of virus neutralization in detail.

Example 8: nAbs inhibit cell fusion but not virus binding.

Two ways in which anti-HA Abs can mediate neutralization are blocking HA binding to its cellular receptor, and inhibition of virus-host membrane fusion by interfering with low-pH induced conformational changes of HA. We found that the three nAbs neither affected virus binding to cells nor inhibited haemagglutination (binding and cross-linking of red blood cells), while a mouse anti-H5 nAb, 17A2.1.2, and ferret anti-H5N1 serum, both of which inhibit haemagglutination, reduced binding to background levels.

We next tested the ability of the nAbs to inhibit fusion of host cell membranes using a model system in which 293T cells at high density were co-transfected with H5- and N1-expressing plasmids from H5-TH04. Surface-expressed viral proteins cause cells to fuse and form syncytia, which occurs spontaneously within 36-48hrs post-transfection under normal culture conditions. When nAbs were added 6hrs post-transfection and observed 36hrs later, complete inhibition of syncytia formation was observed in all 3 cases In the absence of nAbs, cells exposed briefly (3-4 minutes) to an acidic medium (pH 5) 30hrs post-transfection form extensive syncytia. The nAbs (5 μg/ml) also completely blocked syncytia formation

under these conditions (data not shown). Together, these results indicate that all three nAbs inhibit membrane fusion without interfering with receptor binding.

Example 9: Structural characterization of the nAb epitope

We next determined the epitope and mode of binding of one of the nAbs, F10, by solving the crystal structure of its scFv fragment in complex with HA (H5-VN04) at 3.2 Å resolution, and by mutagenesis. (Fig. 6 and Table 4)

In the complex, each H5 trimer binds three molecules of F10, at symmetry-related sites, burying ~1500 $Å^2$ of protein surface per antibody; the structure of H5 itself is not significantly altered by F10 binding. HA is synthesized as a single chain, HA0, that is activated by proteolytic cleavage into two subunits, HA1 and HA2. Cleavage leads to the burial of the "fusion peptide" (comprising the first ~21 residues of HA2) into the membrane-proximal stem. F10 binding occurs exclusively in this region (Fig. 6), making intimate contacts with the fusion peptide, elements of HA1 and HA2 (both of which are integral to the structure of this region) that lock the peptide into place in the neutral pH conformation, as well as the large helical hairpin of HA2 that undergoes a massive conformation change at acidic pH in order to propel the fusion peptide from its viral membrane-proximal pocket to the distal surface of the virus, where it can trigger fusion with the endosomal membrane.

The heavy chain of F10 plays the major role in H5 binding, utilizing the tips of its three complementarity-determining regions (CDRs). Each F10 molecule make contacts with both the HA1 and HA2 subunits within a single monomer of the HA trimer (Fig 6). The contact region comprises a pocket formed by part of the HA2 fusion peptide, with elements of HA1 on one side and an exposed face of helix αA of HA2 on the other (Figs. 4 and 6). A triad of antibody residues - F55 and M54 from CDR H2, and Y102 from CDR H3 - form major contact points. The phenyl ring of F55 lies across a flat surface formed by a prominent loop of the fusion peptide loop (HA2 residues DGW 19_2-21_2 (H3 numbering scheme; subscripts 1 and 2 refer to HA1 and HA2 chains)) and the aromatic side-chains of two flanking histidines (residues 18_1 and 38_1) and a tryptophan, $W21_2$, which forms the back of the pocket. The side-chain of M54 also contacts the aromatic rings of $W21_2$ and $H38_1$, as well as the side-chain of $I45_2$ from helix αA, while its main-chain carbonyl oxygen hydrogen-bonds with the side-chain of $H38_1$. Y102 inserts its side-chain into a hydrophobic crevice created by four side-chains of the αA helix, and also hydrogen-bonds to a backbone carbonyl ($D19_2$) of the fusion peptide. The CDR H1 loop makes multiple contacts with the C-terminal end of helix αA and a loop of HA1 at the base of the head region (Fig.12d,e).

In parallel, mutagenesis experiments were carried out on helix αA to help define the epitope (Fig. 6). Mutations in 3 residues that directly contact the antibody: V52A/E, N53A and I56A, significantly reduced or ablated antibody binding, while the conservative mutation, V52L, had no effect. As controls, mutations on a different exposed face of the helix, which does not contact the antibody, had no effect on antibody binding (Fig.12b-c). Thus, mutagenesis of the αA helix is fully consistent with the epitope defined crystallographically for F10. Furthermore, the other two nAbs, for which no structural data exist, showed an almost identical mutant-nAb binding profile, indicative of a closely overlapping epitope and consistent with competitive binding (Fig. 6, Fig. 9). Taken together, we conclude that all three nAbs neutralize virus by stabilizing the neutral pH conformation of HA in a region that provides the trigger (most likely release of the fusion peptide from its pocket) for conformational changes that lead to the fusogenic state.

Example 10: Structural basis of broad-spectrum neutralization

The region of HA defined by the F10 epitope is highly conserved among the 16 HA subtypes (Fig.6 and Table 5). The fusion peptide must adopt a well-defined structure, both in the neutral pH conformation and during the process of membrane fusion, and mutagenesis studies have shown that few sequence changes are tolerated. The exposed helical face of HA2 αA is also nearly invariant across both groups, presumably because it must reorganize to form the inner surface of the long trimeric coiled-coil in the fusogenic state. Thus, the requirement of these segments to adopt two very different structures in two distinct environments presumably imparts strong evolutionary constraints on the sequences, providing a clear rationale for their conservation across the 16 HA subtypes.

Crystal structures have been determined for subtypes H1, H5, and H9 from Group 1 and H3 and H7 from Group 2, and the structures fall into two distinct classes, coincident with the two groups defined by phylogenetic analysis. Further comparisons show that the two classes are also readily distinguishable at the detailed 3-dimensional level within the region defined by the F10 epitope. Sequence differences in a few key amino acids buried in the core that are characteristic of each class (e.g. at 17_1 and 111_2) lead to consistent differences in the orientation of several side-chains within the epitope, as well as the disposition of the pocket with respect to helix αA.

Within each group/class, the epitope region is highly conserved, with very few differences in a given cluster, and only a few changes, generally conservative, between clusters (e.g., at positions 18_1 and 38_1, Fig.6a). Our observation that the 3 nAbs can recognize all 4 members of the H1 cluster demonstrates that amino-acid differences at the

periphery of the epitope (such as at residue 40_I, which is K, Q or V in this cluster) may not be critical for binding.

The 10 antibodies we selected have 5 different sets of VH CDR1-3, which vary substantially in sequence and length. Nevertheless, the three key residues in CDR2 (M54, F55) and CDR3 (Y102) that insert into the pocket are conserved. The conservation of key residues within a varied CDR context may expand the range of HA subtype/cluster recognition by this group of nAbs beyond those tested here. However, it should be noted that 4 out of 6 Group 2 subtypes are glycosylated at position 38_I, which lies at the periphery of the F10 epitope. Modeling studies predict steric clashes (but only with the CDR H1 loop), which likely contributes to the observed lack of binding/neutralization of H7 viruses.

Example 11: Anti-H5 nAbs bind to a broad range of Group 1 HA subtypes

Group 1 viruses contains 10 of the total 16 subtypes of Influenza A virus, and is further classified into 3 "clusters", H1a, H1b, and H9. We tested our nAbs for binding to all seven HA subtypes of Clusters H1a and H1b, which include avian H5 as well as the most common human influenza subtypes, with the exception of the Group 2 subtype, H3. In addition to H5, we found that all three nAb IgG1s bound to cells expressing full-length H1 from 2 different strains of H1N1, including the 1918 "Spanish flu"; H2 from H2N2; and H6 from H6N2; as well as the Cluster 1b subtypes: H11 from H11N9; H13 from H13N6; and H16 from H16N3. However, none of them bound to a Group 2 subtype, H7 from H7N1 (Fig. 13). More details about Fig. 13 are as follows. FACS analysis of anti-H5 nAbs binding to H1, H2, H5, H6 (cluster H1a) and H11, H13 and H16 (Cluster H1b). 293T cells were transiently transfected with different HA-expressing plasmids. NAb binding to the cells was analyzed by FACS. H5-specific antibody 2A and 80R are negative control. Lack of binding to a Group 2 HA, H7, is also shown. Detail on viral strains are: 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)), H11-MP74 (A/Duck/memphis/546/74 (H11N9)), H13-MD77 (A/Gull/MD/704/77 (H13N6)) and H16-DE06 (A/Shorebird/DE/172/06 (H16N3)).

REFERENCES

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/summaryH520070403.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. http://www.who.int/csr/disease/influenza/influenzanetwork/en/index.html. (2008).
22. Carrat, F. & Flahault, A. Influenza vaccine: the challenge of antigenic drift. Vaccine 25, 6852-62 (2007).
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).
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).
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).
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 low-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 A 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).

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).

Table 3. Contact residues at the H5-F10 interface

	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 G20 W21	V18	Q42	Q42	D19 K38 T41 Q42 I45	D19 K38	K38

Contact residues defined by having a closest interatomic distance of < 4.5 Å. The color scheme indicates contributions of individual residues to the binding free energy: very favorable (red(V27,T28,I45,D19,W21)),
favorable (orange(S25,S291,M292,I56,V52,N53,T49,H18,V18,G20,T57,T41)), negligible (blue (S30,S31,Q40,H38), unfavorable (black), very unfavorable (bold black). Based on energy calculations using the server at http://structure.pitt.edu/servers/fastcontact[1].

Table 4. Data collection and refinement statistics.

	H5-F10
Data Collection	
Cell parameters	a=205.3, b=118.5, c=338.9 β=99.6°
Space group	C2
Resolution (Å)*	3.2(3.28-3.20)
Total reflections	509705
Unique reflections	112570
Completeness (%)*	85.0 (68.4)
Average I/σ(I)*	9.5 (2.0)
R_{MERGE} (%)*	12.8 (81.0)
Redundancy*	4.5 (4.5)
σ cutoff	-3
Refinement	
Resolution	50-3.2(3.28-3.20)
R_{WORK}*	0.23 (0.32)
R_{FREE} (5% data)*	0.29 (0.38)
RMSD bond distance (Å)	0.01
RMSD bond angle (°)	1.31
Average B value	75.7
Solvent atoms	0
σ cutoff	none
Ramachandran plot	
Residues in favored regions (%)	90.0
Residues in allowed regions (%)	9.5
Residues in outlier regions (%)	0.5

*Numbers in parentheses correspond to the highest resolution shell.

Table 5*. Sequence comparison of F10 epitope among 16 HA subtypes.

Group	Cluster	Subtype	# Full-length sequence	# Unique sequence	HA1					HA2												
					17	18	38	40	291	18	19	20	21	38	41	42	46	49	52	53	68	111
Group 1	H1a	H2	100	95	Y	H	H	(Q,E)/K (14)/77	T	(I)/V (20)/75	D	G	W	K	T	Q	(F,V)/I (39)/56	T	(S/V (1)/94	N	I	H
		H5	1020	1178	(S,T,F)/Y (4)/1174	(Y,M)/H (2)/1176	(Q,Y)/H (4)/1174	(K)/Q (2)/1176	(I,N,T,R)/S (6)/1172	(I)/V (6)/1172	(N,H,Y,X)/D (5)/1173	G	(R)/W (1)/1177	(Q,R,H)/K (23)/1155	(S)/T (3)/1175	P/Q (1)/1177	(M,L,T)/I (8)/1170	(I)/T (1)/1177	V	N	(F)/ V (1)/1177	H
		H1	1211	701	Y	H	H	(I)/V (2)/699	(S)/N 1(695)	(V,M)/I (137)/546	D	G	W	(K,R,L)/Q (69)/641	T	Q	(V)/I (2)/699	(S,N,X)/T (19)/682	(M,I)/V (2)/699	N	(V)/I (1)/700	H
		H6	278	230	Y	H	H	V	(D/N (1)/229	(V)/I (43)/187	D	G	(R)/W (1)/229	(R)/K (102)/128	T	Q	(V)/I (78)/152	(D/T (1)/229	(S/V (3)/227	N	I	H
	H1b	H13	16	16	Y	L	S	(V)/I (6)/16	N	I	N	G	W	K	T	Q	I	T	V	N	I	H
		H16	8	6	Y	L	S	(I)/V (2)/6	N	I	N	G	W	K	T	Q	I	T	V	N	I	H
		H11	64	64	Y	L	S	(I)/V (1)/64	(T)/S (1)/63	(L)/I (1)/63	N	G	W	(R)/K (5)/59	T	Q	(V)/I (3)/61	(S/T (1)/63	V	N	(I,A)/V (17)/47	H
	H9	H8	10	10	Y	Q	Q	M	S	I	D	G	W	Q	T	Q	I	T	(S/V (1)/9	N	I	H
		H12	19	18	Y	Q	Q	E	S	V	A	G	W	R	T	Q	I	Q	L	N	I	H
		H9	252	234	(I)/Y (33)/201	(L)/Q (1)/233	(D)/H (1)/233	(R,E)/K (5)/229	(I)/T (1)/233	V	(S)/A (1)/233	G	(G)/W (1)/233	(K,G)/R (14)/220	T	Q	(V,F,H,R)/I (43)/191	(S/T (1)/233	V	(S,T,D)/N (3)/231	(I)/V (56)/178	(C)/H 1/233
Group 2	H3	H4	105	90	H	H	(A)/T (1)/89	(R)/Q (1)/89	(A,I,S,N)/T (10)/82	I	D	G	(G)/W (1)/91	L	T	Q	I	(N)/T (1)/89	L	N	I	(A)/T (2)/90
		H14	2	2	H	H	S	K	D	I	D	G	W	L	T	Q	I	N	L	N	I	T
		H3	2302	1228	H	H	N	(N)/T (1)/1227	(N,Y,E,G)/D (35)/1193	(M,I,V)/I (149)/1078	(N)/D (15)/1213	G	W	(F)/L (1)/1227	T	Q	(V,T,L,I)/I (5)/1223	(D,S,T,A)/N (22)/1206	(M)/L (1)/1227	(D)/N (1)/1227	(V,T,F)/I (19)/1209	(A)/T (7)/1221
	H7	H15	8	5	H	H	N	T	P	I	D	G	W	Y	T	Q	I	T	L	N	I	A
		H7	334	273	H	H	N	T	(S,R,P)/N (131)/142	(V)/I (41)/232	(N)/D (62)/213	G	W	(H)/Y (1)/272	T	(P)/Q (2)/271	(V)/I (3)/270	T	L	N	I	(T)/A (35)/238
		H10	31	28	H	H	N	T	(E)/K (1)/27	V	(N,E)/D (2)/26	(A)/G (1)/27	W	Y	T	Q	I	T	L	N	(V)/I (1)/27	A

* This table represents sequences available in public influenza sequence databases (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/FLU.html) as of April. 17, 2008. Light blue highlights: top '( )/ ', (amino acid variant(s)) / amino acid consensus at the position; bottom '( )/ ', (number of amino acid variants)/ number of consensus amino acids. Non-highlighted amino acids are 100% conserved or variants are observed ≤ 5 times at those positions for subtypes H4, H6, H9, H10, H11. Histidines H17 (HA1) and H111 (HA2) that may play a role in pH-trigger are highlighted in green.

OTHER EMBODIMENTS

Although particular embodiments have been disclosed herein in detail, this has been done by way of example for purposes of illustration only, and is not intended to be limiting with respect to the scope of the appended claims, which follow. In particular, it is contemplated by the inventors that various substitutions, alterations, and modifications may be made to the invention without departing from the spirit and scope of the invention as defined by the claims. Other aspects, advantages, and modifications considered to be within the scope of the following claims. The claims presented are representative of the inventions disclosed herein. Other, unclaimed inventions are also contemplated. Applicants reserve the right to pursue such inventions in later claims.

CLAIMS

We claim:

1. An isolated monoclonal antibody, wherein said monoclonal antibody binds to an epitope in the stem region of the hemagglutinin (HA) protein of an influenza virus, and neutralizes influenza A virus.

2. The monoclonal antibody of claim 1, wherein said influenza virus is a Group I influenza virus.

3. The monoclonal antibody of claim 1, wherein said influenza virus is H1 cluster influenza virus.

4. The monoclonal antibody of claim 3, wherein said H1 cluster influenza virus is an H1a cluster influenza virus or an H1b cluster influenza virus.

5. The monoclonal antibody of claim 1, wherein said epitope is non-linear.

6. The monoclonal antibody of claim 1, wherein said epitope comprises the HA1and the HA2 polypeptide

7. The monoclonal antibody of claim 1, wherein the epitope comprises the amino acid at position 18, 38, 40, 291 of the HA1 polypeptide and the amino acid at position 18, 19, 20, 21, 38, 41, 42, 45, 49, 52, 53 and 56 of the HA2 polypeptide.

8. The monoclonal antibody of claim 1, wherein said monoclonal antibody inhibits viral and cell membrane fusion.

9. The monoclonal antibody of claim 1, wherein said monoclonal antibody competes with the binding of monoclonal antibody D7, D8, F10, G17, H40, A66, D80, E88, E90, or H98 to the HA protein.

10. The monoclonal antibody of claim 1 wherein said monoclonal antibody is a fully human antibody.

11. An isolated scFv antibody, wherein said antibody binds to an epitope the hemagglutinin (HA) protein of an influenza virus, and neutralizes influenza A virus.

12. The antibody of claim 11, wherein said influenza virus is a Group I influenza virus.

13. The antibody of claim 11, wherein said influenza virus is H1 cluster influenza virus.

14. The antibody of claim 13, wherein said H1 cluster influenza virus is an H1a cluster influenza virus.

15. The antibody of claim 11, wherein said epitope is non-linear.

16. The antibody of claim 11, wherein epitope comprises the HA1 and HA2 polypeptide

17. The antibody of claim 11, wherein the epitope comprises the amino acid at position 18, 38, 40, 291 of the HA1 polypeptide and the amino acid at position 18, 19, 20, 21, 38, 41, 42, 45, 49, 52, 53 and 56 of the HA2 polypeptide.

18. The antibody of claim 11, wherein said antibody inhibits viral and cell membrane fusion.

19. The monoclonal antibody of claim 11, wherein said antibody competes with the binding of monoclonal antibody D7, D8, F10, G17, H40, A66, D80, E88, E90, or H98 to the HA protein.

20. A method of preventing a disease or disorder caused by an influenza virus, the method comprising administering to a person at risk of suffering from said disease or disorder, a therapeutically effective amount of the monoclonal antibody of claim 1 or the scFv antibody of claim 11.

21. The method of claim 20, wherein the method further comprises administering an anti-viral drug, a viral entry inhibitor or a viral attachment inhibitor.

22. The method of claim 21, wherein said anti-viral drug is a neuraminidase inhibitor, a HA inhibitor, a sialic acid inhibitor or an M2 ion channel.

23. The method of claim 22 wherein said M2 ion channel inhibitor is amantadine or , rimantadine.

24. The method of claim 22, wherein said neuraminidase inhibitor is zanamivir, or oseltamivir phosphate.

25. The method of claim 20 or claim 21, wherein the method comprises administering two or more antibodies specific to a Group I influenza virus

26. The method of claim 20, claim 21 or claim 25, wherein the method further comprises administering an antibody specific to a Group II influenza virus.

27. The method of claim 20, wherein said antibody is administered prior to or after exposure to influenza virus.

28. The method of claim 20, wherein said antibody is administered at a dose sufficient to neutralize said influenza virus.

29. A method of treating a disease or disorder caused by an influenza virus, the method comprising administering to a person at risk of suffering from said disease or disorder, a therapeutically effective amount of the monoclonal antibody of claim 1 or the scFv antibody of claim 11.

30. The method of claim 29, wherein the method further comprises administering an anti-viral drug, a viral entry inhibitor or a viral attachment inhibitor.

31. The method of claim 30, wherein said anti-viral drug is a neuraminidase inhibitor, a HA inhibitor, a sialic acid inhibitor or an M2 ion channel.

32. The method of claim 31, wherein said M2 ion channel inhibitor is amantadine or , rimantadine.

33. The method of claim 31, wherein said neuraminidase inhibitor zanamivir, or oseltamivir phosphate.

34. The method of claim 29 or claim 30, wherein the method comprises administering two or more antibodies specific to a Group I influenza virus

35. The method of claim 29, claim 30 or claim 34, wherein the method further comprises administering an antibody specific to a Group II influenza virus.

36. The method of claim 29, wherein said antibody is administered prior to or after exposure to influenza virus.

37. The method of claim 29, wherein said antibody is administered at a dose sufficient to neutralize said influenza virus.

38. A composition comprising the monoclonal antibody of claim 1 or the scFv antibody of claim 11 and a carrier.

39. The composition of claim 38, further comprising an anti-viral drug, a viral entry inhibitor or a viral attachment inhibitor.

40. The composition of claim 39, wherein said anti-viral drug is a neuraminidase inhibitor, a HA inhibitor, a sialic acid inhibitor or an M2 ion channel.

41. The method of claim 40, wherein said M2 ion channel inhibitor is amantadine or , rimantadine.

42. The method of claim 40, wherein said neuraminidase inhibitor zanamivir, or oseltamivir phosphate.

43. The composition of claim 38, further comprising one or more antibodies specific to a Group I influenza virus

44. The composition of claim 38, claim 39 or claim 42, further comprising an antibody specific to a Group II influenza virus.

45. A method identifying an antibody specific for an influenza virus comprising: contacting a trimeric hemagglutinin (HA) protein, wherein said HA protein is immobilized on a solid surface with a test antibody and detecting a HA protein-antibody complex.

46. The method of claim 45 wherein said solid surface is plastic.

47. The method of claim 45, wherein said HA protein is produced in a non-mammalian cell.

48. The method of claim 45, wherein said HA protein is produced in insect cells.

49. The method of claim 45, wherein said HA protein comprising modified glycosylations compared to a wild type HA protein.

50. The method of claim 45 wherein said HA protein is immobilized on said solid surface as to mask the globular head of said HA protein.

51. A method of producing an isolated antibody that specifically binds a trimeric hemagglutinin (HA) protein, (a) exposing a single chain or Fab expression library to said HA protein wherein said HA protein is immobilized on a solid surface; (b) identifying an antibody in said library that specifically binds said protein; and (c) isolating the antibody from the library.

52. The method of claim 51, wherein said solid surface is plastic.

53. The method of claim 51, wherein said HA protein is produced in a non-mammalian cell.

54. The method of claim 51, wherein said HA protein comprising modified glycosylations compared to a wild type HA protein.

55. The method of claim 51, wherein said HA protein is immobilized on said solid surface as to mask the globular head of said HA protein.

56. The method of claim 51, wherein said expression library is a non-immune library.

57. The method of claim 51, wherein said expression library is H5 naïve library.

58. A method of vaccinating a subject against an influenza virus comprising administering to said subject an trimeric hemagglutinin (HA) protein coated or embedded in a biologically compatible matrix.

59. The method of claim 58, wherein said HA protein has non-mammalian carbohydrate structures.

60. The method of claim 58, wherein said HA protein comprising modified glycosylations compared to a wild type HA protein.

61. The method of claim 58, wherein said HA protein is coated or embedded in said biologically compatible matrix as to mask the globular head of said HA protein.

62. A method of producing an isolated antibody that specifically binds a pathogenic enveloped virus, (a) exposing a single chain or Fab expression library to a membrane fusion protein of said virus wherein said protein is immobilized on a solid surface; (b) identifying an antibody in said library that specifically binds said protein; and (c) isolating the antibody from the library.

63. The method of claim 62, wherein said solid surface is plastic.

64. The method of claim 62, wherein said membrane fusion protein is produced in a non-mammalian cell.

65. The method of claim 62, wherein said membrane fusion protein has non-mammalian carbohydrate structures.

66. The method of claim 62, wherein said membrane fusion protein comprising modified glycosylations compared to a wild type membrane fusion protein.

67. The method of claim 62, wherein said expression library is a non-immune library.

68. The method of claim 62, wherein said expression library is H5 naïve library.

69. A method of vaccinating a subject against pathogenic enveloped virus comprising administering to said subject a membrane fusion protein of said virus coated or embedded in a biologically compatible matrix.

70. The method of claim 69, wherein said fusion protein has non-mammalian carbohydrate structures.

71. The method of claim 69, wherein said fusion protein comprising modified glycosylations compared to a wild type membrane fusion protein.

72. A method of detecting the presence of an influenza virus in a sample, the method comprising:

a) contacting the sample with the monoclonal antibody of claim; and

b) detecting the presence or absence of an antibody-antigen complex,

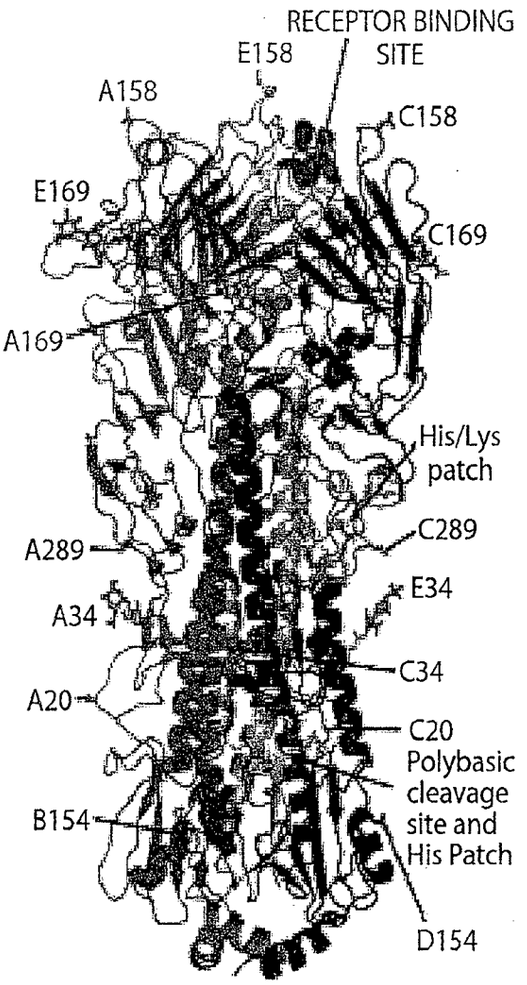
thereby detecting the presence of an influenza virus in a sample.

73. The method of claim 72, wherein the detecting occurs *in vivo*.

74. The method of claim 72, wherein the sample is obtained from blood, hair, cheek scraping, saliva, biopsy, or semen.

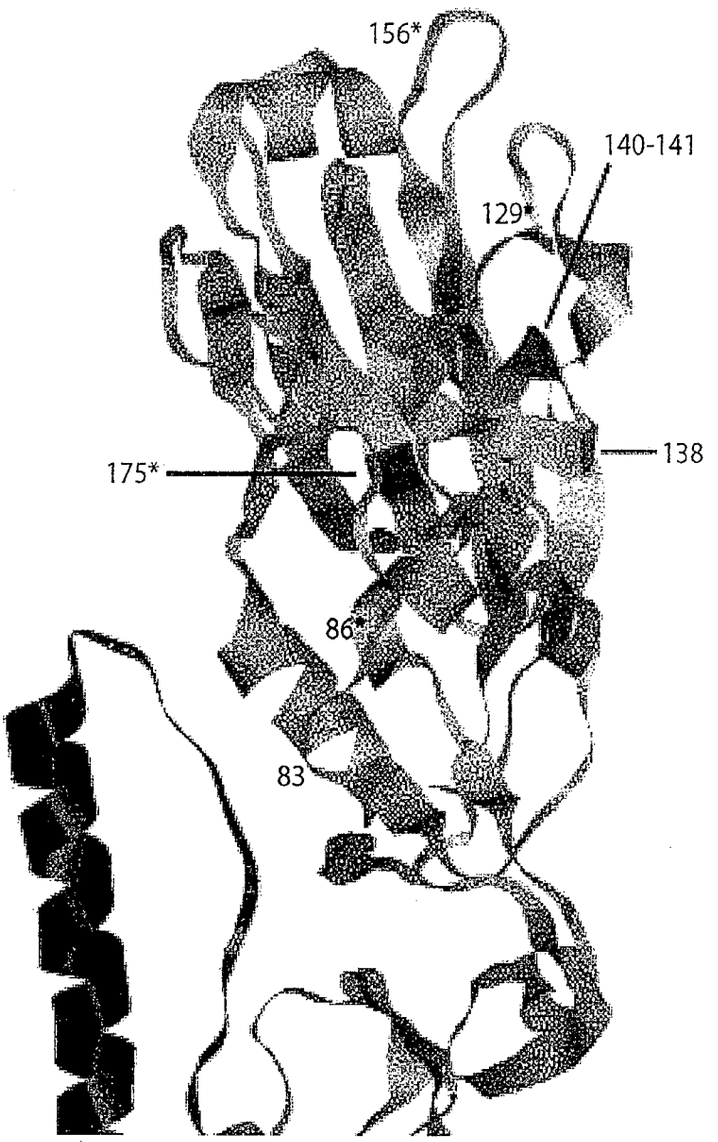
75. An isolated monoclonal antibody, wherein said monoclonal antibody comprise a VH amino acid sequence encoded by the VH germline gene IGHV1-69*01 wherein the amino acid at position: a) 27 is a valine; b) 28 is threonine; c) 30 is serine; d) 31 is

serine; e) 54 is methionine; f) 55 is phenylalanine; g) 58 is threonine; h) 100 is proloine; i) 101 is serine; j) 102 is tyrosine; k)103 is isoleucine and 105 is serine, wherein said monoclonal antibody binds to an epitope in the stem region of the hemagglutinin (HA) protein of an influenza virus, and neutralizes influenza A virus.



Structure overview of the A/Vietnam 1203/04 trimer, receptor binding site and antigenic variation sites are highlighted on the monomer (cited from Stevens, 2006).

Fig. 1A



Location of amino acid residues in the HA of H5N1 influenza viruses that are under positive selection (cited from Smith, 2006).

Fig. 1B

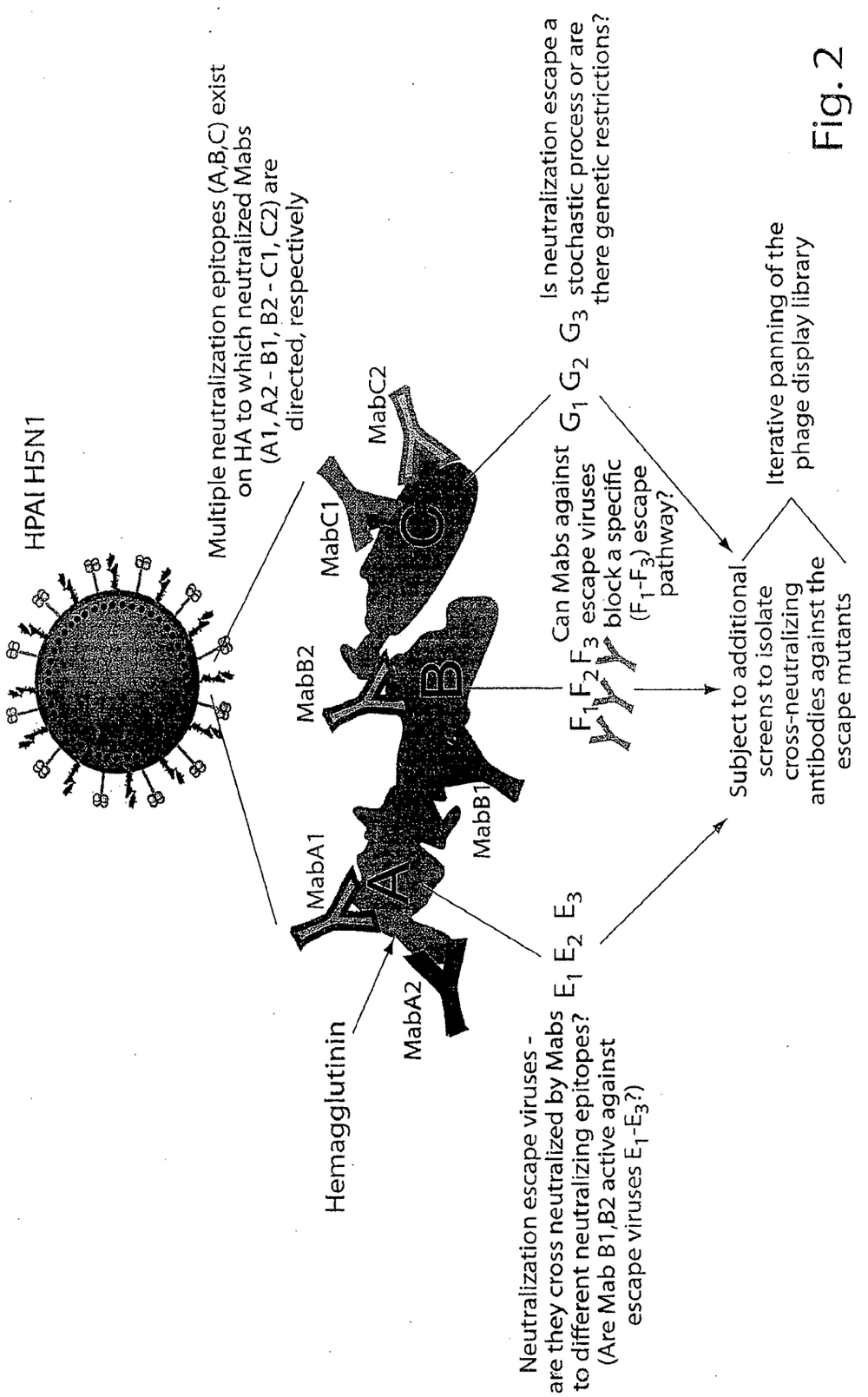

HPAI H5N1
Multiple neutralization epitopes (A,B,C) exist on HA to which neutralized Mabs (A1, A2 - B1, B2 - C1, C2) are directed, respectively
MabC2
MabC1
MabB2
MabB1
MabA1
MabA2
Hemagglutinin
Neutralization escape viruses - are they cross neutralized by Mabs to different neutralizing epitopes? (Are Mab B1,B2 active against escape viruses E_1-E_3?)
E_1 E_2 E_3
Can Mabs against F_1 F_2 F_3 escape viruses block a specific (F_1-F_3) escape pathway?
Is neutralization escape a G_1 G_2 G_3 stochastic process or are there genetic restrictions?
Subject to additional screens to isolate cross-neutralizing antibodies against the escape mutants
Iterative panning of the phage display library

Fig. 2

Amino Acid sequences of variable regions of anti-H5 mAbs

VH	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	V GENE	
Cons.	KKPGSSVKVSCKAS	GGTFSSYA	ISWVRQAPGQGLEWMGG	IIPMFGTP	NYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC	AR		WGQGTL	
IGHV	....	.GT.SS..	....	...IF.T.	.....	..----------		------	1-69
F10/E90	..........TSS	EVT.SSF.	.............L..	.S.MF.T.	.............Q..R....D.R.....	..---SPSYIGSGGTCVFDH		.....	1-69
D8/D80	....	.GT.SA..	FT..............	..GMF.TA	.............L..........T.....L...	..---GLYYYESS----FDY		.....	1-69
A66/E88	....	.GP.SMT.	FT.L............	.S.IFRT.	K.............N..N...T..K.....	..--TLSSYQPNND--AFAI		.....M	1-69
G17	....A.....T.	.VT.SS..	....	..GVF.V.	K.............KP...V....N...A.....	..---EPGYYYGKN--GFDV		.....M	1-69
D7/H98	..........P	.GI.NTN.	F.............V..	V..LFRTA	S...NV..........N.....T....A.....	..---SSGIHFRSH---FDS		..L...	1-69
H40	R...A.....	.YT.TG.Y	.H.............W	.N.MT.GT	.....VW..M.R.T.IN.....VTR.T.D.....	..GASVLRYFDWQP-EALDI		..L..T	1-2

VL	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	GENE	
Cons.	QPVLTQPPS-ASGSPGQRVTISCTGS		VAWYQQKPGQAPKLLIY		DRPSGIPDRFSGSR--SGTTASLTISGLQPEDEADYYC			FGGGTKLTVL	
D7Vλ	NFM....H.-V.A...KT.....	SGNIAANY	.Q....R..S..TTV..	EDD	R....V.....IDR.SNS.....KT.....	QTYDTNNHAV		.....H....	LV6-57
D8Vλ	.S.....-.....S.....T	SSDVGGYNS	.S....H..K....M..	EVT	K....V.....A.K--..N.....V....A.....F.	CSYAGHSAYV		..T...V...	VL2-11
F10Vλ	..G.....-V.KGLR.TA.LT...N	SNNVGNQG	A..L..HQ.HP....S.	RNN	.....SE...A..--..N.....T.....	STWDSSLSAVV		.....	LV10-54
G17Vλ	SYE.....-V.KGLR.TAILT...D	SNNVGHQG	T..L..HQ.HP....S.	RNG	N....SE...A..--..N.....I.....	SVWDSSLSAWV		.....	LV10-54
H40Vλ	.....-V.VA...TAS.P.G.N	NIGGYS--	.H.....L.V..	DDK	.....E....AN--..S..T....RVEAG..G....	QVWDSGNDRPL		.....	VL3-21
A66Vκ	EI....S.ATL.L...E.A.L..RA.	QSVSSY--	L.....R....	DAS	N.AT...A.....G--...DFT....R.E...F.V.F.	QQYGSSPQ---		..Q..R.EIK	KV3-20
D80Vκ	EI....S.GTL.L...E.A.L..RA.	QSLSSKY-	L.....R....	GAS	S.AT.....G--...DFT....R.E...F.V.S.	QQYDGVPRT--		..Q..TVEIK	KV3-20
E88Vλ	L.....-...T.....I..S..	SSNIGSNT	.N....L..T.....	SNN	Q....V.....--...S...A.I..R.....	QSYDSRLSASL		..T..TV...	LV1-44
E90Vκ	DIQM..S..SL.A.V.D....T.RA.	QSISSY--	LN.....K.....	AAS	SLQR.V.S.....G--...DFT....S.....F.V.Y.	QQYDSSPYT--		..Q...VEIK	KV1-39
H98Vλ	SYE.....-...KH.....S.G	TSNIGRNH	.N....L..T.....	SNE	Q....V.....K--...S...AV....S.....	ASWDDNLSGWV		.....	LV1-44

Framework regions 1-4 (FR1-4) and complementarity-determining regions 1-3 (CDR1-3) for VH and VL are shown. FR, CDR and gene names are defined using the IMGT database. For VH, the first 11 residues of FR1 (QVQLVQSGAEV) and last 5 residues of FR4 (VTVSS) are invariant and not shown. Dots denote identity with the consensus sequence, hyphens denote gaps. Six different VH and 10 different VL genes were found. 4 out of 6 antibodies share the same VH gene. 5 out of the 6 VH belong to one gene family, IGHV1-69*01. The VL genes are much more diverse than the VH genes, consistent with the lack of contacts observed between F10 and H5; three out of the 10 VL are k chain. The 3 VH chains used to make IgG1s are coloured red. H5 contact residues to F10 are highlighted, along with corresponding residues in other VHs, in cyan (critical residues as defined by FastContact energy calculations) and grey (other contacts < 4.5 Å).

Fig. 3

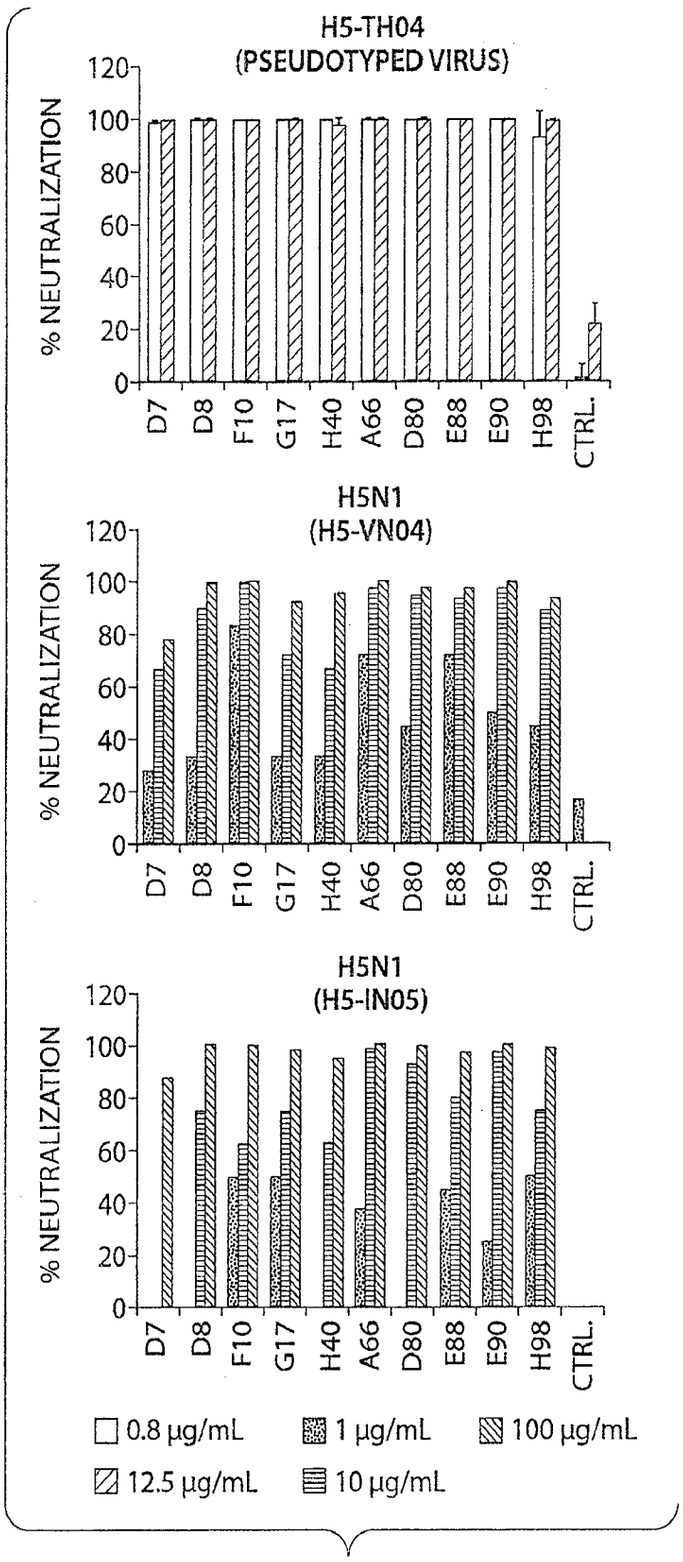

H5-TH04
(PSEUDOTYPED VIRUS)
% NEUTRALIZATION
120
100
80
60
40
20
0
D7
D8
F10
G17
H40
A66
D80
E88
E90
H98
CTRL.
H5N1
(H5-VN04)
% NEUTRALIZATION
H5N1
(H5-IN05)
% NEUTRALIZATION
0.8 µg/mL
1 µg/mL
100 µg/mL
12.5 µg/mL
10 µg/mL

Fig. 4A

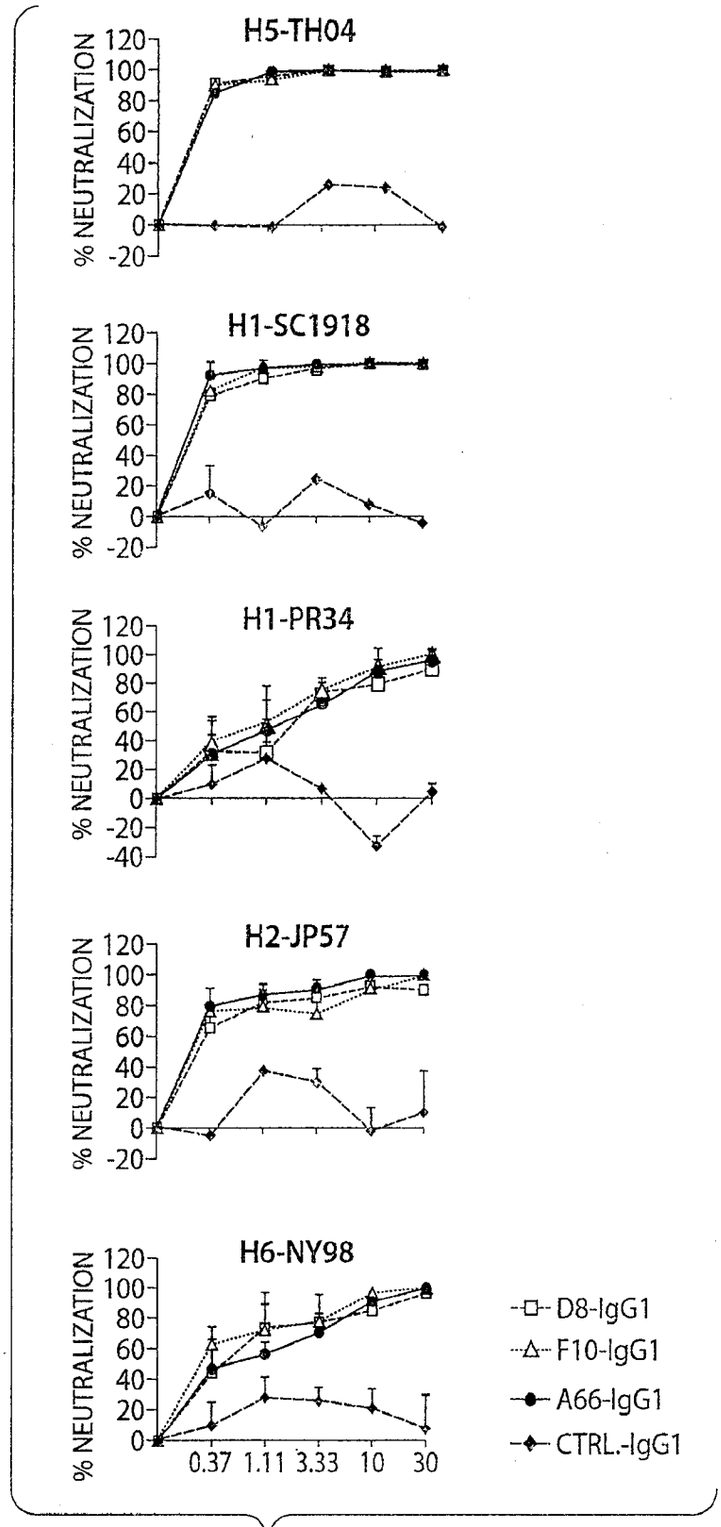

H5-TH04
H1-SC1918
H1-PR34
H2-JP57
H6-NY98
% NEUTRALIZATION
120
100
80
60
40
20
0
-20
-40
0.37 1.11 3.33 10 30
D8-IgG1
F10-IgG1
A66-IgG1
CTRL.-IgG1

Fig. 4B

VIRUS	HUMAN mAb F10	MURINE 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

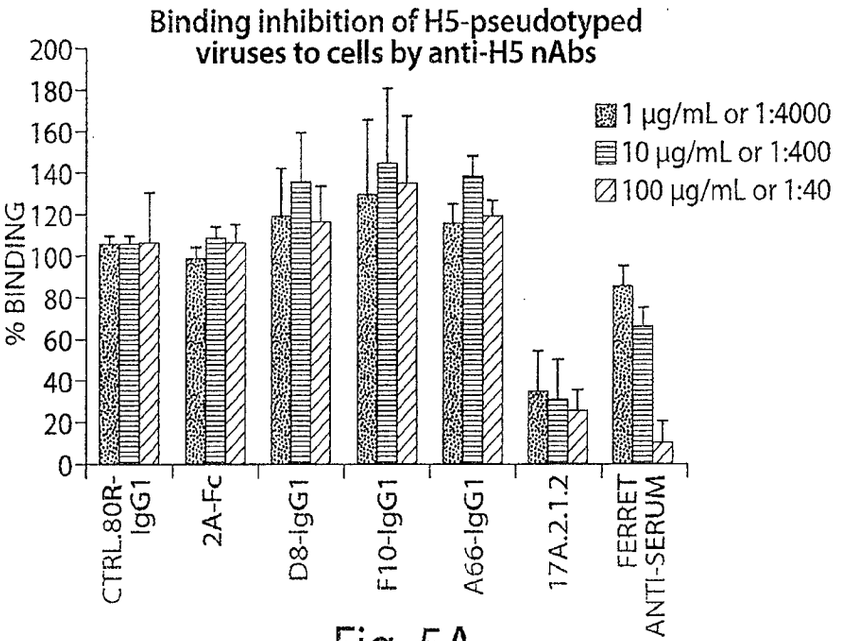

Binding inhibition of H5-pseudotyped viruses to cells by anti-H5 nAbs
% BINDING
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
1 µg/mL or 1:4000
10 µg/mL or 1:400
100 µg/mL or 1:40
CTRL.80R-IgG1
2A-Fc
D8-IgG1
F10-IgG1
A66-IgG1
17A.2.1.2
FERRET ANTI-SERUM

Fig. 5A

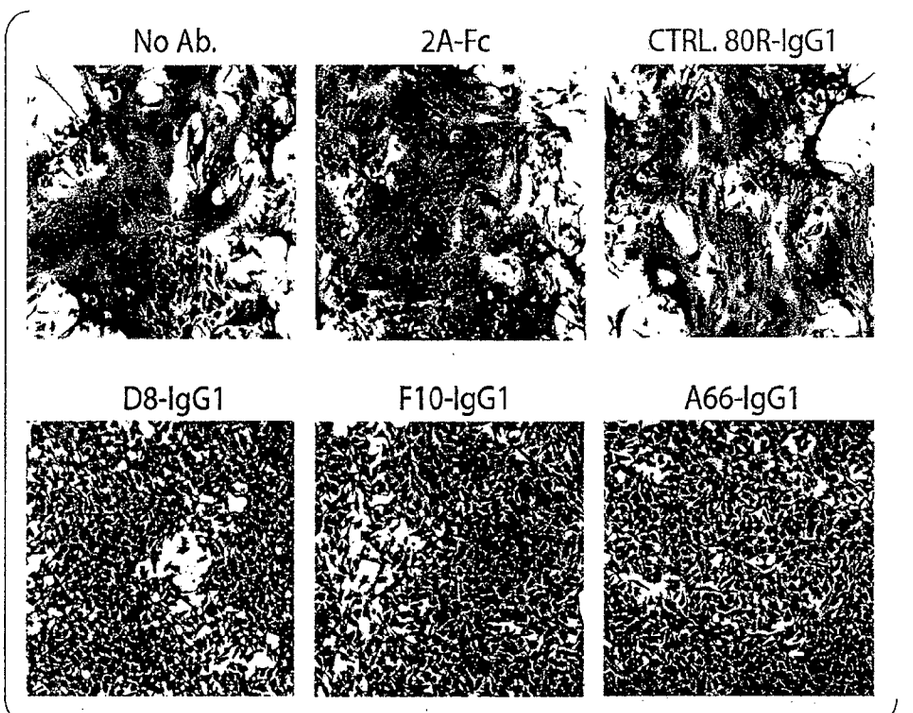

No Ab.
2A-Fc
CTRL. 80R-IgG1
D8-IgG1
F10-IgG1
A66-IgG1

Fig. 5B

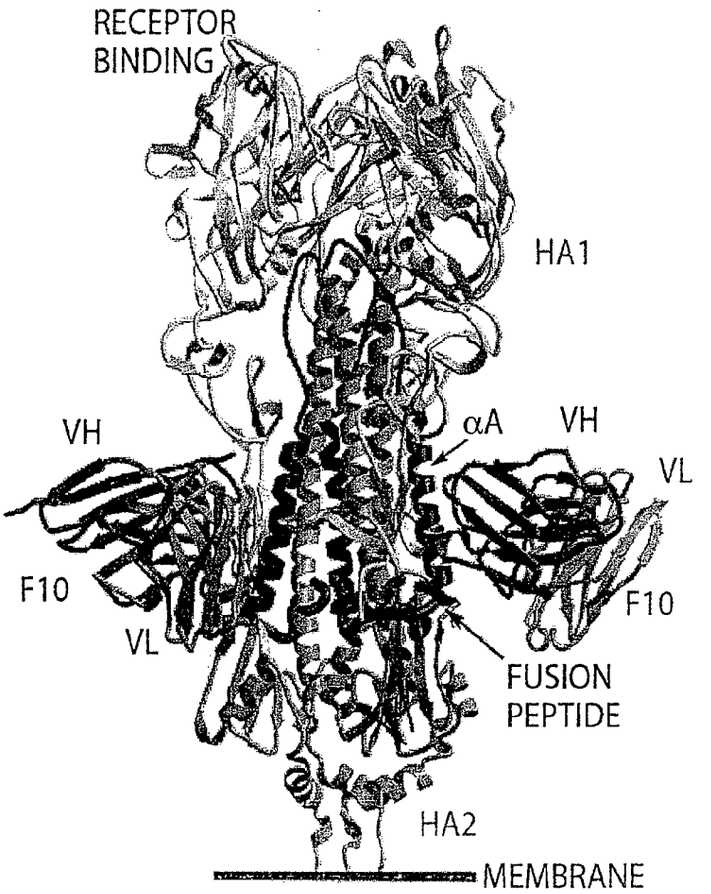

RECEPTOR
BINDING
HA1
VH
αA
VH
VL
F10
VL
F10
FUSION
PEPTIDE
HA2
MEMBRANE

Fig. 6A

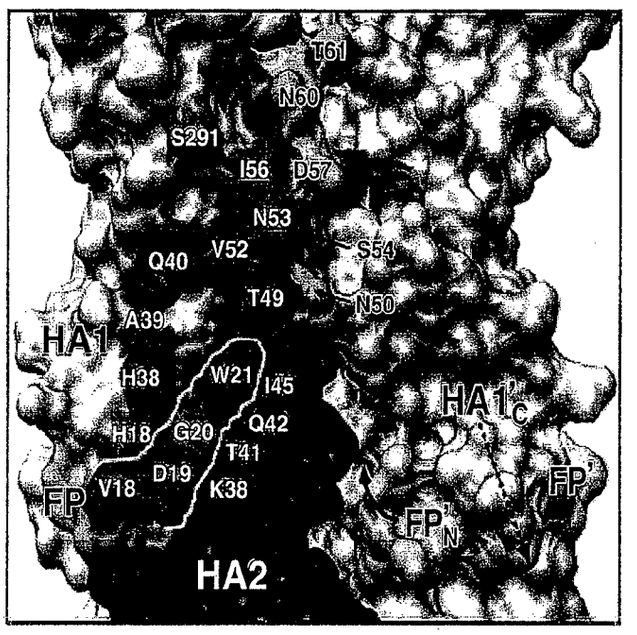

T61
N60
S291
I56
D57
N53
S54
Q40
V52
T49
N50
A39
HA1
H38
W21
I45
HA1c
H18
G20
Q42
T41
D19
V18
K38
FP
FP'
FPN
HA2

Fig. 6B

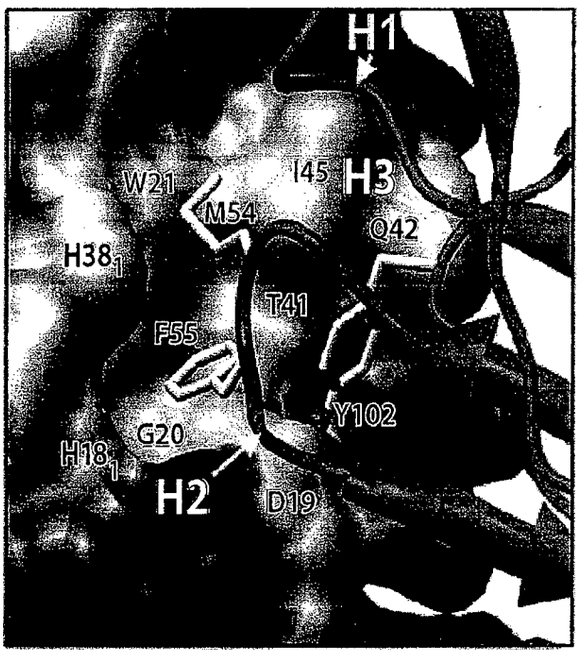

H1
W21
I45
H3
M54
O42
H38$_1$
T41
F55
Y102
G20
H18$_1$
H2
D19

Fig. 6C

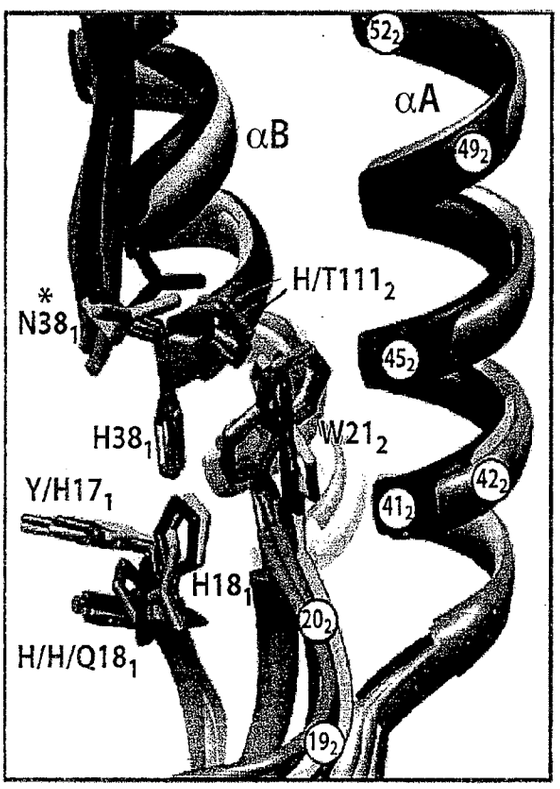

52$_2$
αA
αB
49$_2$
H/T111$_2$
*
N38$_1$
45$_2$
H38$_1$
W21$_2$
Y/H17$_1$
42$_2$
41$_2$
H18$_1$
20$_2$
H/H/Q18$_1$
19$_2$

Fig. 6D

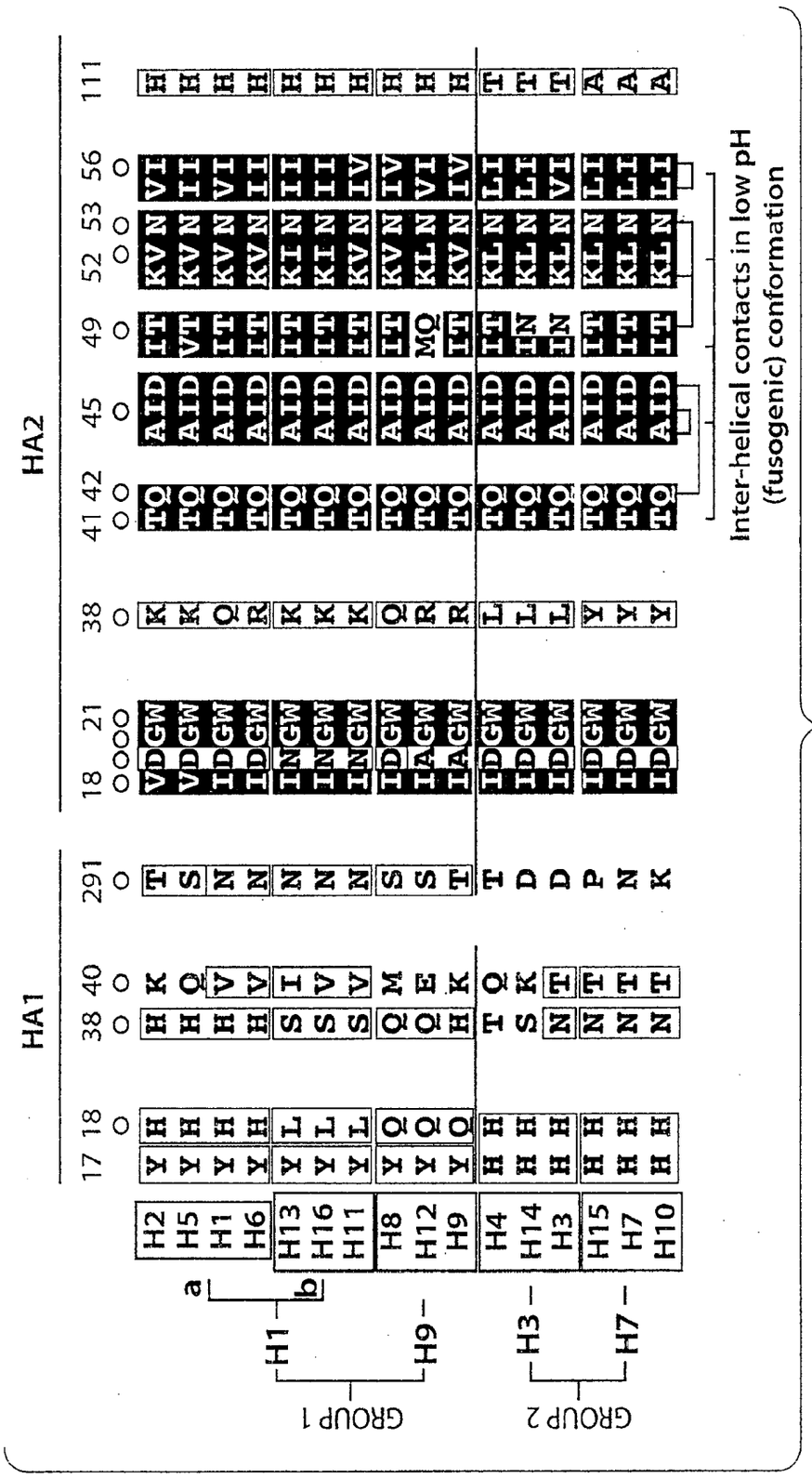

HA1
HA2
17 18 38 40 291 18 21 38 41 42 45 49 52 53 56 111
H2 H5 H1 H6 H13 H16 H11 H8 H12 H9 H4 H14 H3 H15 H7 H10
a
b
H1
H9
H3
H7
GROUP 1
GROUP 2
Inter-helical contacts in low pH (fusogenic) conformation

Fig. 6E

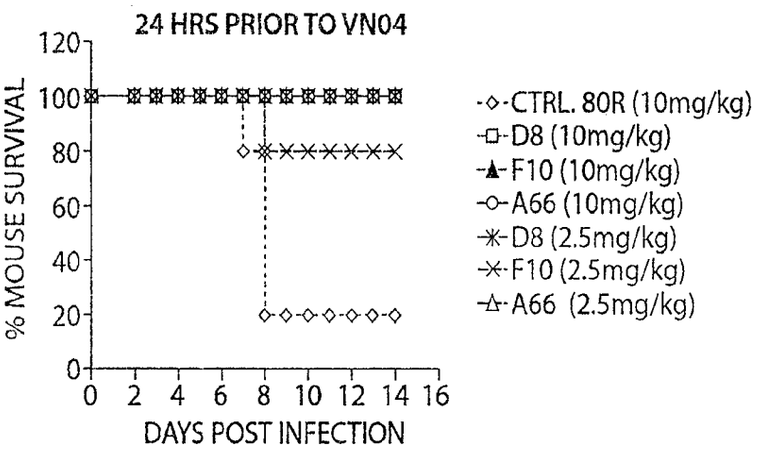


Fig. 7A

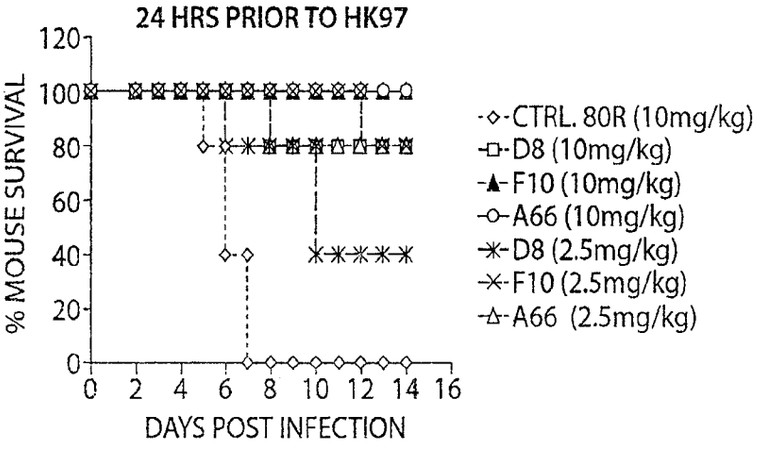


Fig. 7B

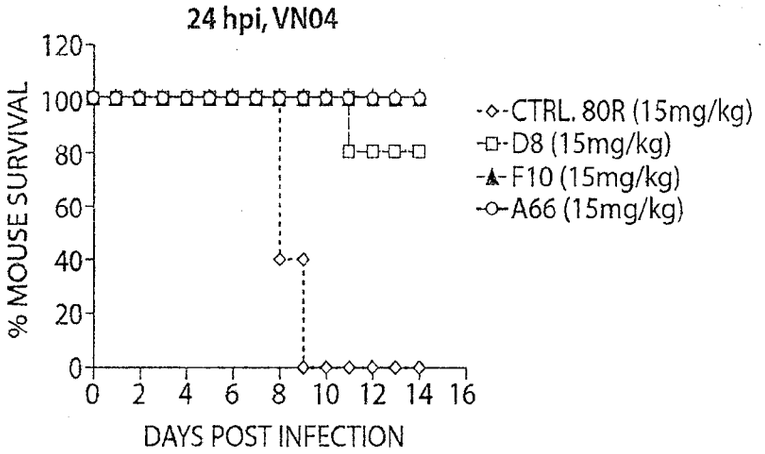


Fig. 7C

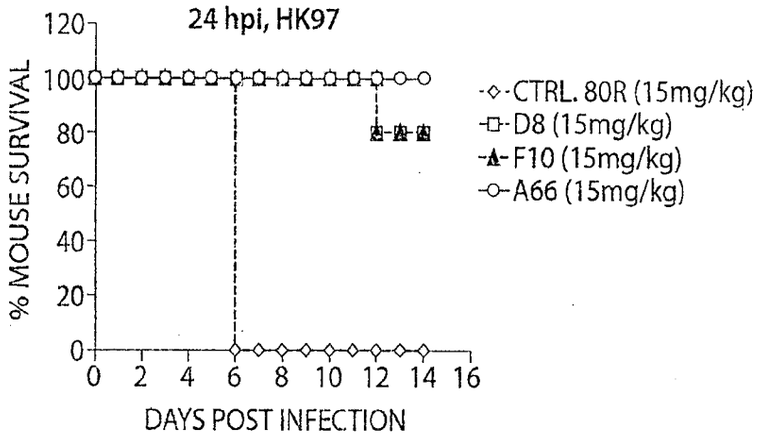


Fig. 7D

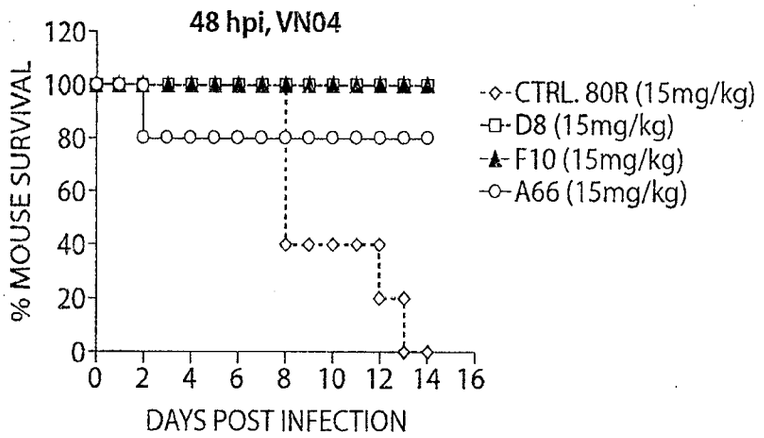


Fig. 7E

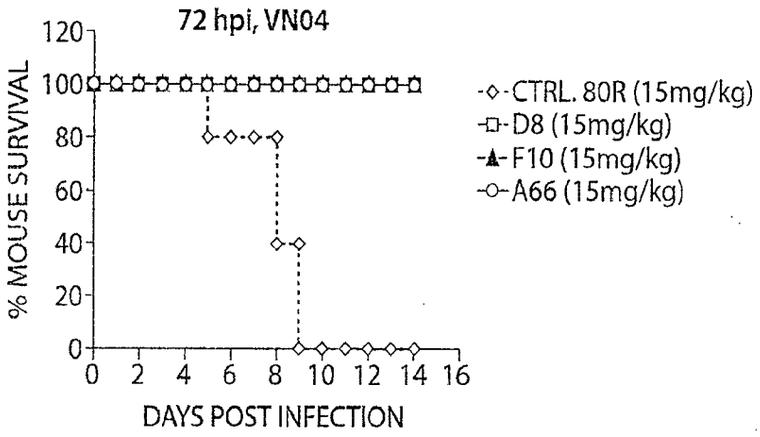


Fig. 7F

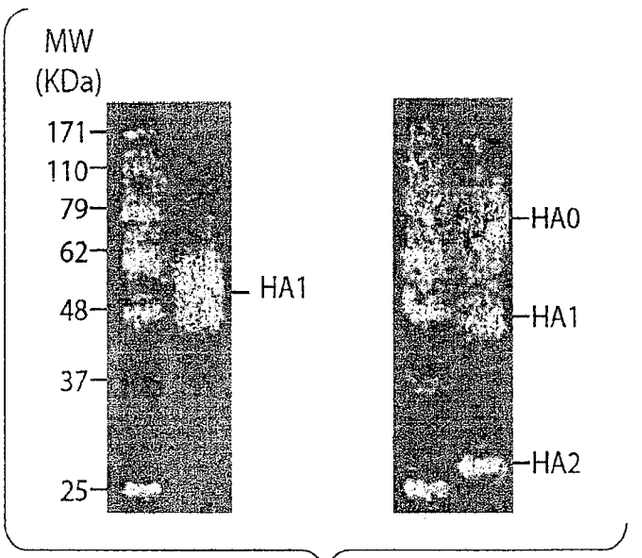

MW
(KDa)
171
110
79
62
48
37
25
HA1
HA0
HA1
HA2

Fig. 8A

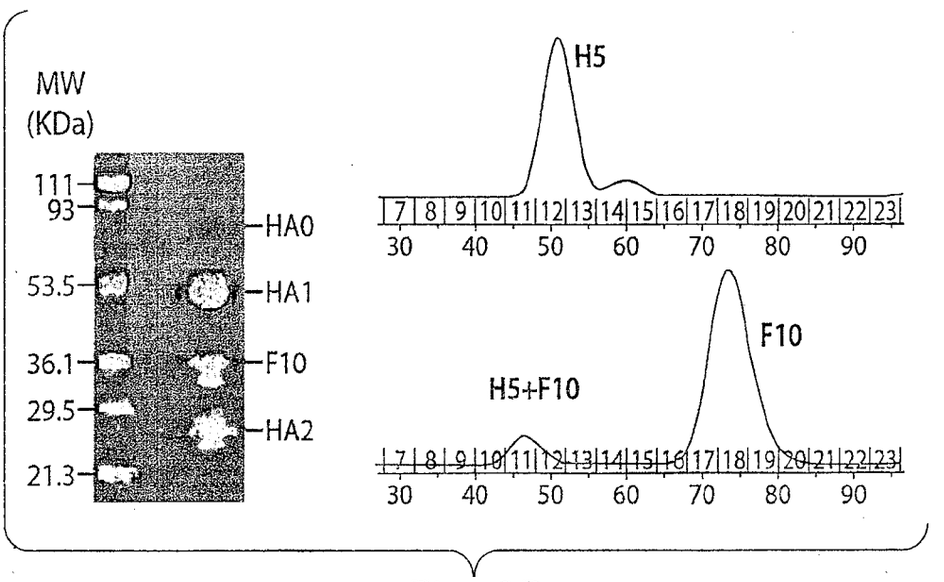

MW
(KDa)
111
93
53.5
36.1
29.5
21.3
HA0
HA1
F10
HA2
H5
7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23
30 40 50 60 70 80 90
F10
H5+F10
7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23
30 40 50 60 70 80 90

Fig. 8B

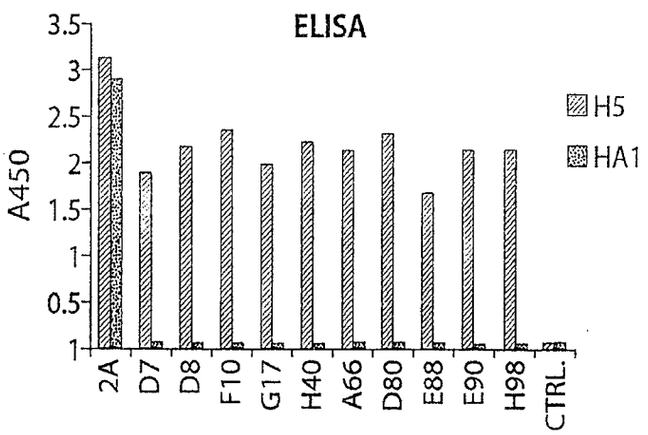

ELISA
A450
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
1
H5
HA1
2A
D7
D8
F10
G17
H40
A66
D80
E88
E90
H98
CTRL.

Fig. 9A

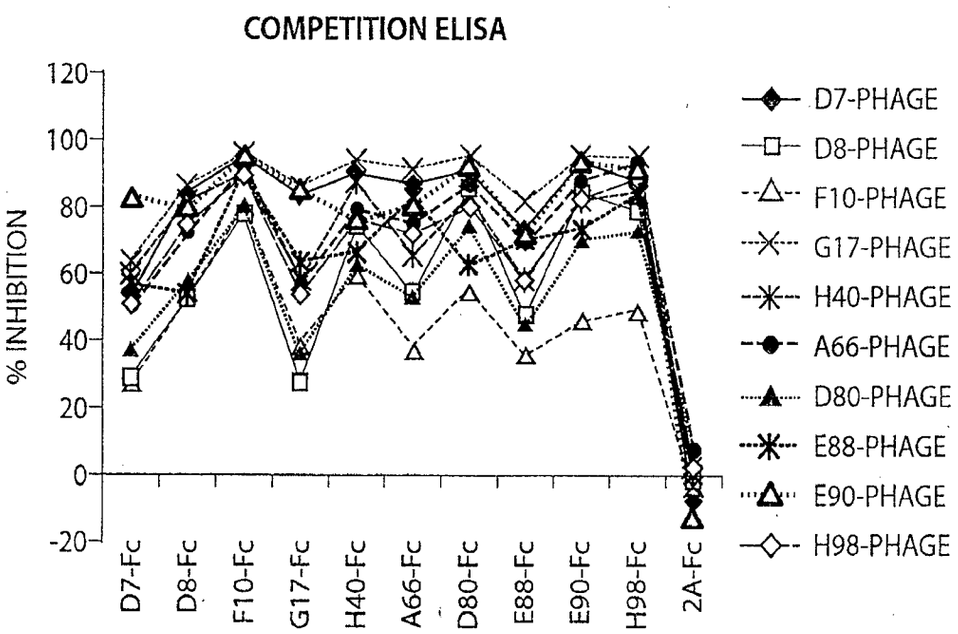
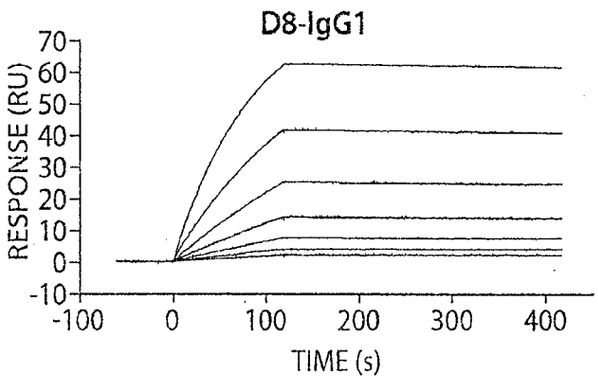
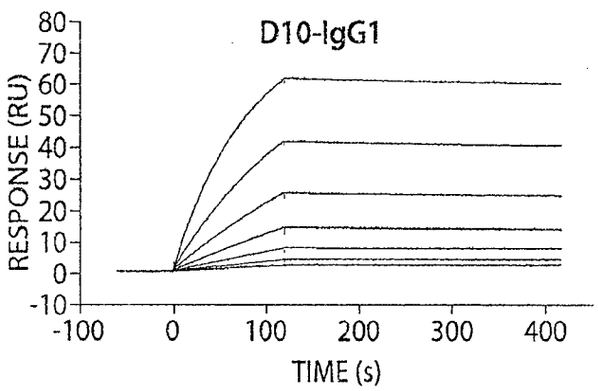
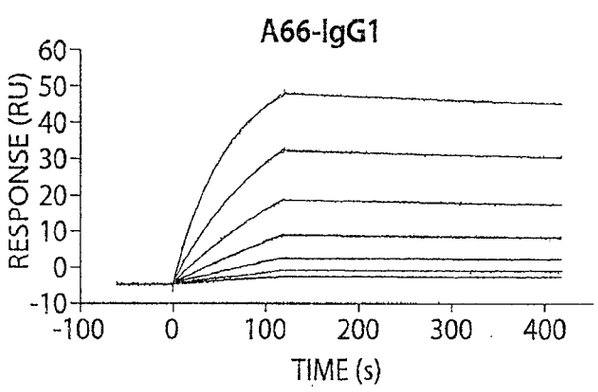

COMPETITION ELISA
% INHIBITION
120
100
80
60
40
20
0
-20
D7-Fc
D8-Fc
F10-Fc
G17-Fc
H40-Fc
A66-Fc
D80-Fc
E88-Fc
E90-Fc
H98-Fc
2A-Fc
D7-PHAGE
D8-PHAGE
F10-PHAGE
G17-PHAGE
H40-PHAGE
A66-PHAGE
D80-PHAGE
E88-PHAGE
E90-PHAGE
H98-PHAGE

Fig. 9B







$$A+B \underset{kd}{\overset{ka}{\rightleftharpoons}} AB$$

	ka (M^{-1} s^{-1} x 10^5)	*kd* (s^{-1}x10^{-4})	K_D (pM)
D8-IgG1	5.98±0.08	0.88±0.11	148±19
F10-IgG1	6.52±0.92	0.84±0.19	130±28
A66-IgG1	7.75±0.63	1.80±0.31	233±47

Fig. 10

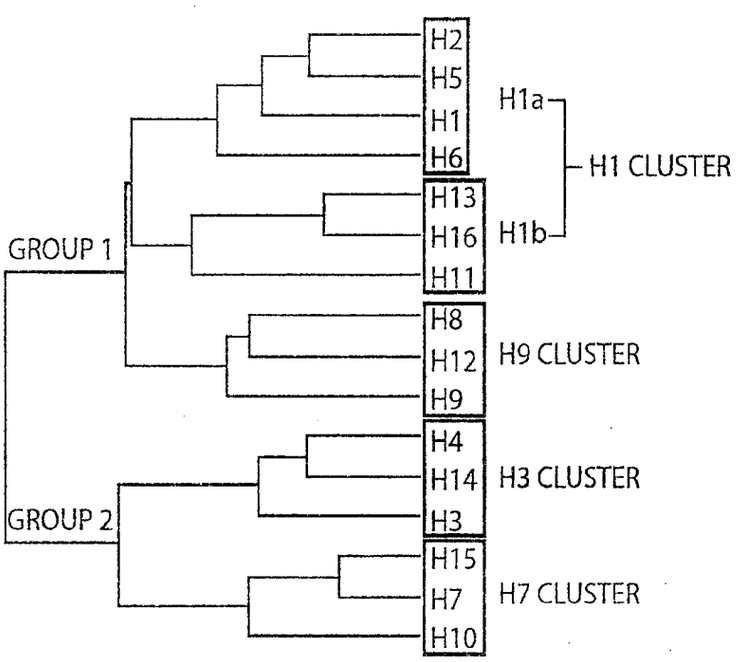

H2
H5
H1
H6
H1a
H1 CLUSTER
H13
H16
H11
H1b
GROUP 1
H8
H12
H9
H9 CLUSTER
H4
H14
H3
H3 CLUSTER
GROUP 2
H15
H7
H10
H7 CLUSTER

Fig. 11

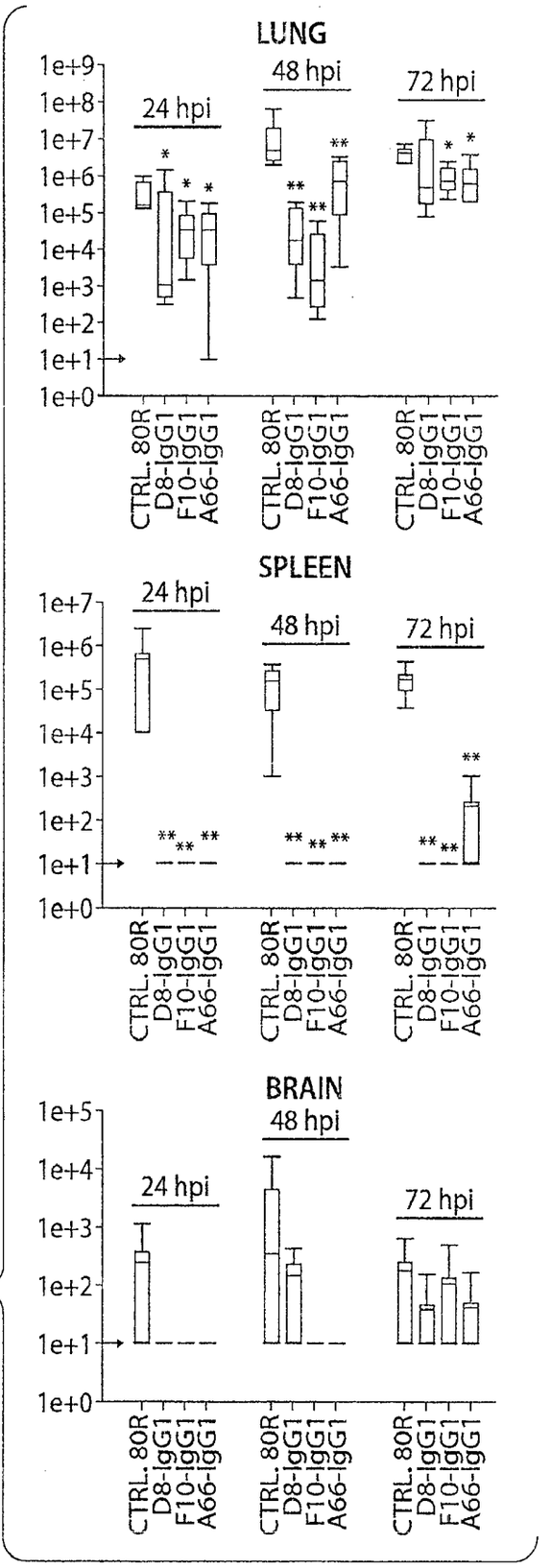

LUNG
24 hpi
48 hpi
72 hpi
1e+9
1e+8
1e+7
1e+6
1e+5
1e+4
1e+3
1e+2
1e+1
1e+0
CTRL. 80R
D8-IgG1
F10-IgG1
A66-IgG1
SPLEEN
BRAIN

Fig. 12

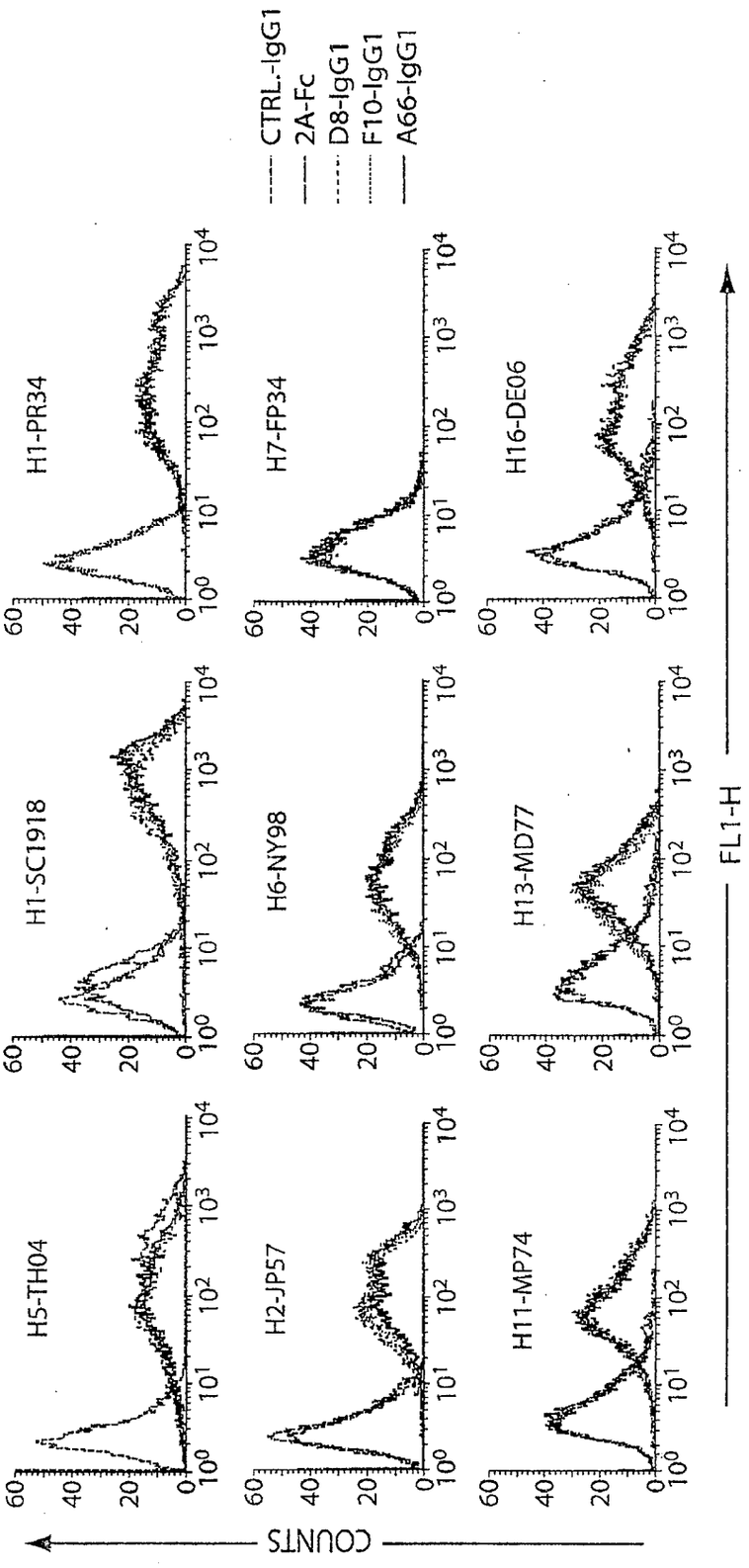

CTRL.-IgG1
2A-Fc
D8-IgG1
F10-IgG1
A66-IgG1
H1-PR34
H7-FP34
H16-DE06
H1-SC1918
H6-NY98
H13-MD77
H5-TH04
H2-JP57
H11-MP74
COUNTS
FL1-H

Fig. 13

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> 20363-049001WO

<140> PCT/US 2008/085876
<141> 2008-12-08

<150> 61/005,725
<151> 2007-12-06

<150> 61/091,599
<151> 2008-08-25

<160> 102

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 369
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 1
caggtgcagc tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60

tcctgcaagg cttctggagg caccttcagt gacaatgcta tcagctgggt gcgacaggcc 120

ccaggacaag ggcttgagtg gatgggggggc atcattccta tctttggaaa accaaactac 180

gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt actgcggacg aatccacgag cacagcctac 240

atggacctga ggagcctgag atctgaggac acggccgttt attactgtgc gagagattca 300

gacgcgtatt actatggttc ggggggtatg gacgtctggg gccaaggcac 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

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 tgggatcctc ggtcaagctc 60

acctgcactc tgagcagtgg gcatagtaac tacatcatcg catggcatca acagcagcca 120

gggaaggccc ctcggtactt gatgaaggtt aatagtgatg gcagccacac caaggggac 180

gggatccctg atcgcttctc aggctccagc 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 tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60

tcctgcaagg ctcctggagg tatcttcaac accaatgctt tcagctgggt ccgacaggcc 120

cctggacaag gtcttgagtg ggtgggaggg gtcatccctt 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 tggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60

tcctgcaagg ctcctggagg tatcttcaac accaatgctt tcagctgggt ccgacaggcc 120

cctggacaag gtcttgagtg ggtgggaggg gtcatccctt 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

<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 tggggtccct 180

gatcggttct ctggctccat cgacaggtcc tccaactctg cctccctcac catctcagga 240

ctgaagactg aggacgaggc tgactactac tgtcagactt atgataccaa caatcatgct 300

gtgttcggag gaggcaccca 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
85 90 95

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 tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60

tcctgcaagg 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 ccctggtcac 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 tggtgcagtc 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 ccctggtcac 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

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 tgacgttggt ggttataact ctgtctcctg gtaccaacag 120

cacccaggca aagcccccaa actcatgatt tatgaggtca 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

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 ttgcagtgta ttcctgtcag 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 tggtgcagtc 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 aacctgcgtc tttgaccatt 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 aacctgcgtc tttgaccatt 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

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 ttactgctca 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

<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 tggtgcaatc 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

tcttca 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 accctcggtg 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

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 tggtgcagtc tggggctgag gtgaggaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60

tcatgtaagg cttctggata caccttcacc ggttattata ttcactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag gacttgagtg gatgggttgg atcaacccta tgactggtgg cacaaactat 180

gcacagaagt ttcaggtctg ggtcaccatg acccgggaca cgtccatcaa cacagcctac 240

atggaggtga gcaggctgac atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gaggggggct 300

tccgtattac gatattttga ctggcagccc gaggctcttg atatctgggg cctcgggacc 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

<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 tcaggtgtgg 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
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

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

<400> 37
caggtgcagc tggtgcagtc tggggctgaa gtgaagaagc ctggctcctc ggtgaaggtt 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 gccaagggac aatggtcacc 360

gtctcttca 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 gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120

ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag actggagcct 240

gaagattttg cagtctattt ctgtcagcag tatggtagct cacctcaatt cggccaaggg 300

acacgactgg agattaaa 318

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

<400> 40
caggtgcagc tggtgcagtc tggggctgaa gtgaagaagc ctggctcctc ggtgaaggtt 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 gccaagggac aatggtcacc 360

gtctcttca 369

<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

ttcggaactg ggaccacggt caccgtcctc 330

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

<220>
<223> 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

<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> 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
1 5 10 15

Gly

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

<400> 54

Gly Ile Ser Pro Met Phe Gly Thr Pro Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

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

<400> 55

Gly Ile Ile Gly Val Phe Gly Val Pro Lys Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

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

<400> 56

Trp Ile Asn Pro Met Thr Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Val

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

<400> 57

Gly Ile Ser Pro Ile Phe Arg Thr Pro Lys Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 58
<211> 17

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 58

Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Lys Pro Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

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

<220>
<223> 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

<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> 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

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

137

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> Consensus Sequence

<400> 79

Ser Asn Ser Asp Arg Pro Ser
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
<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> 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
<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

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

<400> 102

Glu Thr Trp Asp Thr Lys Ile His Val
1 5

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

APLICACIONES RELACIONADAS

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.

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.

CAMPO DE LA INVENCION

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

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

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 epítopos 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 INVENCIÓN

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. Embales 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 epítopo en la región del tallo de la proteína hemaglutinina (HA), como los polipéptidos HA1 o HA2. El epítopo es no-lineal.

Opcionalmente, el epítopo comprende tanto el HA-1 como el HA-2. El epítopo es no-lineal. En algunas materializaciones el epítopo 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 epítopo 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 nucléico 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 provista por la invención es un anticuerpo de proteína hemaglutinina monoclonal anti-influenza o fragmento del mismo, donde el anticuerpo tiene una región V_H CDR1 que tiene la secuencia de aminoácido SYAFS, TNAFS, AYAFT, SFAIS, SYAIS, GYYIH, MTAFT, o DNAIS; una región V_H CDR2 que tiene la secuencia de aminoácido GIIPMFGTPNYAQKFQG, GVIPLFRTASYAQNVQG, GIIGMFGTANYAQKFQG, GISPMFGTPNYAQKFQG, GIIGVFGVPKYAQKFQG, WINPMTGGTNYAQKFQV, GISPIFRTPKYAQKFQG, o GIIPIFGKPNYAQKFQG; una región V_H CDR3 que tiene la secuencia de aminoácido SSGYYYGGGFDV, SSGYHFGRSHFDS, GLLYYYESSLDY, SPSYICSGGTCVFDH, EPGYYVGKNGFDV, GASVLRYFDWQPEALDI, TLSSYQPNNDAFAI, o DADAYYYGSGGMDV; región V_L CDR1 que tiene la secuencia de aminoácido TGSSSNIGNYVA, TGSSSNIAANYVQ, TGTSSDVGGYNSVS, TGNSNNVGNQGAA, TGDSNNVGHQGTA, GGNNIGGYSVH, RASQSVSSYLA, RASQSLSSKYLA, TGSSSNIGNYVA, SGSSSNIGSNTVN, TASQSISSYLN, o TLSSGHSNYIIA; región V_L CDR2 que tiene la secuencia de aminoácido SNSDRPS, EDDRRPS, EVTKRPS, RNNDRPS, RNGNRPS, DDKDRPS, DASNRAT, GASSRAT, SNNQRPS, AASSLQR, SNEQRPS, o VNSDGSHTKGD y/o región V_L CDR3 que tiene la secuencia de aminoácido QSYDSLSAYV, QSYDTNNHAV, CSYAGHSAYV, STWDSSLSAVV, SVWDSSLSAWV, QVWDSGNDRPL, QQYGSSPQV, QQYDGVPRT, QSYDSRLSASL, QQYDSSPYT, ASWDDNLSGWV, o ETWDTKIHV.

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 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 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 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 ionico 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 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-antigeno, 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, 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 epítopo en la región de tallo de HA. Usando el trimero H5 ectodominio expresado en baculoviridae que produce manosas N-glycans mas cortas y sin cambios absorbidas en una superficie plástica, permitida para la

presentación dominante del epítopo 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 patogénico envuelto por la exposición de una cadena simple o expresión Fab de coleccione a una proteína de fusión de membrana del virus, identificando un anticuerpo en la coleccione que específicamente enlaza dicha proteína; y aislando el anticuerpo de la coleccione. Preferiblemente, la proteína de fusión es inmovilizada en una superficie solida, p.e. plástico. En varios aspectos la proteína de fusión tiene 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 una proteína de fusión de membrana (p.e., una proteína cubierta de hemaglutinina de trímero (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 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 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 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 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 combinación convergente para H5N1.

La figura 3 es una ilustración que muestra una comparación de secuencia de aminoácido de las marcos de trabajo de regiones 1-4 (FR1-4) y las regiones complementarias-determinantes 1-3 (CDR1-3) para el VH y VL de los anticuerpos anti-influenza de la invención.. Regiones FR y CDR se definen utilizando base de datos Kabat. Los nombres de gen de VH y VL son mostrados a la derecha (utilizando una base de datos IMGT). Los puntos muestran la identidad de secuencia a la secuencia de consenso. Los guiones representan espacios.

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 $80R^{16}$ 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. Titers 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

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 epítopo H5-F10, y conservación secuencial/estructural. (a) Estructura del trímero H5 enlazado a F10 (scFv). H5 es muy similar a la estructura des compleja[21] (pares RMSD (Ca) = 1.0 y 0.63 Å para 2 trímeros independientes). HA1, HA2, la hélice-αA de HA2, el "péptido de fusión" (FP), y F10 (VH y VL) son codificados con color. El tercer F10 está escondido detrás del tallo. Nótese que VL no hace contacto con H5. (b) Superficie de la región de tallo central. Un monómero esta coloreado por cadena; el sendero de FP a través del epítopo (rojo) se delinea; mutaciones que no afectan el enlace están en cyan. El péptido de fusión (FP y FP') es visible en dos monómeros. Residuos de epítopo están etiquetados con blanco (HA2) o amarillo (HA1). (c) Acercamiento del epítopo mostrando la punta de F10 (cinta roja) y lados de cadena CDR seleccionados. De 1500 $Å^2$ superficie enterrada en la interfaz, 43% involucra interacciones hidrofóbicas. (d) Sobreposición de subtipos HA: H1, H5 y H9 (Grupo 1) en sombras de rojo/amarillo (1RU7, 2IBX y 1JSD); H3 y H7 (Grupo 2) en sombras de azul (1MQL and 1TI8). RMSDs para pares sobrepuestos son 0.56±0.11 Å (rango observado, Grupo 1); 0.75 Å (Grupo 2); y 1.21±0.12 Å entre grupos. Diferencias consistentes entre grupos incluye la orientación de $W21_2$, que está ligado a dirección alterna de lado de cadena a 18_1 y 38_1, el entierro de la tirosina más larga (Grupo 1) versus histidina (Grupo 2) a 17_1, y el paquete de entierro $His111_2$ (Grupo 1) contra $W21_1$. Otros residuos de epítopos son indicados por círculos blancos. $N38_1$ es glicosilada en H3 y el conjunto H7. (e) Secuencias de los 16 subtipos HA. Los círculos indican energías de enlace calculadas: fuerte=azul, intermedia=naranja; débil=azul; no favorable=negro. El resaltado de color indica conservación de secuencia entre conjuntos y grupos. La red de

contactos inter-hélices que estabilizan la estructura[29] fusogénica están indicados debajo de las secuencias.

La figura 7 muestra la eficacia profiláctica y terapéutica de anti-H5 nAbs en 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 (MLD_{50}) de los H5N1 o H1N1s. (a) Injección intra-peritonea (i.p.) de 10 mg/kg de cualquiera de los tres 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) 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 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 MLD_{50} 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. (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 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 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) 10^{12} 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 detectar phage-scFvs enlazado a H5. mAb 2A-Fc no compitió por el epítopo 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.

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 *ka*, *kd* 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: 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/GermanyIN49), H11 (A/duck/England/56), H12 (A/duck/Alberta/60/76), H13 (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 infección i.n. con 10 MLD_{50} 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 25º al 75º 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 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 especifico. 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 embrago, 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 vinculo disulfudico 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 ribonucleoproteinico al citoplasma. En contraste con HA1, la molécula HA2 representa una parte relativamente conservada de HA. Una segunda proteína inmunogenética de la influenza es neuraminidasa (NA). Esta glicoproteína tetramerica 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 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 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 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 celular por anticuerpos anti-HA2 ha sido reportada.

Hace más de dos décadas, la molécula HA del subtipo H3 fue caracterizada por la secuenciamiento 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 en H1, H2 y H5 de un virus aviar patogénico 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 patogénicas, 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 evolución[36]. 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 trasmisión 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 vestigual. 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 epítopos; lugar 1: un giro expuesto (HA1 140-145) que se sobrepone al lugar antigénico A de H3 y Ca2 de H^2; 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 16 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 coleccione 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 coleccione nacidos antes de 1968, subtipos H2. La recurrencia de este segmento de línea germen VH, lo común de la tirosina CDR3 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 epítopo es significativa. Esto eleva la posibilidad que con una exposición adecuada del epítopo F10 identificado aquí, estos nAbs de 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 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 Figura 4.

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 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 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 TTCCTATCTTTGGAAAACCAAACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACG ATTACTGCGGACGAATCCACGAGCACAGCCTACATGGACCTGAGGAGCCTGA GATCTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCGAGAGATTCAGACGCGTATTA CTATGGTTCGGGGGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGCACCCTGGTCACCGT CTCCTCA
Cadena V_L de 2A (SEQ ID NO:3)
CTGCCTGTGCTGACTCAATCATCCTCTGCCTCTGCTTCCCTGGGATCCTCGGT CAAGCTCACCTGCACTCTGAGCAGTGGGCATAGTAACTACATCATCGCATGG CATCAACAGCAGCCAGGGAAGGCCCCTCGGTACTTGATGAAGGTTAATAGTG ATGGCAGCCACACCAAGGGGGACGGGATCCCTGATCGCTTCTCAGGCTCCA GCTCTGGGGCTGACCGCTACCTCACCATCTCCAACCTCCAGTCTGAGGATGA GGCTAGTTATTTCTGTGAGACCTGGGACACTAAGATTCATGTCTTCGGAACTG GGACCAAGGTCTCCGTCCTCAG

Tabla 1B. Anticuerpo 2A Región Variable secuencia de aminoácido
Cadena V_H de 2A (SEQ ID NO:2)
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSDNAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPI FGKPNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMDLRSLRSEDTAVYYCARDSDAYYYGSG GMDVWGQGTLVTVSS
Cadena V_L de 2A (SEQ ID NO:4)
LPVLTQSSSASASLGSSVKLTCTLSSGHSNYIIAWHQQQPGKAPRYLMKVNSDGS

HTKGDGIPDRFSGSSSGADRYLTIS
NLQSEDEASYFCETWDTKIHVFGTGTKVSVL

Tabla 1C. Anticuerpo D7 Región Variable secuencia de ácido nucléico
Cadena V_H de D7 (SEQ ID NO:5)
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCG
GTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTCCTGGAGGTATCTTCAACACCAATGCTTTCAG
CTGGGTCCGACAGGCCCCTGGACAAGGTCTTGAGTGGGTGGGAGGGGTCAT
CCCTTTGTTTCGAACAGCAAGCTACGCACAGAACGTCCAGGGCAGAGTCACC
ATTACCGCGGACGAATCCACGAACACAGCCTACATGGAGCTTACCAGCCTGA
GATCTGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAAGTAGTGGTTACCATTTT
AGGAGTCACTTTGACTCCTGGGGCCTGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
Cadena V_L de D7 (SEQ ID NO:9)
AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCGGCGTCTCCGGGGAAGACGG
TGACCATCTCCTGCACCGGCAGCAGTGGCAACATTGCCGCCAACTATGTGCA
GTGGTACCAACAACGTCCGGGCAGTGCCCCCACTACTGTGATCTATGAGGAT
GACCGAAGACCCTCTGGGGTCCCTGATCGGTTCTCTGGCTCCATCGACAGGT
CCTCCAACTCTGCCTCCCTCACCATCTCAGGACTGAAGACTGAGGACGAGGC
TGACTACTACTGTCAGACTTATGATACCAACAATCATGCTGTGTTCGGAGGAG
GCACCCACCTGACCGTCCTC

Tabla 1D. Anticuerpo H98 Región Variable secuencia de ácido nucléico

Cadena V_H de H98 (SEQ ID NO:7)
CAGGTGCAGCTGGTGCAATCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCG GTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTCCTGGAGGTATCTTCAACACCAATGCTTTCAG CTGGGTCCGACAGGCCCCTGGACAAGGTCTTGAGTGGGTGGGAGGGGTCAT CCCTTTGTTTCGAACAGCAAGCTACGCACAGAACGTCCAGGGCAGAGTCACC ATTACCGCGGACGAATCCACGAACACAGCCTACATGGAGCTTACCAGCCTGA GATCTGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAAGTAGTGGTTACCATTTT AGGAGTCACTTTGACTCCTGGGGCCTGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
Cadena V_L de H98 (SEQ ID NO:11)
TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGAAACACGGGCAGAGG GTCACCATCTCTTGTTCTGGAGGCACCTCCAACATCGGACGTAATCATGTTAA CTGGTACCAGCAACTCCCAGGAACGGCCCCCAAACTCCTCATCTATAGTAAT GAACAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAATCTGGCA CCTCCGCCTCCCTGGCCGTGAGTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTA TTACTGTGCATCATGGGATGACAACTTGAGTGGTTGGGTGTTCGGCGGAGGG 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 LFRTASYAQNVQGRVTITADESTNTAYMELTSLRSADTAVYYCARSSGYHFRSHF 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 CCTGGGTGCGGCAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGCATCA CCGGAATGTTTGGCACAGCAAACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCAC GATTACCGCGGACGAACTCACGAGCACAGCCTACATGGAGTTGAGCTCCCTG ACATCTGAAGACACGGCCCTTTATTATTGTGCGAGAGGATTGTATTACTATGA GAGTAGTCTTGACTATTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAG
Cadena V_L de D8 (SEQ ID NO:17)
CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCCGCGTCCGGGTCTCCTGGACAGTCAG TCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTCTGTC TCCTGGTACCAACAGCACCCAGGCAAAGCCCCCAAACTCATGATTTATGAGG TCACTAAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGATCGCTTCTCTGCCTCCAAGTCTGG

CAACACGGCCTCCCTGACCGTCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGATGAGGCTGA TTATTTCTGCTGCTCATATGCAGGCCACAGTGCTTATGTCTTCGGAACTGGGA CCAAGGTCACCGTCCTG

Tabla 1G. Anticuerpo D80 Región Variable secuencia de ácido nucléico
Cadena V_H de D80 (SEQ ID NO:15)
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCG GTGAAGGTCTCCTGCAGGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCGCTTATGCTTTCA CCTGGGTGCGGCAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGCATCA CCGGAATGTTTGGCACAGCAAACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCAC GATTACCGCGGACGAACTCACGAGCACAGCCTACATGGAGTTGAGCTCCCTG ACATCTGAAGACACGGCCCTTTATTATTGTGCGAGAGGATTGTATTACTATGA GAGTAGTCTTGACTATTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAG
Cadena V_K de D80 (SEQ ID NO:19)
GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAA GAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTCTTAGCAGCAAGTACTTAGC CTGGTATCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCA TCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGG ACAGACTTCACCCTCACCATCAGTAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTA TTCCTGTCAGCAGTATGATGGCGTACCTCGGACGTTCGGCCAAGGGACCACG 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)
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSAYAFTWVRQAPGQGLEWMGGIT GMFGTANYAQKFQGRVTITADELTSTAYMELSSLTSEDTALYYCARGLYYYESSL DYWGQGTLVTVSS
Cadena V_L de D8 (SEQ ID NO:14)
QSVLTQPPSASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNSVSWYQQHPGKAPKLMIYEVT KRPSGVPDRFSASKSGNTASLTVSGLQAEDEADYFCCSYAGHSAYVFGTGTKVT VL
Cadena V_K de D80 (SEQ ID NO:16)
EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSLSSKYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSR ATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYSCQQYDGVPRTFGQGTTVEIK

Tabla 1I. Anticuerpo F10 Región Variable secuencia de ácido nucléico
Cadena V_H de F10 (SEQ ID NO:21)
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCG GTGAAGGTCTCCTGCACGTCCTCTGAAGTCACCTTCAGTAGTTTTGCTATCAG CTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGCTGGGAGGGATCAG CCCTATGTTTGGAACACCTAATTACGCGCAGAAGTTCCAAGGCAGAGTCACCA TTACCGCGGACCAGTCCACGAGGACAGCCTACATGGACCTGAGGAGCCTGA

GATCTGAGGACACGGCCGTGTATTATTGTGCGAGATCTCCTTCTTACATTTGT TCTGGTGGAACCTGCGTCTTTGACCATTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCG TCTCCTCA
Cadena V_L de F10 (SEQ ID NO:25)
CAGCCTGGGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCCAAGGGCTTGAGACAGACC GCCACACTCACCTGCACTGGGAACAGCAACAATGTTGGCAACCAAGGAGCAG CTTGGCTGCAGCAGCACCAGGGCCACCCTCCCAAACTCCTATCCTACAGGAA TAATGACCGGCCCTCAGGGATCTCAGAGAGATTCTCTGCATCCAGGTCAGGA AACACAGCCTCCCTGACCATTACTGGACTCCAGCCTGAGGACGAGGCTGACT ATTACTGCTCAACATGGGACAGCAGCCTCAGTGCTGTGGTATTCGGCGGAGG GACCAAGCTGACCGTCCTA

Tabla 1J. Anticuerpo E90 Región Variable secuencia de ácido nucléico
Cadena V_H de E90 (SEQ ID NO:23)
CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCG GTGAAGGTCTCCTGCACGTCCTCTGAAGTCACCTTCAGTAGTTTTGCTATCAG CTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGCTGGGAGGGATCAG 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)
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCTSSEVTFSSFAISWVRQAPGQGLEWLGGISPM FGTPNYAQKFQGRVTITADQSTRTAYMDLRSLRSEDTAVYYCARSPSYICSGGTC VFDHWGQGTLVTVSS
Cadena V_L de F10 (SEQ ID NO:20)
QPGLTQPPSVSKGLRQTATLTCTGNSNNVGNQGAAWLQQHQGHPPKLLSYRNN DRPSGISERFSASRSGNTASLTITGLQPEDEADYYCSTWDSSLSAVVFGGGTKLT VL
Cadena V_L de E90 (SEQ ID NO:22)
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQR GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQYDSSPYTFGQGTKVEIK

Tabla 1L. Anticuerpo G17 Región Variable secuencia de ácido nucléico
Cadena V_H de G17 (SEQ ID NO:29)
CAGGTGCAGCTGGTGCAATCTGGGGCTGAAGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCA GTGAAGGTCTCCTGCAAGACTTCTGGAGTCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAG TTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCAT CGGTGTCTTTGGTGTACCAAAGTACGCGCAGAACTTCCAGGGCAGAGTCACA ATTACCGCGGACAAACCGACGAGTACAGTCTACATGGAGCTGAACAGCCTGA GAGCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAGCCCGGGTACTACG TAGGAAAGAATGGTTTTGATGTCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTC TTCA
Cadena V_L de G17 (SEQ ID NO:31)
TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCCAAGGGCTTGAGACAGACCG CCATACTCACCTGCACTGGAGACAGCAACAATGTTGGCCACCAAGGTACAGC TTGGCTGCAACAACACCAGGGCCACCCTCCCAAACTCCTATCCTACAGGAAT GGCAACCGGCCCTCAGGGATCTCAGAGAGATTCTCTGCATCCAGGTCAGGAA ATACAGCCTCCCTGACCATTATTGGACTCCAGCCTGAGGACGAGGCTGACTA CTACTGCTCAGTATGGGACAGCAGCCTCAGTGCCTGGGTGTTCGGCGGAGG GACCAAGCTGACCGTCCTA

Tabla 1M. Anticuerpo G17 Región Variable secuencia de aminoácido
Cadena V_H de G17 (SEQ ID NO:24)
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGVTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIGV FGVPKYAQNFQGRVTITADKPTSTVYMELNSLRAEDTAVYYCAREPGYYVGKNG FDVWGQGTMVTVSS

Cadena V_L de G17 (SEQ ID NO:26)
SYELTQPPSVSKGLRQTAILTCTGDSNNVGHQGTAWLQQHQGHPPKLLSYRNG NRPSGISERFSASRSGNTASLTIIGLQPEDEADYYCSVWDSSLSAWVFGGGTKLT VL

Tabla 1N. Anticuerpo H40 Región Variable secuencia de ácido nucléico
Cadena V_H de H40 (SEQ ID NO:33)
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAGGAAGCCTGGGGCCTCA GTGAAGGTCTCATGTAAGGCTTCTGGATACACCTTCACCGGTTATTATATTCA CTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGACTTGAGTGGATGGGTTGGATCAA CCCTATGACTGGTGGCACAAACTATGCACAGAAGTTTCAGGTCTGGGTCACC ATGACCCGGGACACGTCCATCAACACAGCCTACATGGAGGTGAGCAGGCTGA CATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGGGGGGCTTCCGTATTACG ATATTTTGACTGGCAGCCCGAGGCTCTTGATATCTGGGGCCTCGGGACCACG GTCACCGTCTCCTCA
Cadena V_L de H40 (SEQ ID NO:35)
CAGCCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGGCCCCAGGACAGACG GCCAGCATTCCCTGTGGGGGGAACAACATTGGAGGCTACAGTGTACACTGGT ACCAACAAAAGCCGGGCCAGGCCCCCCTCTTGGTCATTTATGACGATAAAGA CCGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCGCCAACTCTGGGAGCAC GGCCACCCTGACAATCAGCAGGGTCGAAGCCGGGGATGAGGGCGACTACTA CTGTCAGGTGTGGGATAGTGGTAATGATCGTCCGCTGTTCGGCGGAGGGAC CAAGCTGACCGTCCTA

Tabla 1O. Anticuerpo H40 Región Variable secuencia de aminoácido
Cadena V_H de H40 (SEQ ID NO:28)
QVQLVQSGAEVRKPGASVKVSCKASGYTFTGYYIHWVRQAPGQGLEWMGWINP MTGGTNYAQKFQVWVTMTRDTSINTAYMEVSRLTSDDTAVYYCARGASVLRYFD 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 GTGAAGGTTTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCCCCTTCAGCATGACTGCTTTCA CCTGGCTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGTGGGATCA 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 PIFRTPKYAQKFQGRVTITADESTNTANMELTSLKSEDTAVYYCARTLSSYQPNN DAFAIWGQGTMVTVSS
Cadena V_K de A66 (SEQ ID NO:34)
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA TGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYFCQQYGSSPQFGQGTRLEIK

5

Tabla 1R. Anticuerpo E88 Región Variable secuencia de ácido nucléico
Cadena V_H de E88 (SEQ ID NO:40)
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAAGTGAAGAAGCCTGGCTCCTCG GTGAAGGTTTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCCCCTTCAGCATGACTGCTTTCA CCTGGCTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGTGGGATCA

GCCCTATCTTTCGTACACCGAAGTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCAC GATTACCGCGGACGAATCCACGAACACAGCCAACATGGAGCTGACCAGCCTG AAATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAACCCTTTCCTCCTACCA ACCGAATAATGATGCTTTTGCTATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCT CTTCA
Cadena V_L de E88 (SEQ ID NO:42)
CTGCCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGG GTCACCATCTCTTGTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTAATACTGTAAA CTGGTACCAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACTCCTCATCTATAGTAAT AATCAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAGGTCAGGCA CCTCAGCCTCCCTGGCCATCATTGGACTCCGGCCTGAGGATGAAGCTGATTA TTACTGTCAGTCGTATGACAGCAGGCTCAGTGCTTCTCTCTTCGGAACTGGGA 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.

Tabla 2

Anticuerpo	**CDR1**	**CDR2**	**CDR3**
CONSENSUS	SYAFS (SEQ ID NO: 43)	GIIPMFGTPNYAQKFQG (SEQ ID NO: 51)	SSGYYYGGGFDV (SEQ ID NO: 59)
07/H98VH	TNAFS (SEQ ID NO: 44)	GVIPLFRTASYAQNVQG (SEQ ID NO: 52)	SSGYHFGRSHFDS (SEQ ID NO: 60)
08/D80VH	AYAFT (SEQ ID NO: 45)	GIIGMFGTANYAQKFQG (SEQ ID NO: 53)	GLYYYESSLDY (SEQ ID NO: 61)
F10/90VH	SFAIS (SEQ ID NO: 46)	GISPMFGTPNYAQKFQG (SEQ ID NO: 54)	SPSYICSGGTCVFDH (SEQ ID NO: 62)
G17VH	SYAIS (SEQ ID NO: 47)	GIIGVFGVPKYAQKFQG (SEQ ID NO: 55)	EPGYYVGKNGFDV (SEQ ID NO: 63)
H40VH	GYYIH (SEQ ID NO: 48)	WINPMTGGTNYAQKFQ (SEQ ID NO: 56)	GASVLRYFDWQPEALDI (SEQ ID NO: 64)
A66VH	MTAFT (SEQ ID NO: 49)	GISPIFRTPKYAQKFQG (SEQ ID NO: 57)	TLSSYQPNNDAFAI (SEQ ID NO: 65)
2AVH	DNAIS (SEQ ID NO: 50)	GIIPIFGKPNYAQKFQG (SEQ ID NO: 58)	DSDAYYYGSGGMDV (SEQ ID NO: 66)

CONSENSUS	TGSSSNIGNYVA (SEQ ID NO: 67)	SNSDRPS (SEQ ID NO: 79)	QSYDSLSAYV (SEQ ID NO: 91)
D7VL	TGSSSNIAANYVQ (SEQ ID NO: 68)	EDDRRPS (SEQ ID NO: 80)	QSYDTNNHAV (SEQ ID NO: 92)
DD8VL	TGTSSDVGGYNSVS (SEQ ID NO: 69)	EVTKRPS (SEQ ID NO: 81)	CSYAGHSAYV (SEQ ID NO: 93)
F10VL	TGNSNNVGNQGAA (SEQ ID NO: 70)	RNNDRPS (SEQ ID NO: 82)	STWDSSLSAVV (SEQ ID NO: 94)
G17VH	TGDSNNVGHQGTA (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 menso 200 mM pueden también ser efectivos terapéuticamente.

Neutralización de H5N1 con anticuerpos anti-influenza.

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 (Figura 6)

Caracterización de los epítopos 8, 10 y 66.

El mapeo primario de epítopos de 8, 10 y 66 enlazados a la proteína hemaglutinina (HA) de influenza mostraron que los epítopos de estos tres anticuerpos eran similares y ubicados en posiciones 307 en HA1 y en posiciones 52, 59, 65 y 93 en HA2. Este epítopo 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 epítopo nAb

El epítopo 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 ~1500 $Å^2$ 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 acido 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 (Figs. 4 y 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 19_2-21_2 (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 18_1 y 38_1) y un triptófanom $W21_2$, que forma la parte posterior del bolsillo. La cadena-lateral de M54 también contacta los anillos aromáticos de $W21_2$ y $H38_1$, así como la cadena-lateral de $I45_2$ de la hélice αA, mientras su cadena-principal enlaces-carbonilo oxígeno hidrógeno con la cadena-lateral de $H38_1$. Y102 inserta su cadena-lateral en una grieta hidrofóbica creada por cuatro cadenas-laterales de la hélice αA, y también enlaces-hidrogeno a una columna carbonilo ($D19_2$) 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 (Fig.12d,e).

En paralelo, experimentos de mutagénesis fueron llevados a cabo en la hélice αA para ayudar a definir el epítopo (Fig. 6). Mutaciones en 3 residuos que 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. 12b-c). Por lo tanto la mutagénesis del la hélice αA es completamente consistente con el epítopo 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 epítopo con sobre posición cercana y consistente con enlace competitivo (Fig. 6, Fig. 9). Tomados juntos, concluimos que todos los tres 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.

Anticuerpos

Como se usa aquí, el termino "anticuerpo" se refiere a moléculas de inmunoglobina y porciones activas inmunológicamente de moléculas de inmunoglobina (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 molecula 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 humnas 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 relaciones 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 IgG_1, IgG_2, 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". CDRs para las regiones V_H y V_L de los anticuerpos 11A y 256 se muestran en la figura 1 y la figura 6 respectivamente.

Como se usa aquí, el término "epítopo" 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 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 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 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, 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 epítopo de influenza cuando el equilibrio de la constante de enlace (K_d) es ≤1 μM, preferiblemente ≤100 nM, más preferiblemente ≤ 10 nM, y más preferiblemente ≤ 100 pM, como es medido por ensayos como los ensayos de enlace radioligand o 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, epítopo.

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 epítopo 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 derivativos, 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 principalmente la fracción IgG de un suero inmune. Subsecuentemente, o alternativamente, el antígeno específico que es el objetivo de la inmunoglobulina buscada, o un epítopo 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 ((The Scientist, publicado por The Scientist, Inc., Philadelphia PA, Vol. 14, No. 8 (April17, 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 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 epítopo particular de los antígenos 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 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 fuentes mamíferas no humanas son necesitadas. Los linfocitos son entonces fusionados con una línea de células inmortalizadas utilizando un agente de fusión adecuado, como él 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 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 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.

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 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 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 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 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 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 convencionales de purificación de inmunoglobulina como, por ejemplo, proteína Sefarosa-A, cromatografía hidroxiapatita, 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 hibridomas 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 homólogas (*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 Xenomouse™ 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.

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 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 epítopo clínicamente relevante en un inmuno gen, y un método correlativo para seleccionar un anticuerpo que se enlace inmuno específicamente al epítopo 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 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 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 cromosomalicos, no cromosomalicos 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 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 (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 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 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.

El vector puede ser utilizado para dirigirse a esencialmente cualquier célula destino. Por ejemplo, la inyección estereotáxica 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 disúlfidos 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 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 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 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 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* 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 enzimaticamente 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 enzimaticamente activas y fragmentos de las mismas que 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 modecína A, alpha-sarcina, proteínas Aleurites fordii, proteínas diantinas, proteínas Phytolaca americana (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor 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 variedad de agentes de acoplamiento de proteína bifuncionales como N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithiol) propionate (SPDP), iminothiolane (IT), derivativos bifuncionales de imidoesters (como dimethyl adipimidate HCL), esters activos

(como disuccinimidyl suberate), aldehydes (como glutareldehyde), compuestos bis-azido (como bis (p-azidobenzoyl) hexanediamine), derivados de bis-diazonium (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 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-succinimidyloxycarbonyl-alpha-methyl-alpha-(2-pridyl-dithio)-toluene (Pierce Chem. Co., Cat. (21558G); (iii) SPDP (succinimidyl-6 [3-(2-pyridyldithio) propionamido]hexanoate (Pierce Chem. Co., Cat #21651G); (iv) Sulfo-LC-SPDP (sulfosuccinimidyl6 [3-(2-pyridyldithio)-propianamide] 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 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 disulfide, son en general, menos estables que otros enlazantes porque él 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 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 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 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.

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 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 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 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 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 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 de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbelliferone, fluorescein, fluorescein isothiocyanate, rhodamine, dichlorotriazinylamine flourescein, 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 ^{3}H.

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 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.

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 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 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

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 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 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, 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 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

interfacial, por ejemplo, hydroxymethylcellulose o micro cápsulas de gelatina y micro cápsulas poly-(methylmethacrylate), 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. 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, copolimeros de ácido ácido-glicólico láctico degradable como el LUPRON DEPOT™ (micro esferas inyectables impuestas de copolimero 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 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 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

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 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 genomica 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 inmuno absorbente 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. Christopoulus, 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 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 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. 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 subcutáneas, orales (*p.e.*, inhalación), trasdérmicas (*p.e.*, topicas), 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 antibacteriales como alcohol bencílico o methyl parabens; antioxidantes como ácido ascórbico o bisulfato de sodio; agentes quelantes como el ácido ethylenediaminetetraacetico (EDTA); tampones como acetatos, citratos o fosfatos, y agentes para el ajuste de tonicidad como clorídeo de sodio o dextrosa. El pH puede ser ajustado con ácidos o bases, así como el ácido hidroclórico o el hidróxido de sodio. La preparación parenteral puede ser contenida en ampolletas, jeringas desechables o ampollas de dosis múltiples hechas de vidrio o plástico.

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 EL™ (BASF, 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, por ejemplo, agua, etanol, polyol (por ejemplo, glicerol, glicol propileno, y liquido 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 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 fluir 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 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 stereato 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 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, 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.

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 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 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.

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 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 tratamiento de individuos.

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

Métodos de Detección

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, peptidomimeticos, moléculas pequeñas u otras drogas) que modulen o de otra forma interfieran con la fusión de un virus de influenza a la 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, oligomeros 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, peptidomimeticos, 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.).

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 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 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 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 ^{3}H, 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 enzimaticamente 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 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 centrífuga. 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

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 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 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 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

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. 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 influencia como la gripe aviar mientras que la alternativa y el desarrollo que consume más tiempo de vacunas y nuevas drogas se 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 epítopos de protección confirmados, por lo tanto evitando epítopos de supresión T (*véase* Steward et al., J. Virol. 69:7668 (1995)) o epítopos inmuno dominantes B que subvierten el sistema inmune incluyendo respuestas inútiles, que no protegen (*p.e.* epítopos "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 epítopos 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, Igs 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 epítopos 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 epítopos 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 macrofages. (*Véase* Lunde et al., Biochem. Soco 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 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. Immunol. 10:129-36 (1997)).

Composiciones de Vacunas

Composiciones terapéuticas o profiláctica es se proveen aquí, las cuales 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 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 chemokines, incluyendo, pero no limitado a, IL-2, IL-2 modificado (Cys125 → Ser125), GM-CSF, IL-12, γ-interferon, IP-10, MIP1β, 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 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.

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 ligada N es a la amida nitrógeno de de cadenas laterales de asparagina y la glicosilación ligada N es al hidróxido de oxigeno 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 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 α1,3 fucose o un enlace de núcleo β 1,2 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 trímerica. Opcionalmente, la proteína de hemaglutinina es producida en una célula 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

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 aliviación 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 métodos conocidos en el arte. Por ejemplo, sujetos son inmunizados como ser 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 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 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 significante 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 epítopo 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 inmunogenícamente convenientes es probable que consistan de sub dominios de proteínas de doblado propio que están intrínsicamente 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 centrífuga, 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 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-

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 APF.

Métodos de Tratamiento

La invención provee ambos métodos profiláctico y terapéutico de tratar un 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

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 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 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 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 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

más anticuerpos, como D7, D8, F10, G17, H40, A66, D80, E88, E90 y H98 que se enlazan al mismo epítopo 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.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: métodos generales

Expresión y preparación de varios antígenos de paneo para selección de colección de anticuerpos de visualización fago.

HA1. HA1 es el fragmento de terminal N (aa17-338) de (A/Thailand/2(SP-33)/2004(H5N1). El gen fue codón-optimizado y expresado como proteína de fusión con un terminal C etiqueta aminoácidos 9 (C9-tag:GTETSQVAPA). La proteína de fusión HA1-C9 fue expresada en células 293T transitoriamente y la proteína secretada fue purificada de supernatant por cromatografía de afinidad. La proteína A Sepharose covalentemente juntada con anticuerpo anti-C9 1D4 (National Cell Culture Center) fue utilizada para purificación de HA1-C9.

Trimérica HA0. El ectodominio (HA0) de gen de hemaglutinina (HA) de A/VietNam/1203/2004 fue expresada en células de insecto como una proteína de fusión adaptando el protocolo descrito anteriormente[33]. Esta construcción contiene un terminal C trimerizante de secuencia 'foldon' del bacteriófago T4 fibritin para estabilizar la estructura trimérica, seguido de un lugar thrombin y una etiqueta His6. El cDNA de la proteína de fusión fue clonada en el vector de transferencia de baculovirus, pAcGP67 A (BD Biosciences, Bedford, MA) para permitir secreciones eficientes de proteína recombinante. $9x10^6$ células fueron infectadas con

existencias virales. 3 días después de la infección, las células fueron centrifugadas y el flotante fue incubado con esferas de 6 ml Ni-NTA (Qiagen Inc,, Valencia, CA). Las esferas fueron lavadas con tapón TBS buffer (10 mM Tris.HCl/ 80 mM NaCl, pH8.0) con 10 mM imidazole y diluidas con TBS con 250 nM Imidazole. La proteína HA5 diluida fue dializada contra Tapón TBS y además purificada utilizando intercambio de iones Mono Q HR10/10 column (GE Healthcare, Piscataway, NJ). La HA5 purificada fue digerida por thrombin durante la noche. La integridad y propiedad del trímero HA0 fue examinada utilizando filtración de Gel (Superdex 200 column) 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 $2.7x10^{10}$ miembros) construidas de células B de 57 donantes no inmunizados fueron utilizados para seleccionar scFv contra el HA1 purificado o HA0 trimérico. $5x10^{11}$ pfu de fago-scFvs preparados de cada colección fueron incubados con inmuno tubos (Nunc, Naperville, IL) cubiertos con 10 µg 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.

Fago-scFvs de clones individuales fueron producidos por ensayo de neutralización utilizando el mismo método que para hacer la colección fago. Particulas 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 seleccionado fueron convertidos a scFv-Fcs sub clonando 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-Fsc o IgG1s fueron expresados en células 293T o 293F (Invitrogen) por transfección transiente y purificados por cromatografía de afinidad de proteína A sepharose.

Análisis de Superficie de la Resonancia de Plasmón (SPR)

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 $MgCl_2$. La proporción de asociaciones (*ka*), constantes de proporción de disociación (*kd*), 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 Chi^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 avidez. Todos dos *ka, kd, 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 http://www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/bmb15/bmb15toc.htm.

Ensayo de neutralización con virus HA-pseudotipo

Plásmidos y Montajes

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 (HINI) proteína HA de largo completo 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).

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-Pol[57], vector de transferencia pHIV-Luc codificando el gen reporte de luciferase de luciérnaga bajo 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

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 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.

Mapeo de epítopo de de anticuerpo 8, 10 y 66

Plásmidos y Montajes

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

El método fue llevado a cabo como se describió anteriormente[48]. En corto, 100 $TCID_{50}$ (dosis infecciosas de cultivo de tejido medían) de virus fueron mezcladas en iguale 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 °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

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 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 hemaglutininación (HI)

Virus de influenza aviar preferiblemente enlazado a receptores de ácido siálico que contienen uniones de ácido N-acteylneuraminic α2,3-galactose (α2,3Gal) mientras que virus humano preferencialmente enlazados a aquellos conteniendo uniones de ácido N-acteylneuraminic α2,6-galactose (α2,6Gal). 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 hemaglutininación (HI) son un método sencillo y ampliamente utilizado para evaluar las respuestas de anticuerpos a la hemaglutinina de influenza. Stephenson et al. Reportaron que utilizando eritrocitos de caballo y por lo tanto incrementando la proporción de uniones de α2,3Gal disponibles para enlace, la sensibilidad de los ensayos de hemaglutininación 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 hemaglutininación 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 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

$0.5x10^6$ 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% NaN_3 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 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 total DNA / pozo) utilizando llipofectamine 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.

Expresión y preparación de varias proteínas HA para paneo

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 fue codón-optimizado y expresado como proteína de fusión con un terminal C etiqueta 9 de aminoácidos (C9-tag:GTETSQVAPA). La proteína de fusión HA1-C9 fue expresada en células 293T transientemente y las proteínas secretadas en sobrenadantes fueron recolectadas 48 horas después de la transfección y purificadas de los sobrenadantes por cromatografía de afinidad utilizando Proteína A Sepharose que juntada covalentemente con anticuerpo anti-C9 1D4 (National Cell Culture Center). El método para producir proteína HA0 de H5-VN04 es el mismo que se describe abajo para cristalización de complejo H5-F10 pero sin la co-infección de baculovirus para división-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

La cadena sencilla codificada de gen (VH-unión-VL) F10 (scFv) fue clonada en vector pSynI conteniendo una señal de secreción periplásmica de terminal N pelB, y una etiqueta 6xHis de terminal C. F10 scFv fue expresada en células XL10 en medio 2YT que contenía 0.1% de glucosa (w/v) a 25 °C por 15 horas con 0.5 mM IPTG. La proteína fue purificada primero por Hisbind Ni-NTA (Novagen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, y después por Superdex 200 (Amersham Biosciences) en 50 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, pH 8.

El ectodominio dejen H5-VN04 HA fue expresado en células de insecto como proteína de fusión adaptando el protocolo descrito anteriormente[6]. Esta construcción mantiene una secuencia 'foldon' trimerizante de terminal C DE la bacteriófago T4 fibritin para estabilizar la estructura trimerica, seguido por un lugar thrombin y una etiqueta His_6. El cDNA de la proteína de fusión fue clonada en el

vector de transferencia baculovirus, pAcGP67 A (BD Biosciences, Bedford, MA), para permitir secreción eficiente de proteína recombinante. Para obtener HA completamente divididos (como trímeros HA1-HA2), células sf9 fueron co-infectadas con baculovirus reservas de HA0 y furin a una proporción derivada empíricamente. El furin cDNA fue un obsequio del Dr. Robert Fuller (University of Michigan). Tres días después de la infección, las células fueron centrifugadas y los sobrenadantes fueron incubados con esferas Ni-NTA (Qiagen Inc., Valencia, CA). Las esferas fueron lavadas con tapón TBS (10 mM Tris.HCl, 80 mM NaCl, pH8.0) con 10 mM imidazole, y eludidas con TBS con 250 mM Imidazole. Las proteínas H5 eludidas fueron dializadas con tapón TBS y además purificadas por intercambio de iones utilizando Mono Q HR10/10 columna (GE Healthcare, Piscataway, NJ). El H5 purificado fue digerido por thrombin durante la noche y además purificado por Superdex 200 columna en tapón 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-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.

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 □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.

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 XDS[7] 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 WHATIF[9]. 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/kg [53] 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 MLD_{50} (el 50% de la dosis letal para ratón) bajo anestesia suave.

Estudio terapéutico en ratón

Los ratones primeros fueron infectados i.n. con10 MLD_{50} 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 figura 4.

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 genesVH, 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, Víctor 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 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 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 neutralización.

Resultados de ensayos de neutralización utilizando los virus pseudotipo.

scFvFcs bivalentes de anticuerpos anti-H5 fueron producidos y probados para actividades de neutralización contra los virus HA0-pseudotipo. Encontramos 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 epítopo) descrito abajo.) Utilizando el trímero HA0 como un objetivo, hemos identificado 10 nuevos anticuerpos únicos contra HA0. Estos Abs fueron detectados para actividades de 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.

Como se muestra en la figura, los Abs neutralizantes que fueron indicados por fago-scFv (Figura 6 panel superior izquierdo) resultaron ser potentes neutralizantes cuando se confirmó con scFvFc Abs solubles (Figura 6 panel superior de la mitad). 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 neutralizante fue nuevamente vista en los virus H5-SP33 pseudotipo (Figura seis panel inferior izquierdo). Los tres anticuerpos también realizaron neutralización cruzada de H1N1: cepa potencialmente neutralizada de H1-SC/1918 (Figura 6 panel inferior izquierdo) y cepa moderadamente neutralizada de H1-PR/34 (Figura 6 panel inferior derecho).

Los resultados de ensayos de micro neutralización. Como se muestra en la figura 6 panel superior derecho, 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 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 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 (Figura 9), sugiriendo que el (los) epítopo (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 4).

Todos los 10 nAbs enlazados a trimerico H5 y de competencia cruzada en contra de cada uno (Figura 16), indicando que ellos reconocen un epítopo 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 (Kd~100-200 pM) y proporciones de disociación muy lentas (kd ~ 10^{-4} s^{-1}) (Figura 17).

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

Mabs fueron capturados en un chip CM4 via IgG1 anti humano, y trimerico 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 Laugmuir 1:1. Las curvas de enlace registradas (con la referencia en blanco sustraída) son mostradas en negro y las curvas calculadas en rojo. Todas las *ka, kd, KD* 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, *ka, kd* y *KD* similares de D8 y F10 fueron observados, y A66 tuvo un dobles 1.8 de KD 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±1.1x10^{-5}

s^{-1} ~ 1.8±0.3x10^{-4} s^{-1}) y enlace de alta afinidad con el trímero H5 a nivel pM. (Figura 7)

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

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

(Figura 7 a, b, g y h). Lo ratones fueron tratados con anti-H5 nAbs o control mAb 24 horas antes del reto letal intranasalmente (i.n.) con 10 dosis letales medias (MLD_{50}) 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 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 (A/WSN/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 MLD_{50} 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 Epítopo inicial de anticuerpo D8, F10 y A66.

Organizacion y
Digitalizacion OSA Ltda

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCIÓN

21. **EXPEDIENTE No.** 10-81516

54. **TÍTULO** 2/2

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL**

71. **SOLICITANTE**

DOMICILIO

74. **APODERADO**

22. **BOGOTÁ, D.C.,**

(FORMA P-10)

Organizacion y
Digitalizacion CSA Ltda

10-81516

2/2

Varias plásmidas expresando HA y mutaciones de HA de tipo salvaje y longitud completa para H5-SP33 fueron transfectadas trasientemente en células 293T. 48 horas después de la trasnfección, anticuerpos anti-H5 (10ug/ml) fueron incubados con células 293T trasfectadas 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 trasfectadas, 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 epítopos 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 deH5 (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 adicción, 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 epítopo 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.

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 hemaglutininación (el enlace y unión cruzada de células rojas de la sangre), mientras que anti-H5 nAb de ratón, 17A2.1.2, y suero anti-H5N1 de hurón, ambos de los cuales inhibieron hemaglutininación, 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 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 completa inhibición de formación de sicintia 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 sicitia. 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 nAbs inhibieron la fusión de membrana sin interferir con el enlace receptor.

Ejemplo 9: caracterización estructural del epítopo nAb

Paso siguiente de terminamos el epítopo 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)

en el complejo, cada trímero H5 enlazó tres moléculas de F10, en lugares de simetría relacionada, enterrando ~1500 $Å^2$ 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 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 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 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 (Figuras 4 y 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 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 19_2-21_2 (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 18_1 y 38_1) y un tryptophan, $W21_2$, que forma la parte trasera del bolsillo. La cadena lateral de M54 también contacta los anillos aromáticos de $W21_2$ y, $H38_1$ así como la cadena lateral de $I45_2$ desde la hélice αA, mientras que la cadena principal de enlaces carbonil oxígeno e hidrógeno con la cadena lateral de $H38_1$. 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 ($D19_2$) del péptido de fusión. La 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 12 d, e).

En paralelo, experimentos de mutagénesis fueron llevados a cabo en la hélice αA para ayudar a definir el epítopo (Figura 6). Las mutaciones en 3 residuos que directamente contactaron el anticuerpo: V52A/E, N52A e I56A, no tuvieron 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 (Figura 12b-c). Por lo tanto, mutagénesis de la hélice αA es completamente consistente con el epítopo definido cristalográficamente para F10. Además, los otros dos nAbs, para los cuales no existen datos estructurales, mostraron perfiles de enlace de mutación-nAb casi idénticos, indicativo de una sobreposición cercana del epítopo 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 de conformación que llevan al estado fusogénico.

Ejemplo 10: base estructural de neutralización de espectro amplio

La región de HA definida por el epítopo 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 αA 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, yH9 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 epítopo F10. Diferentes secuencias en unos pocos aminoácidos clave enterrados en el núcleo que son característica de cada clase (p.e. a 17_1 y 111_2) llevan a diferencias consistentes en la orientación de varias cadenas laterales dentro del epítopo, así como la disposición del bolsillo con respecto a la hélice αA.

Dentro de cada grupo/clase, la región de epítopo 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 18_1 y 38_1, Figura 6a). 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 epítopo (así como en el residuo 40_1, 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 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 glycosylated en la posición 38_1, que se encuentra en el perímetro del epítopo 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.

Ejemplos de: 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 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: 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-especifico 2A y 80R son control negativo. La falta de enlace a un HA de Grupo 2, H7, también se muestra. 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 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/summaryH520070403.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. http://www.who.int/csr/disease/influenza/influenzanetwork/en/index.html. (2008).

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

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).

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).

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).

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 A 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).

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).

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

Nosotros reivindicamos:

1. Un anticuerpo monoclonal aislado, donde se dice anticuerpo monoclonal enlazado a un epítopo en la región de tallo de la proteína de hemaglutinina (HA) de un virus de influenza, y neutraliza el virus de influenza A.

2. El anticuerpo monoclonal la reivindicación 1, donde se dice virus de influenza es un virus de influenza de Grupo I.

3. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1, donde se dice virus de influenza es un virus de influenza de cluster H1.

4. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 3, donde se dice virus de influenza de cluster H1 es un virus de influenza de cluster H1a o un virus de influenza de cluster Hb.

5. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1, donde se dice epítopo de es no lineal.

6. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1, donde se dice epítopo comprende el polipéptido HA1 y HA2

7. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1, aquí el epítopo se compone de aminoácido en la posición 18, 38, 40, 291 del polipéptido HA1 y el

aminoácido en la posición 18, 19, 20, 21, 38, 41, 42, 45, 52, 53 y 56 del polipéptido HA2.

8. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1, donde se dice anticuerpo monoclonal que inhibe la fusión viral y de membrana celular.

9. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1, donde se dice anticuerpo monoclonal que compite con el enlace de anticuerpo monoclonal D7, D8, F10, G17, H40, A66, D80, E88, E90 O H98 a la proteína HA.

10. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1 donde se dice anticuerpo monoclonal es un anticuerpo completamente humano.

11. Un anticuerpo aislado scFv, donde se dice anticuerpo que se enlaza a un epítopo de proteína de hemaglutinina (HA) de un virus de influenza, y neutraliza el virus de influenza A.

12. El anticuerpo de la reivindicación 11, donde se dice virus de influenza es un virus de influenza del Grupo I.

13. El anticuerpo de la reivindicación 11, donde se dice virus de influenza es virus de influenza de cluster H1.

14. El anticuerpo de la reivindicación 11, donde se dice virus de influenza de cluster H1 es un virus de influenza de cluster H1a.

15. El anticuerpo de la reivindicación 11, donde se dice es no lineal.

16. El anticuerpo de la reivindicación 11, aquí epítopo comprende el polipéptido HA1 y HA2.

17. El anticuerpo de la reivindicación 11, aquí el polipéptido comprende el aminoácido en la posición 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.

18. El anticuerpo de la reivindicación 11, donde se dice anticuerpo inhibe la fusión viral y de membrana celular.

19. El anticuerpo de la reivindicación 11, donde se dice compite con el enlace de anticuerpo monoclonal D7, D8, F10, G17, H40, A66, D80, E88, E90 O H98 a la proteína HA.

20. Un método de prevenir una enfermedad o desorden causada por un virus de influenza, el método comprende administrar a una persona en riesgo de sufrir de dicha enfermedad o desorden, una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1 o el anticuerpo scFv de la reivindicación 11.

21. El método de la reivindicación 20, aquí el método además comprende administrar una droga antiviral, un inhibidor de entrada viral o un inhibidor de anexión viral.

22. El método de la reivindicación 21, donde se dice droga antiviral es un inhibidor de neuraminidasa, un inhibidor de HA, un inhibidor de ácido siálico o un canal M2 ion.

23. El método de la reivindicación 22 donde se dice inhibidor de canal M2 ion es amantadine o, rimantadine.

24. El método de la reivindicación 22, donde se dice inhibidor de neuraminidasa es zanamivir, o oseltamivir phosphate.

25. El método de la reivindicación 20 o reivindicación 21, aquí el método comprende administrar dos o más anticuerpos específicos a un virus de influenza de Grupo I.

26. El método de la reivindicación 20, reivindicación 21, o reivindicación 25, aquí el método además comprende administrar un anticuerpo específico a un virus de influenza de Grupo II.

27. El método de la reivindicación 20, donde se dice anticuerpo es administrado antes o después de la exposición al virus de influenza.

28. El método de la reivindicación 20, donde se dice anticuerpo es administrado en una dosis suficiente para neutralizar dicho virus de influenza.

29. Un método de tratamiento de una enfermedad o desorden causada por un virus de influenza, el método comprende administrar a una persona en riesgo de sufrir de dicha enfermedad o desorden, cantidades

terapéuticamente efectivas del anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1 o el anticuerpo scFv de la reivindicación 11.

30. El método de la reivindicación 29, aquí el método además comprende administrar una droga antiviral, un inhibidor de entrada viral o un inhibidor de anexión viral.

31. El método de la reivindicación 30, donde se dice droga antiviral es un inhibidor de neuraminidasa, un inhibidor HA, un inhibidor de ácido siálico o un canal M2 ion.

32. El método de la reivindicación 31, donde se dice inhibidor de canal M2 ion es amantadine o, rimantadine.

33. El método de la reivindicación 31, donde se dice inhibidor de neuraminidasa es zanamivir, o oseltamivir phosphate.

34. El método de la reivindicación 29 o reivindicación 30, aquí el método comprende administrar dos o más anticuerpos específicos a un virus de influenza de Grupo I.

35. El método de la reivindicación 29, reivindicación 30, o reivindicación 34, aquí el método además comprende administrar un anticuerpo específico a un virus de influenza de Grupo II.

36. El método de la reivindicación 29, donde se dice anticuerpo es administrado antes o después de la exposición al virus de influenza.

37. El método de la reivindicación 29, donde se dice anticuerpo es administrado en una dosis suficiente para neutralizar dicho virus de influenza.

38. Una composición que comprende el anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1 o el anticuerpo scFv de la reivindicación 11 y un portador.

39. La composición de la reivindicación 38, además comprende una droga antiviral, un inhibidor de entrada viral o un inhibidor de anexión viral.

40. La composición de la reivindicación 39, donde se dice droga antiviral es un inhibidor de neuraminidasa, un inhibidor HA, un inhibidor de ácido siálico o un canal M2 ion.

41. El método de la reivindicación 40, donde se dice inhibidor de canal M2 ion es amantadine o, rimantadine.

42. El método de la reivindicación 40, donde se dice inhibidor de neuraminidasa es zanamivir, o oseltamivir phosphate.

43. La composición de la reivindicación 38, además comprende uno o más anticuerpos específicos a un virus de influenza de Grupo I.

44. La composición de la reivindicación 38, reivindicación 39, o reivindicación 42, además comprende un anticuerpo específico a un virus de influenza de Grupo II.

45. Un método identificando un anticuerpo específico para un virus de influenza comprende: contactar una proteína trimerica de hemaglutinina (HA), donde se dice proteína HA esa inmovilizada en una superficie sólida con un anticuerpo de prueba y detectando un complejo anticuerpo-proteína HA.

46. El método de la reivindicación 45 donde se dice superficie sólida es plástico.

47. El método de la reivindicación 45, donde se dice proteína HA es producida en una célula no mamífera.

48. El método de la reivindicación 45, donde se dice proteína HA es producido en células de insecto.

49. El método de la reivindicación 45, donde se dice proteína HA comprende glycosylations comparadas a proteínas HA de tipo salvaje.

50. El método de la reivindicación 45 donde se dice proteína HA es inmovilizada en dicha superficie sólida para enmascarar la cabeza globular de dicha proteína HA.

51. Un método de producir un anticuerpo aislado específicamente se enlace a una proteína trimerica hemaglutinina (HA), (a) exponiendo una cadena simple o colección de expresión Fab a dicha proteína HA en donde dicha proteína HA es inmovilizada en una superficie sólida; (b)

identificando un anticuerpo en dicha colección que específicamente se enlace a dicha proteína; y (c) aislando el anticuerpo de la colección.

52. El método de la reivindicación 51 donde dice superficie sólida es plástico.

53. El método de la reivindicación 51, donde dice proteína HA es producida en una célula no mamífera.

54. El método de la reivindicación 51, donde dice proteína HA comprende glycosylations modificados comparados a proteína HA de tipo salvaje.

55. El método de la reivindicación 51, donde dice proteína HA es inmovilizada en dicha superficie sólida para enmascarar la cabeza globular de dicha proteína HA.

56. El método de la reivindicación 51, donde dice colección de expresión es una colección no inmune.

57. El método de la reivindicación 50, donde dice colección de expresión es una colección ingenua H5.

58. Un método de vacunación a un sujeto contra un virus de influenza comprende administrar ha dicho sujeto una proteína trimerica hemaglutinina (HA) cubierta con o contenida en una matriz biológicamente compatible.

59. El método de la reivindicación 58, donde dice proteína HA tiene estructuras de carbohidrato no mamíferas.

60. El método de la reivindicación 58, donde dice proteína HA comprende glycosylations modificados comparados con proteína HA de tipo salvaje.

61. El método de la reivindicación 58, donde dice proteína HA es cubierta o contenida en dicha matriz biológicamente compatible de tal forma que enmascare la cabeza globular de dicha proteína HA.

62. Un método de producir un anticuerpo aislado específicamente se enlace a un virus de contenido patogénico, (a) exponiendo una cadena simple o colección de expresión Fab a una proteína de fusión de membrana de dicho virus donde dicha proteína HA es inmovilizada en una superficie sólida; (b) identificando un anticuerpo en dicha colección que específicamente se enlace a dicha proteína; y (c) aislando el anticuerpo de la colección.

63. El método de la reivindicación 62, donde dice superficie sólida es plástico.

64. El método de la reivindicación 62, donde dice proteína de membrana de fusión, es producido en una célula no mamífera.

65. El método de la reivindicación 62, donde dice proteína de membrana de fusión tiene estructuras de carbohidrato no mamíferas.

66. El método de la reivindicación 62 donde dice proteína de membrana de fusión comprende glycosylations modificados comparados con proteína de membrana de fusión de tipo salvaje.

67. El método de la reivindicación 62, donde dice colección de expresión es una colección no inmune.

68. El método de la reivindicación 62, donde dice colección de expresión es una colección ingenua H5.

69. Un método de vacunar un sujeto contra un virus de contenido patogénico comprende administrar ha dicho sujeto una proteína de membrana de fusión de dicho virus cubierta o contenida en una matriz biológicamente compatible.

70. El método de la reivindicación 69, donde dice proteína de fusión tiene estructuras de carbohidrato no mamíferas.

71. El método de la reivindicación 69, donde dice proteína de fusión comprende glycosylations modificados comparados con proteína de membrana de fusión de tipo salvaje.

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

a) contactar la muestra con él anticuerpo monoclonal de reivindicación; 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.

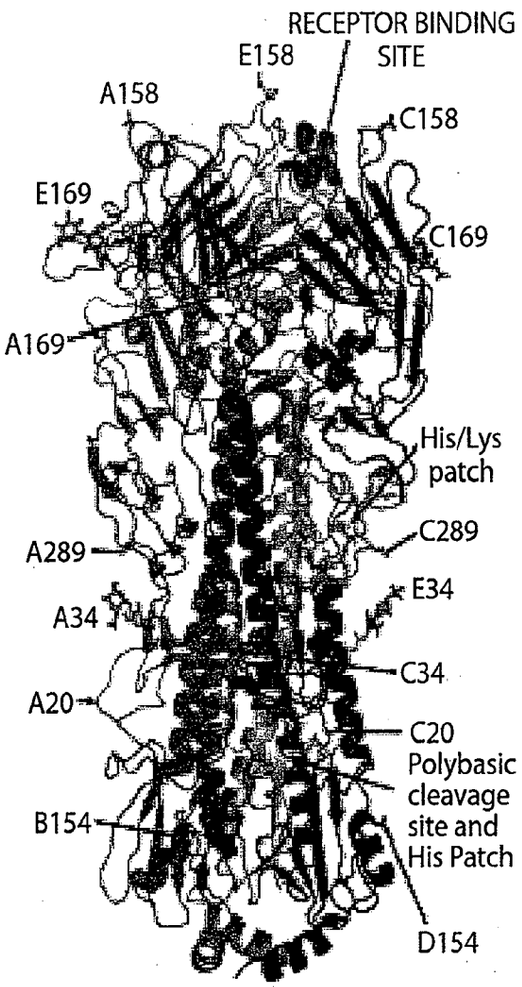
73. El método de la reivindicación 72, donde la detección ocurre *in vivo*.

74. El método de la reivindicación 72, donde la muestra es obtenida de sangre, pelo, raspadura de mejilla, saliva, biopsia, o semen.

75. Un anticuerpo monoclonal aislado, donde dice anticuerpo monoclonal comprende una secuencia de aminoácidos VH codificada por el gen germilinea VH IGHV-69*01 donde el aminoácido en la posición: a) 27 es una valine; b) 28 es threonine; c) 30 es serine; d) 31 es serine; e) 54 es methionine; f) 55 es phenylalanine; g) 58 es threonine, h) 100 es proloine; i) 101 es serine; j) 102 es tyrosine; k) 103 es isoleucine y 105 es serine, donde dice anticuerpo monoclonal enlazado a un epítopo en la región de tallo de la proteína de hemaglutinina (HA) de un virus de influenza, y neutraliza virus de influenza A.

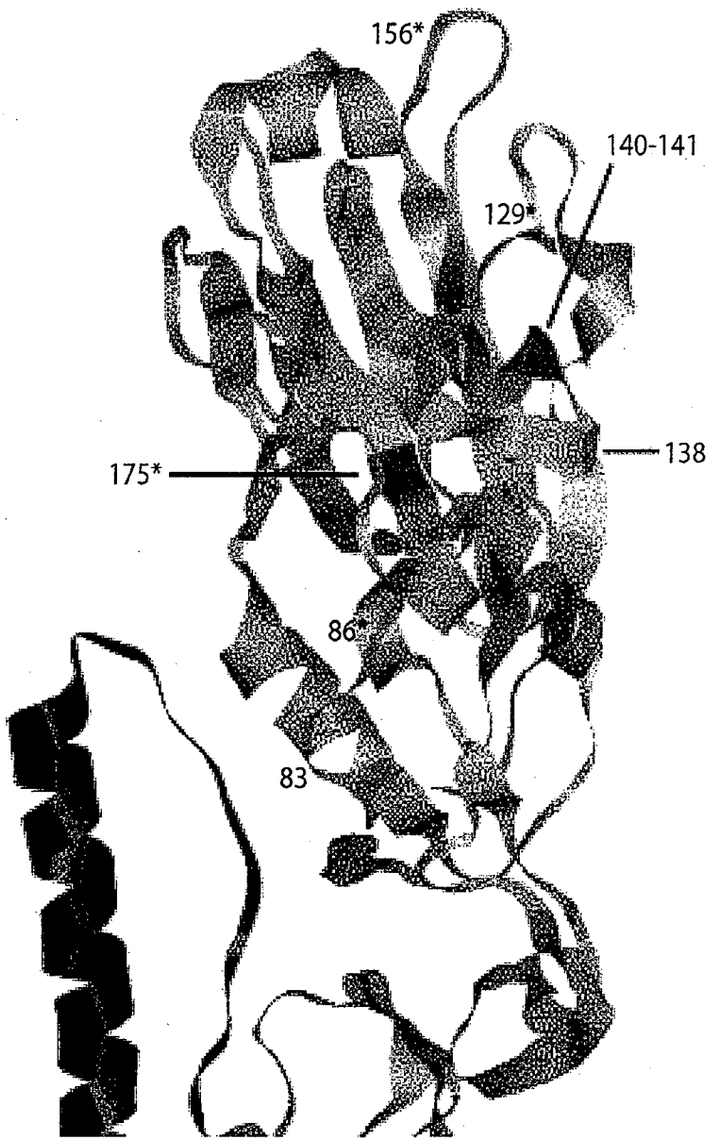
RESUMEN

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.



Structure overview of the A/Vietnam 1203/04 trimer, receptor binding site and antigenic variation sites are highlighted on the monomer (cited from Stevens, 2006).

Fig. 1A



Location of amino acid residues in the HA of H5N1 influenza viruses that are under positive selection (cited from Smith, 2006).

Fig. 1B

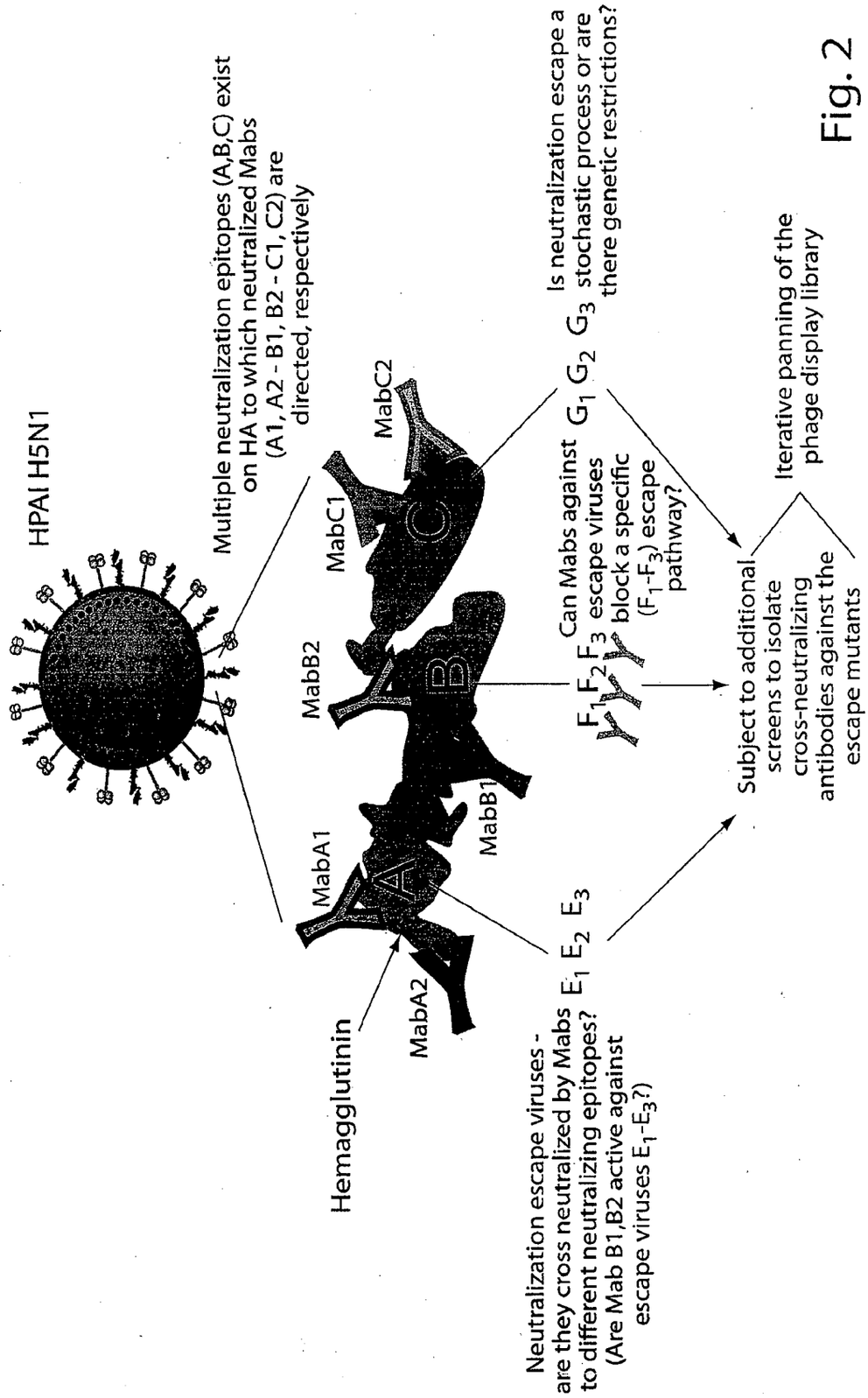

HPAI H5N1
Multiple neutralization epitopes (A,B,C) exist on HA to which neutralized Mabs (A1, A2 - B1, B2 - C1, C2) are directed, respectively
MabA1
MabA2
MabB1
MabB2
MabC1
MabC2
Hemagglutinin
Neutralization escape viruses - are they cross neutralized by Mabs to different neutralizing epitopes? (Are Mab B1,B2 active against escape viruses E_1-E_3?)
E_1 E_2 E_3
Can Mabs against escape viruses block a specific (F_1-F_3) escape pathway?
F_1 F_2 F_3
Is neutralization escape a stochastic process or are there genetic restrictions?
G_1 G_2 G_3
Subject to additional screens to isolate cross-neutralizing antibodies against the escape mutants
Iterative panning of the phage display library

Fig. 2

Amino Acid sequences of variable regions of anti-H5 mAbs

VH	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	V GENE	
Cons.	KKPGSSVKVSCKAS	GGTFSSYA	ISWVRQAPGQGLEWMGG	IIPMFGTP	NYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC	AR		WGQGTL	
IGHV	....	.GT.SS..	.....	...M.T.	.....	..----------	------	------	1-69
F10/E90	..........TSS	EVT.SSF.	.....L..	.S.MF.T.	.....Q..R....D.R.....	..---SPSYICSGGTCVFDH	.....	.....	1-69
D8/D80	....	.GT.SA..	FT.....	..GMF.TA	.....L.....T.....L...	..---GLYYYESS----FDY	.....	.....	1-69
A66/E88	....	.GF.SMT.	FT.L.....	.S.IFRT.	K.....N..N...T..K.....	..--TLSSYQPNND--AFAI	.....	.....M	1-69
G17	....A.....T.	.VT.SS..	.....	..GVF.V.	K.....KP...V....N...A.....	..---EPGYYVGKN--GFDV	.....	.....M	1-69
D7/H98	.....P	.GI.NTN.	F.....V..	V..LERTA	S...NV.....N.....T....A.....	..---SSGYHFRSH---FDS	.....	..L...	1-69
H40	R...A......	.YT.TG.Y	.H.....W	.N.MT.GT	.....VW..M.R.T.IN.....VTR.T.D.....	..GASVLRYFDWQP-EALDI	.....	..L..T	1-2

VL	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	GENE	
Cons.	QPVLTQPPS-ASGSPGQRVTISCTGS		VAWYQQKPGQAPKLLIY		DRPSGIPDRFSGSR--SGTTASLTISGLQPEDEADYYC			FGGGTKLTVL	
D7Vλ	NFM....H.-V.A...KT.....	SGNIAANY	.Q....R..S..TTV..	EDD	R....V.....IDR.SNS.....KT.....	QTYDTNNHAV	.....H....		LV6-57
D8Vλ	.S.....-.....S.....T	SSDVGGYNS	.S....H..K....M..	EVT	K....V.....A.K--..N.....V....A.....F.	CSYAGHSAYV	..T...V...		VL2-11
F10Vλ	..G.....-V.KGLR.TA.LT...N	SNNVGNQG	A..L..HQ.HP....S.	RNN	.....SE...A..--..N.....T.....	STWDSSLSAVV	.....		LV10-54
G17Vλ	SYE.....-V.KGLR.TAILT...D	SNNVGHQG	T..L..HQ.HP....S.	RNG	N.....SE...A..--..N.....I.....	SVWDSSLSAWV	.....		LV10-54
H40Vλ	.....-V.VA...TAS.P.G.N	NIGGYS--	.H.....L.V..	DDK	.....E....AN--..S..T....RVEAG..G....	QVWDSGNDRPL	.....		VL3-21
A66Vκ	EI....S.ATL.L...E.A.L..RA.	QSVSSY--	L.....R....	DAS	N.AT...A.....G--...DFT....R.E...F.V.F.	QQYGSSPQ---	..Q..R.EIK		KV3-20
D80Vκ	EI....S.GTL.L...E.A.L..RA.	QSLSSKY-	L.....R....	GAS	S.AT.....G--...DFT....R.E...F.V.S.	QQYDGVPRT--	..Q..TVEIK		KV3-20
E88Vλ	L.....-...T.....I..S..	SSNIGSNT	.N....L..T.....	SNN	Q....V.....--...S...A.I..R.....	QSYDSRLSASL	..T..TV...		LV1-44
E90Vκ	DIQM..S..SL.A.V.D....T.RA.	QSISSY--	LN.....K.....	AAS	SLQR.V.S.....G--...DFT....S.....F.V.Y.	QQYDSSPYT--	..Q...VEIK		KV1-39
H98Vλ	SYE.....-...KH.....S.G	TSNIGRNH	.N....L..T.....	SNE	Q....V.....K--...S...AV....S.....	ASWDDNLSGWV	.....		LV1-44

Framework regions 1-4 (FR1-4) and complementarity-determining regions 1-3 (CDR1-3) for VH and VL are shown. FR, CDR and gene names are defined using the IMGT database. For VH, the first 11 residues of FR1 (QVQLVQSGAEV) and last 5 residues of FR4 (VTVSS) are invariant and not shown. Dots denote identity with the consensus sequence, hyphens denote gaps. Six different VH and 10 different VL genes were found. 4 out of 6 antibodies share the same VH gene. 5 out of the 6 VH belong to one gene family, IGHV1-69*01. The VL genes are much more diverse than the VH genes, consistent with the lack of contacts observed between F10 and H5; three out of the 10 VL are k chain. The 3 VH chains used to make IgG1s are coloured red. H5 contact residues to F10 are highlighted, along with corresponding residues in other VHs, in cyan (critical residues as defined by FastContact energy calculations) and grey (other contacts < 4.5 Å).

Fig. 3

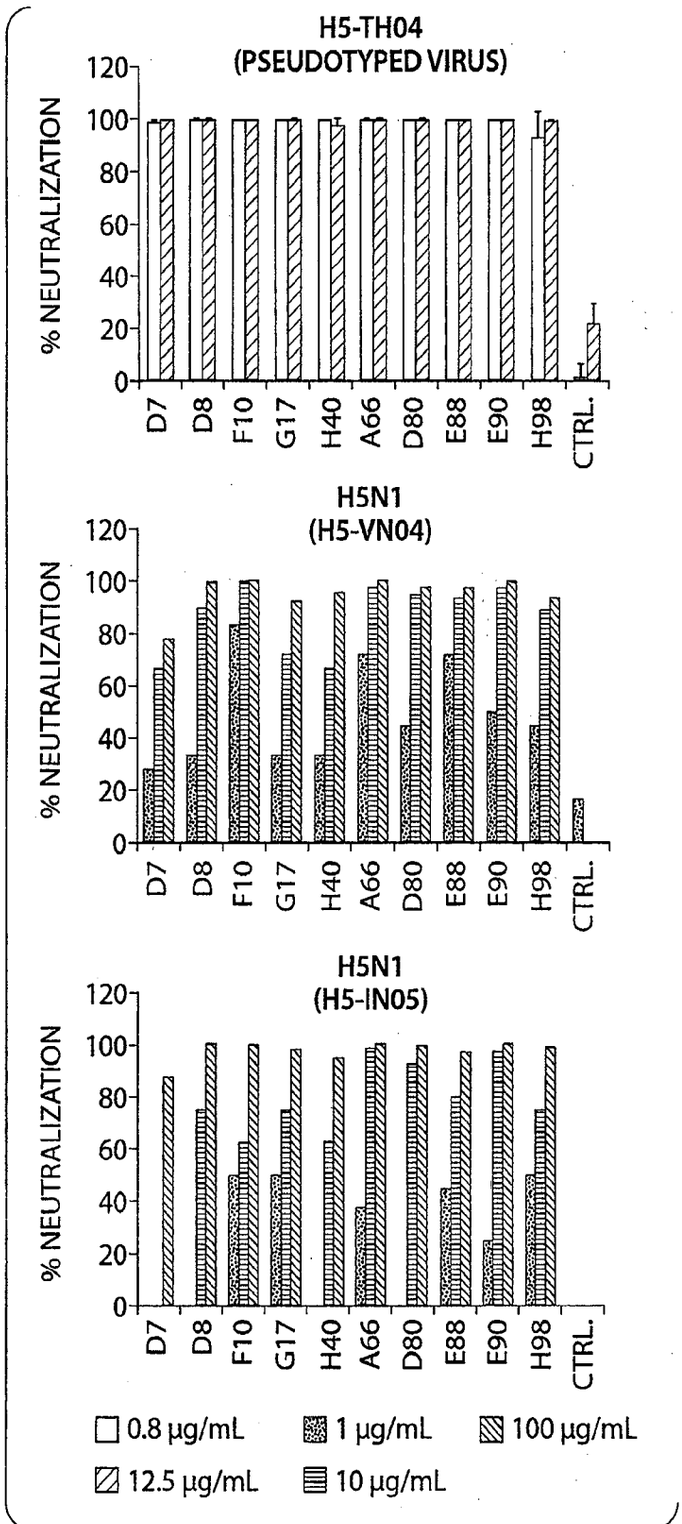

H5-TH04
(PSEUDOTYPED VIRUS)
% NEUTRALIZATION
120
100
80
60
40
20
0
D7
D8
F10
G17
H40
A66
D80
E88
E90
H98
CTRL.
H5N1
(H5-VN04)
% NEUTRALIZATION
H5N1
(H5-IN05)
% NEUTRALIZATION
0.8 µg/mL
1 µg/mL
100 µg/mL
12.5 µg/mL
10 µg/mL

Fig. 4A

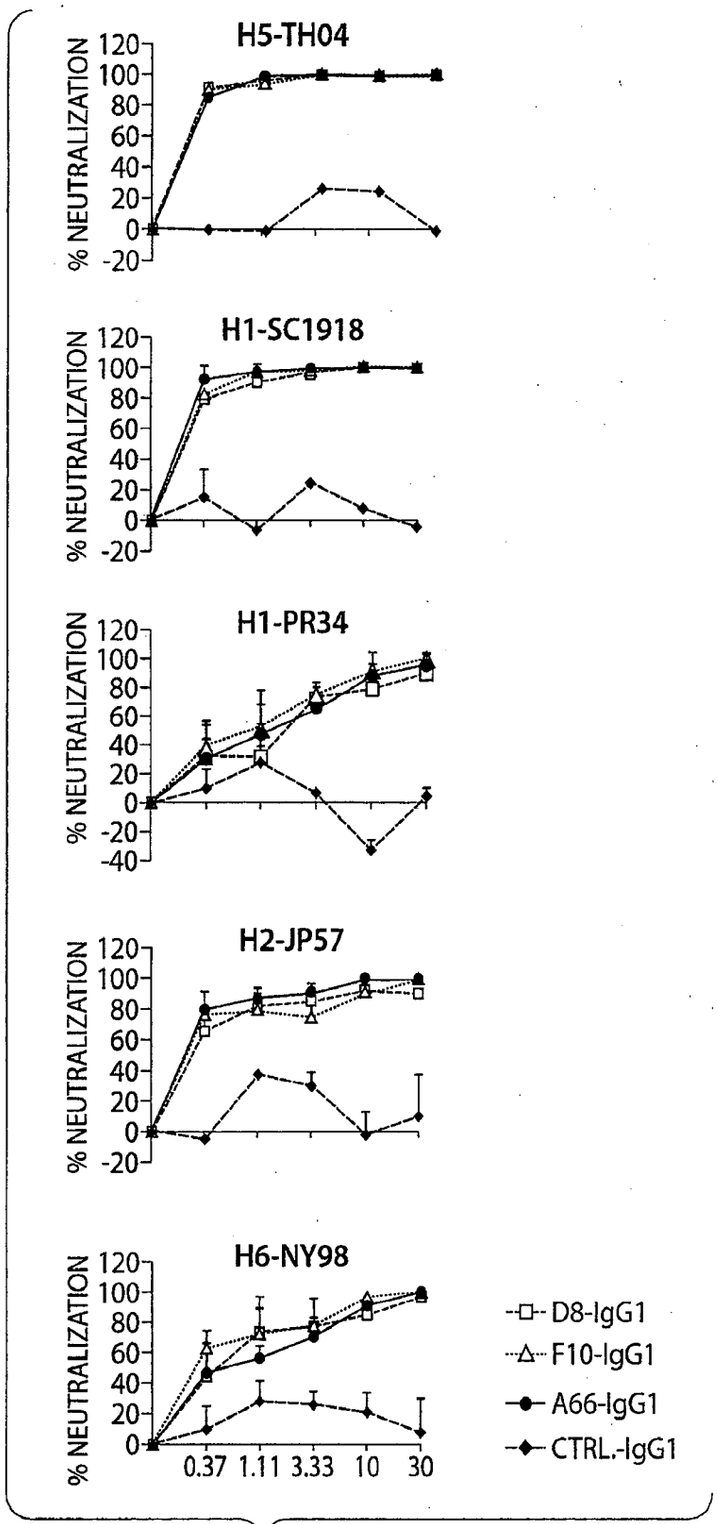

H5-TH04
H1-SC1918
H1-PR34
H2-JP57
H6-NY98
% NEUTRALIZATION
120
100
80
60
40
20
0
-20
-40
0.37 1.11 3.33 10 30
D8-IgG1
F10-IgG1
A66-IgG1
CTRL.-IgG1

Fig. 4B

VIRUS	HUMAN mAb F10	MURINE 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

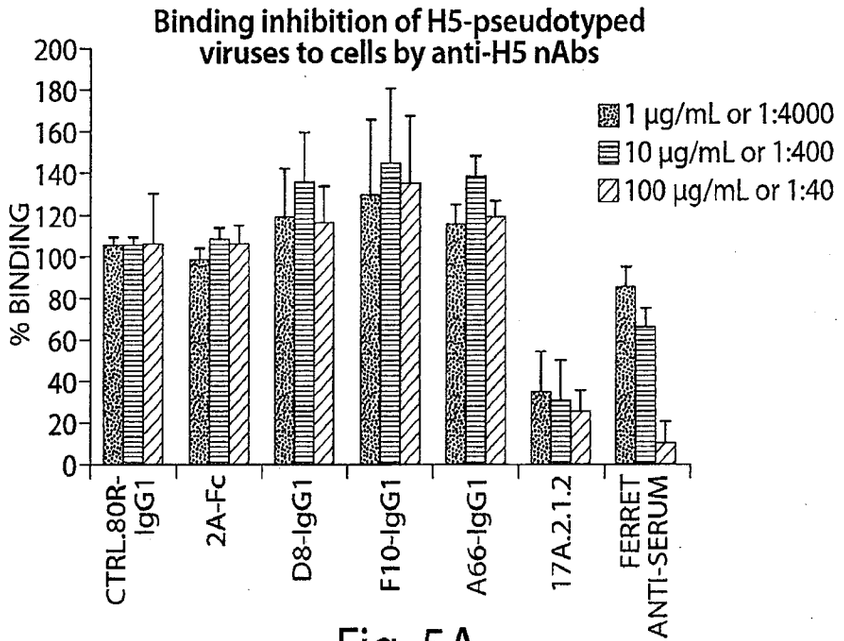

Binding inhibition of H5-pseudotyped viruses to cells by anti-H5 nAbs
% BINDING
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
1 µg/mL or 1:4000
10 µg/mL or 1:400
100 µg/mL or 1:40
CTRL.80R-IgG1
2A-Fc
D8-IgG1
F10-IgG1
A66-IgG1
17A.2.1.2
FERRET ANTI-SERUM

Fig. 5A

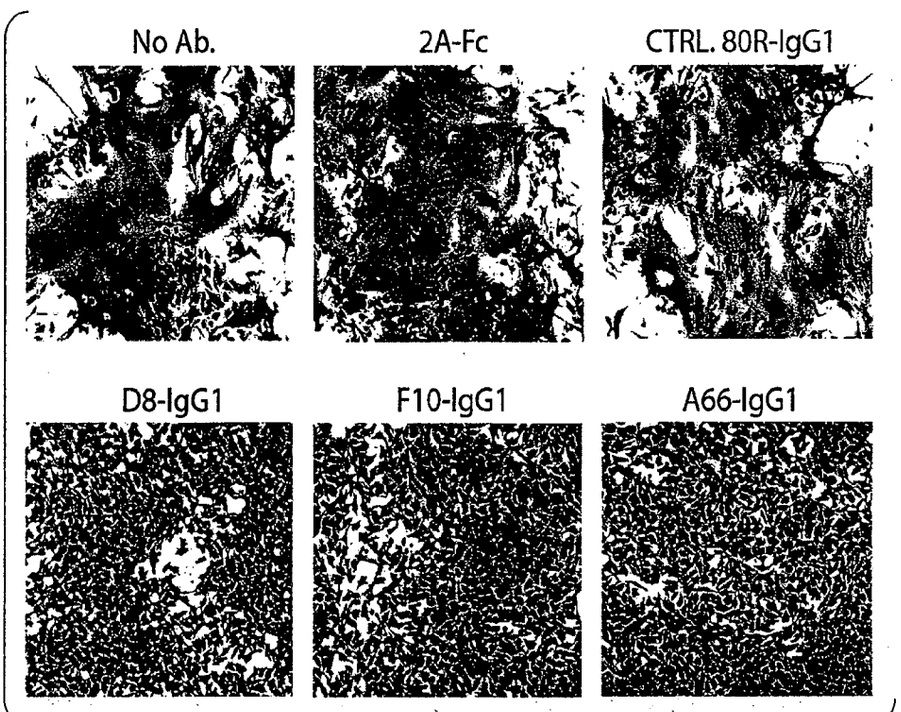

No Ab.
2A-Fc
CTRL. 80R-IgG1
D8-IgG1
F10-IgG1
A66-IgG1

Fig. 5B

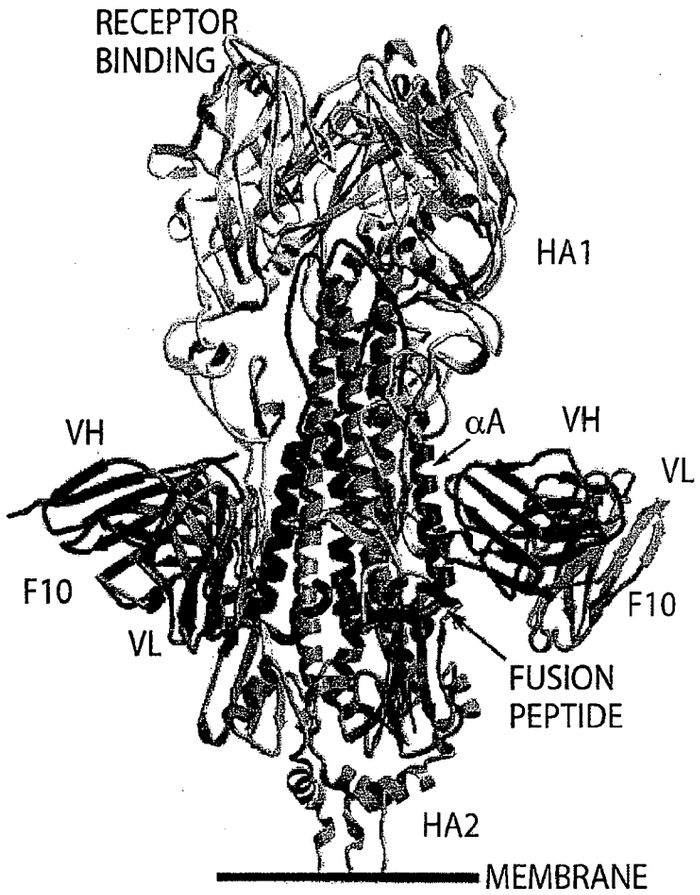

RECEPTOR
BINDING
HA1
VH
αA
VH
VL
F10
VL
F10
FUSION
PEPTIDE
HA2
MEMBRANE

Fig. 6A

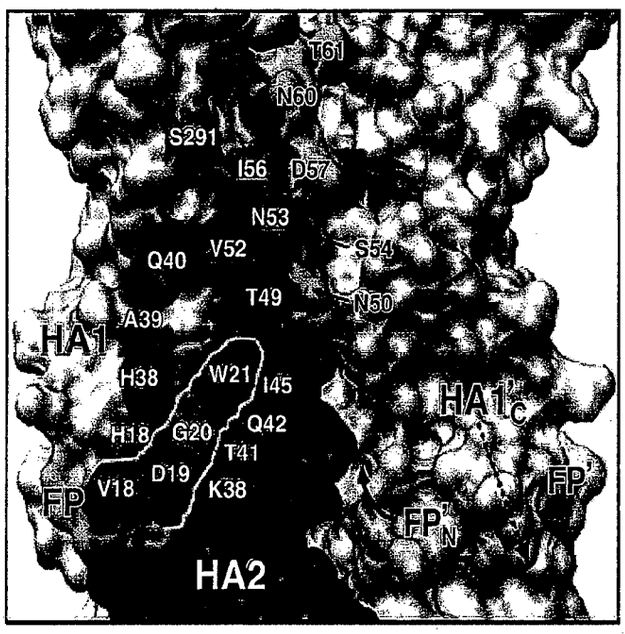

T61
N60
S291
I56
D57
N53
Q40
V52
S54
T49
N50
A39
HA1
H38
W21
I45
HA1C
H18
G20
Q42
T41
D19
V18
K38
FP
FP'
FP'N
HA2

Fig. 6B

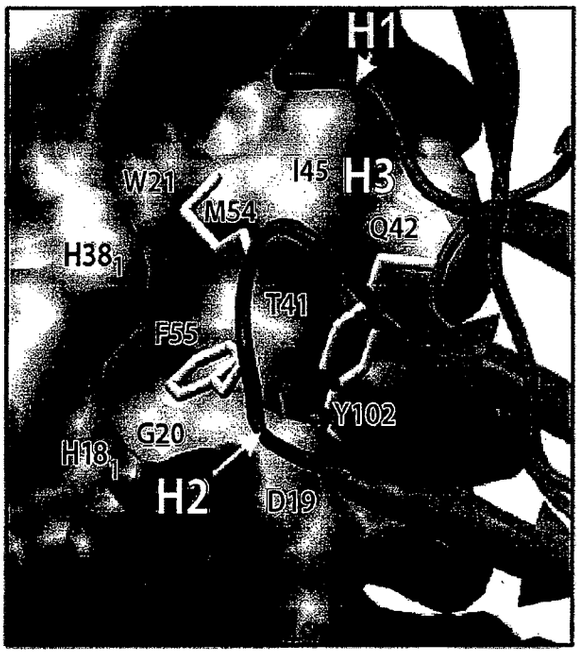

H1
W21
I45
H3
M54
Q42
H38$_1$
T41
F55
Y102
G20
H18$_1$
H2
D19

Fig. 6C

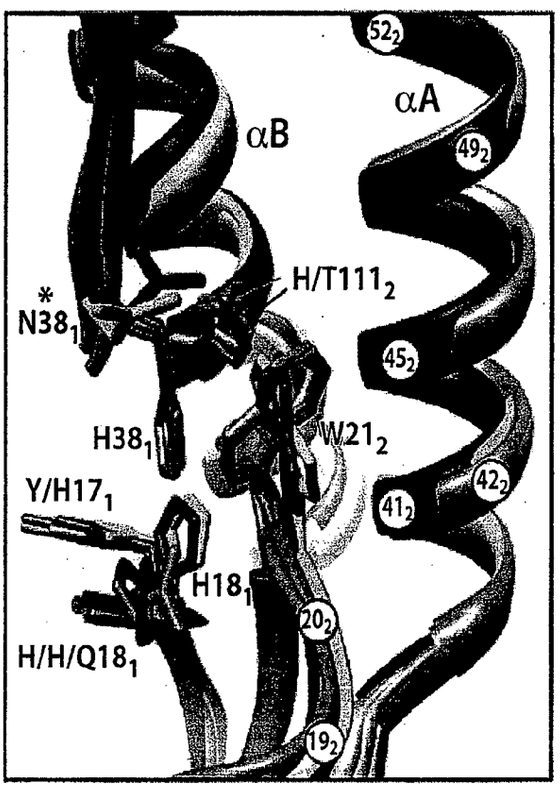

52$_2$
αA
αB
49$_2$
H/T111$_2$
*
N38$_1$
45$_2$
H38$_1$
W21$_2$
42$_2$
Y/H17$_1$
41$_2$
H18$_1$
20$_2$
H/H/Q18$_1$
19$_2$

Fig. 6D

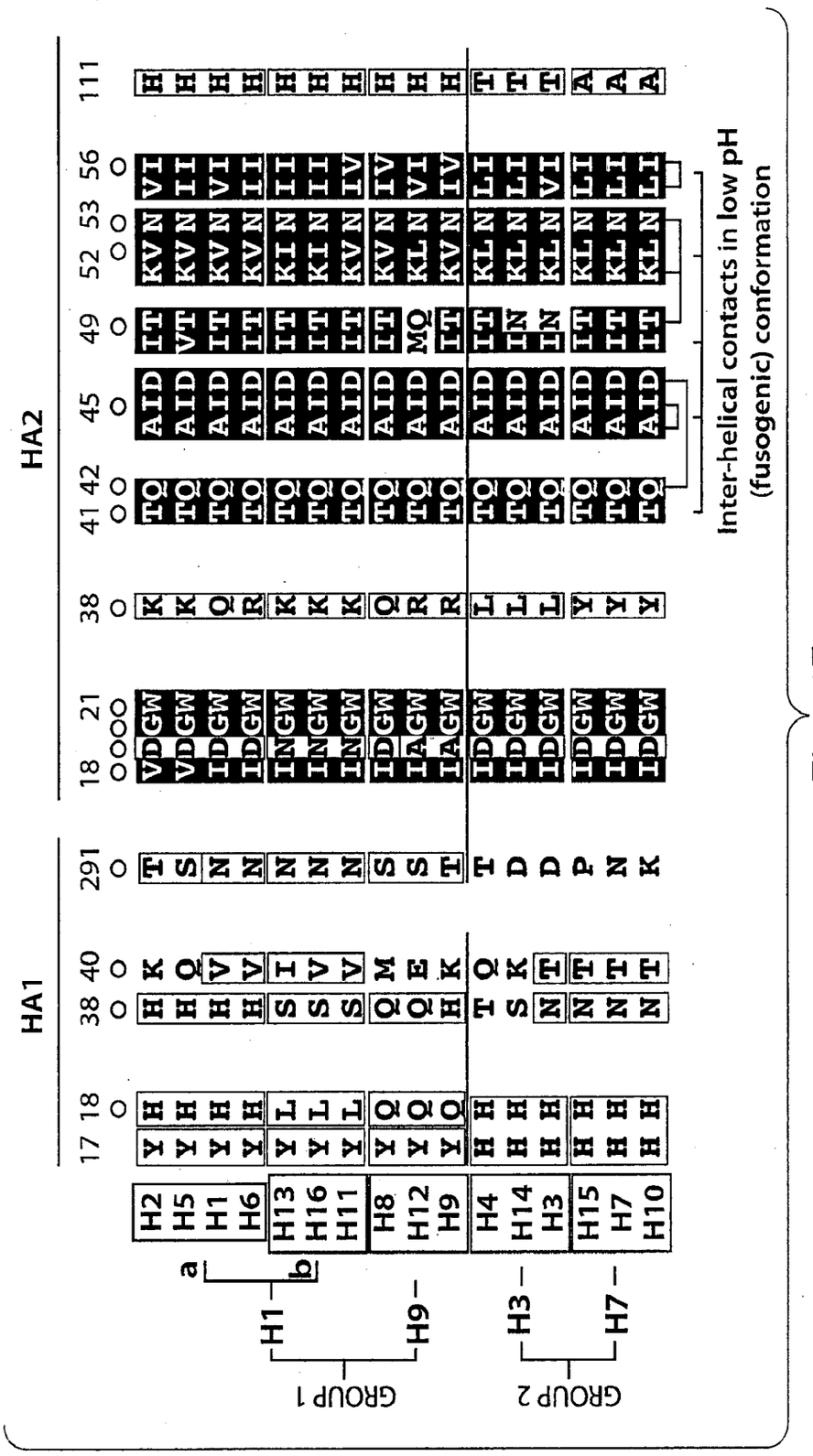

HA1
HA2
17 18 O
38 40 O O
291 O
18 21 O O O O
38 O
41 42 O O
45 O
49 O
52 53 O O
56 O
111
H2 H5 H1 H6
H13 H16 H11
H8 H12 H9
H4 H14 H3
H15 H7 H10
a
b
H1
H9
H3
H7
GROUP 1
GROUP 2
Inter-helical contacts in low pH
(fusogenic) conformation

Fig. 6E

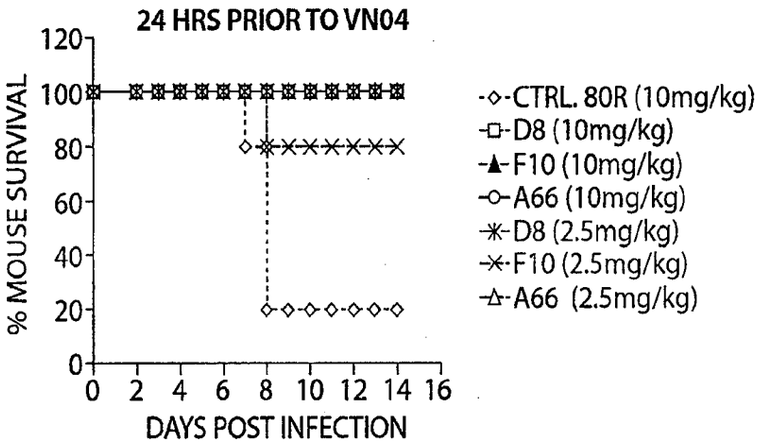


Fig. 7A

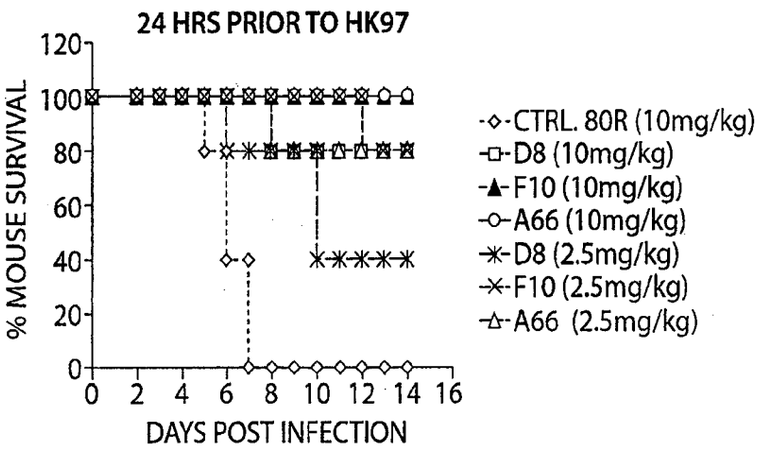


Fig. 7B

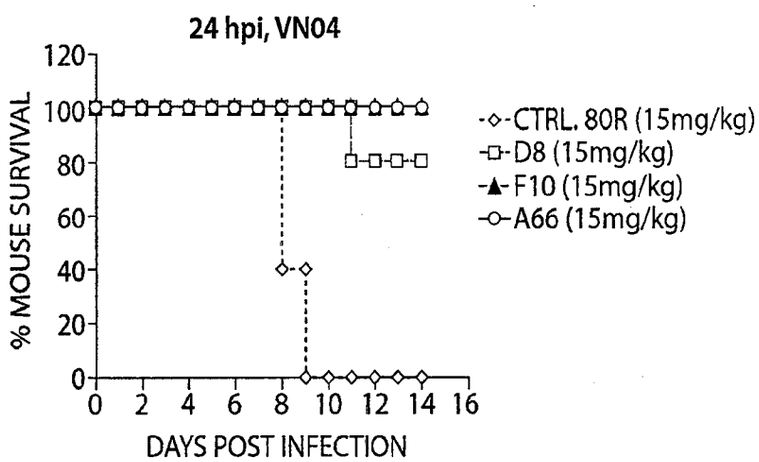


Fig. 7C

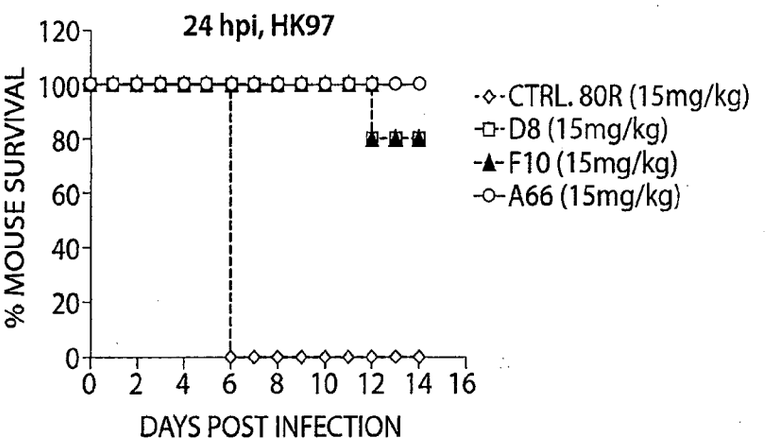


Fig. 7D

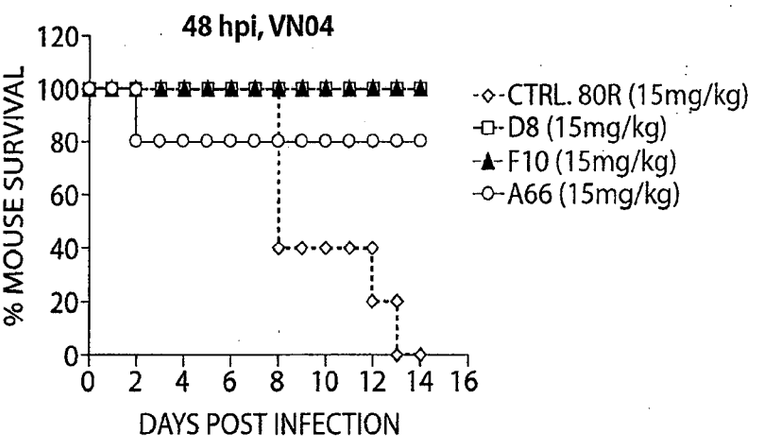


Fig. 7E

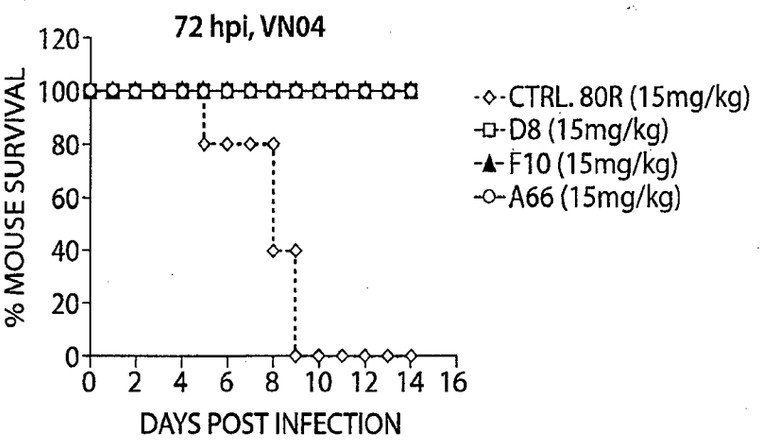


Fig. 7F

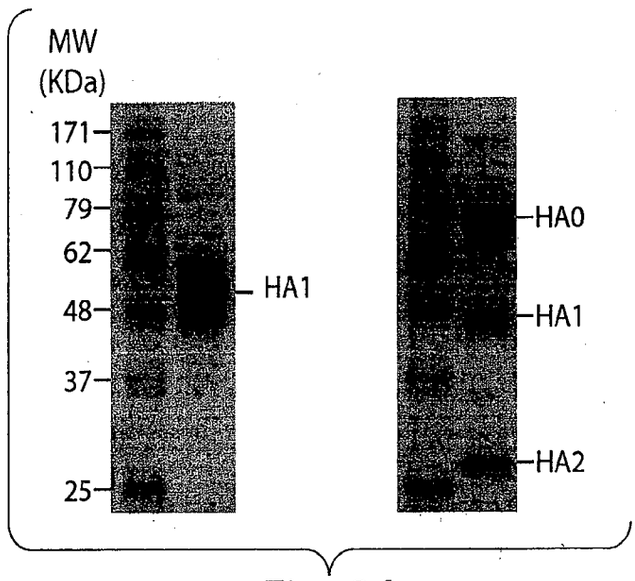

MW
(KDa)
171
110
79
62
48
37
25
HA1
HA0
HA1
HA2

Fig. 8A

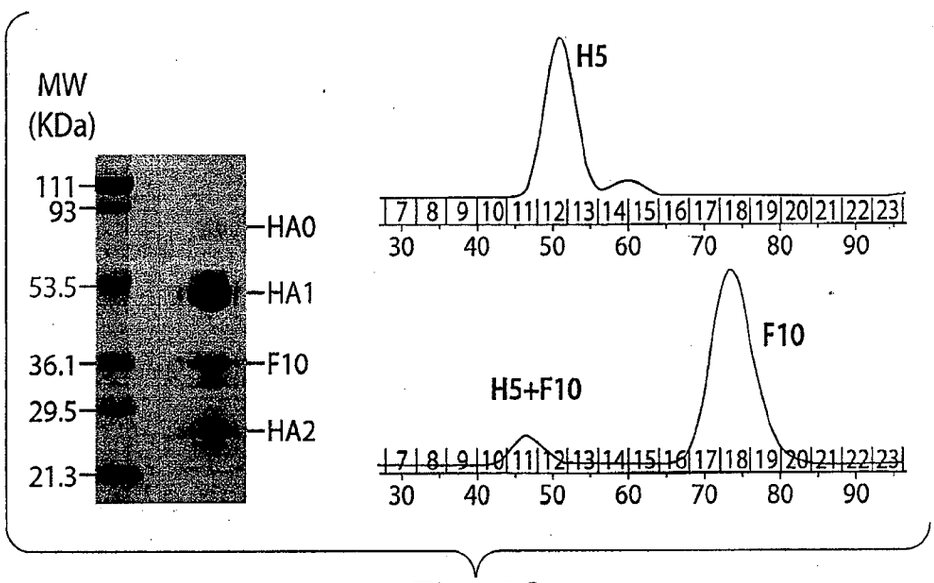

MW
(KDa)
111
93
53.5
36.1
29.5
21.3
HA0
HA1
F10
HA2
H5
7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23
30 40 50 60 70 80 90
F10
H5+F10
7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23
30 40 50 60 70 80 90

Fig. 8B

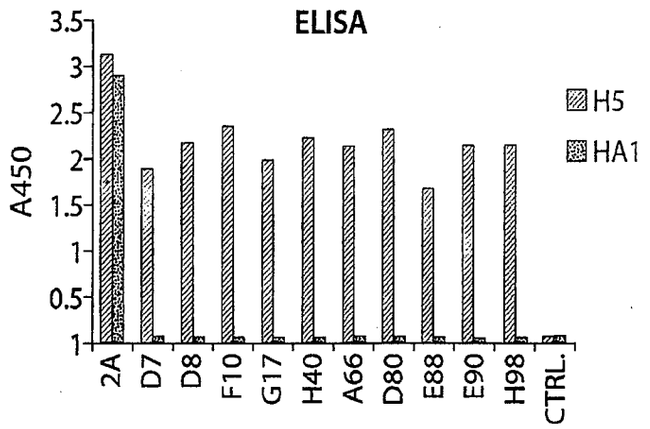

ELISA
A450
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
1
H5
HA1
2A
D7
D8
F10
G17
H40
A66
D80
E88
E90
H98
CTRL.

Fig. 9A

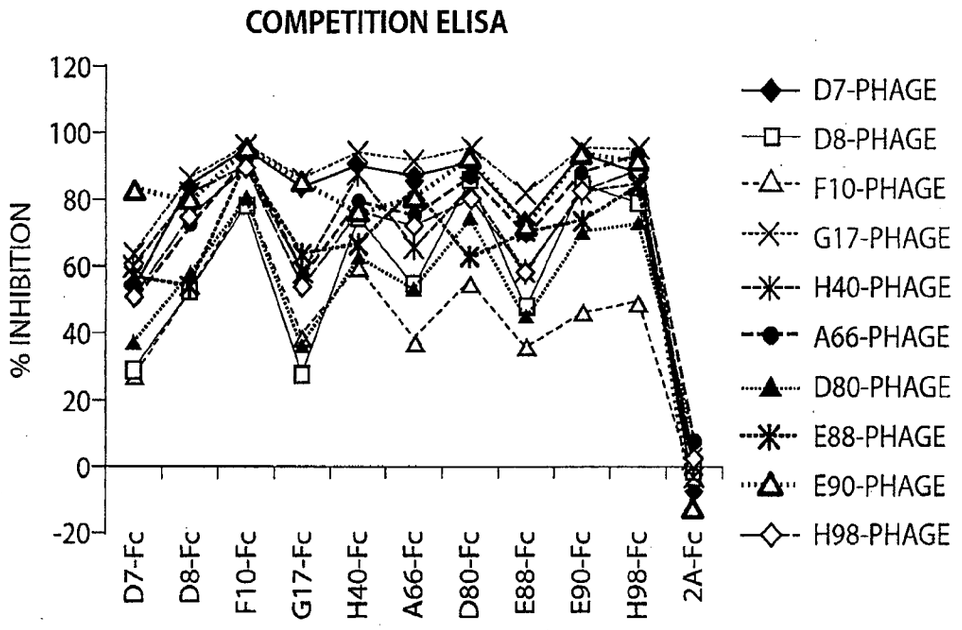
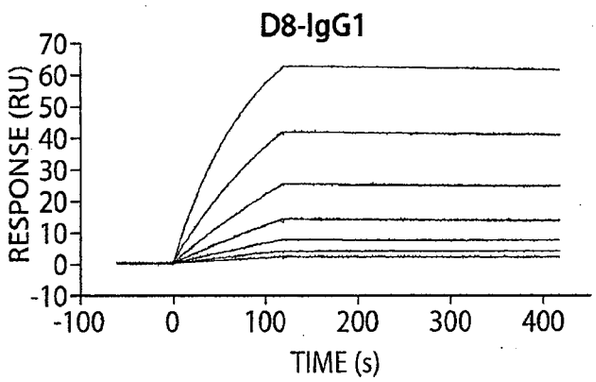
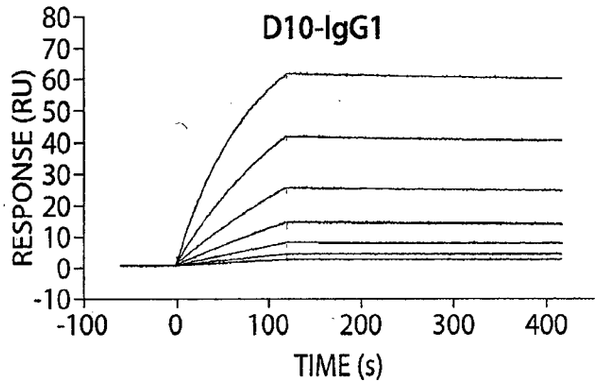
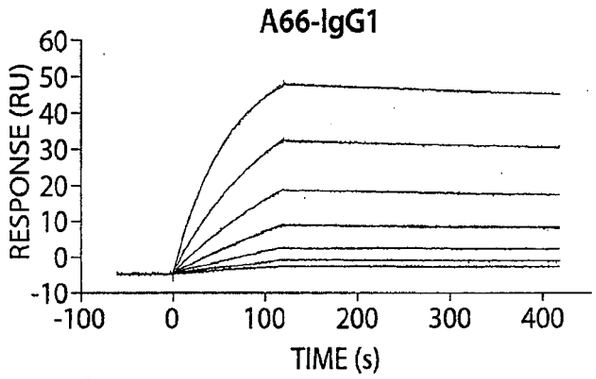

COMPETITION ELISA
% INHIBITION
120
100
80
60
40
20
0
-20
D7-Fc
D8-Fc
F10-Fc
G17-Fc
H40-Fc
A66-Fc
D80-Fc
E88-Fc
E90-Fc
H98-Fc
2A-Fc
D7-PHAGE
D8-PHAGE
F10-PHAGE
G17-PHAGE
H40-PHAGE
A66-PHAGE
D80-PHAGE
E88-PHAGE
E90-PHAGE
H98-PHAGE

Fig. 9B







$$A+B \underset{kd}{\overset{ka}{\rightleftharpoons}} AB$$

	ka (M^{-1} s^{-1} x 10^5)	*kd* (s^{-1}x10^{-4})	K_D (pM)
D8-IgG1	5.98±0.08	0.88±0.11	148±19
F10-IgG1	6.52±0.92	0.84±0.19	130±28
A66-IgG1	7.75±0.63	1.80±0.31	233±47

Fig. 10

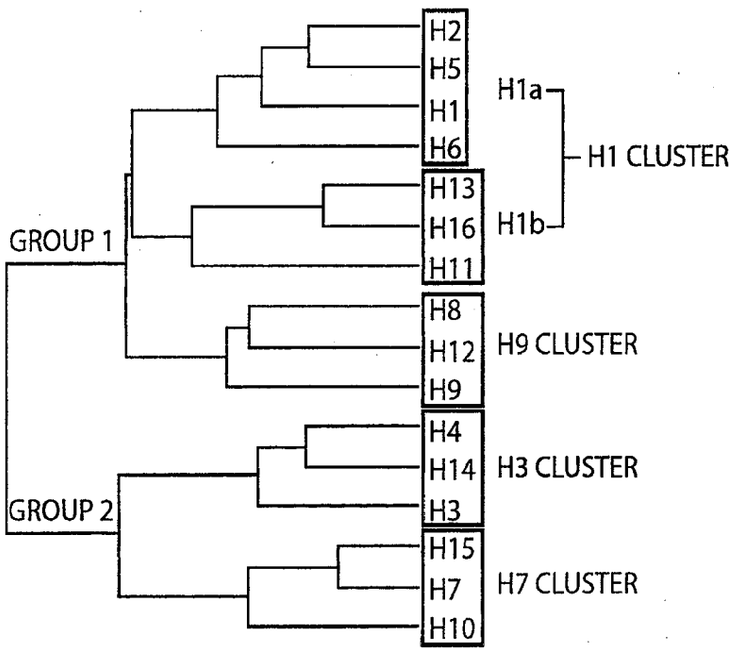

H2
H5
H1
H6
H1a
H1 CLUSTER
H13
H16
H1b
H11
GROUP 1
H8
H12
H9 CLUSTER
H9
H4
H14
H3 CLUSTER
H3
GROUP 2
H15
H7
H7 CLUSTER
H10

Fig. 11

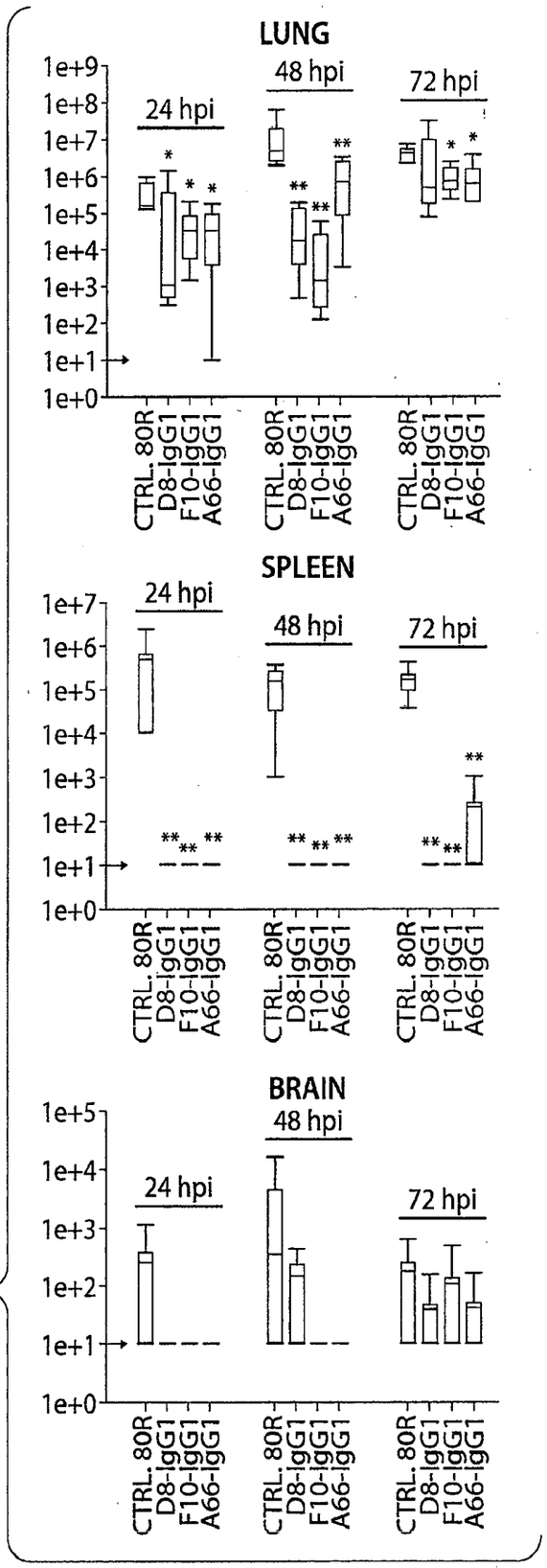

LUNG
24 hpi
48 hpi
72 hpi
1e+9
1e+8
1e+7
1e+6
1e+5
1e+4
1e+3
1e+2
1e+1
1e+0
CTRL. 80R
D8-IgG1
F10-IgG1
A66-IgG1
SPLEEN
BRAIN

Fig. 12

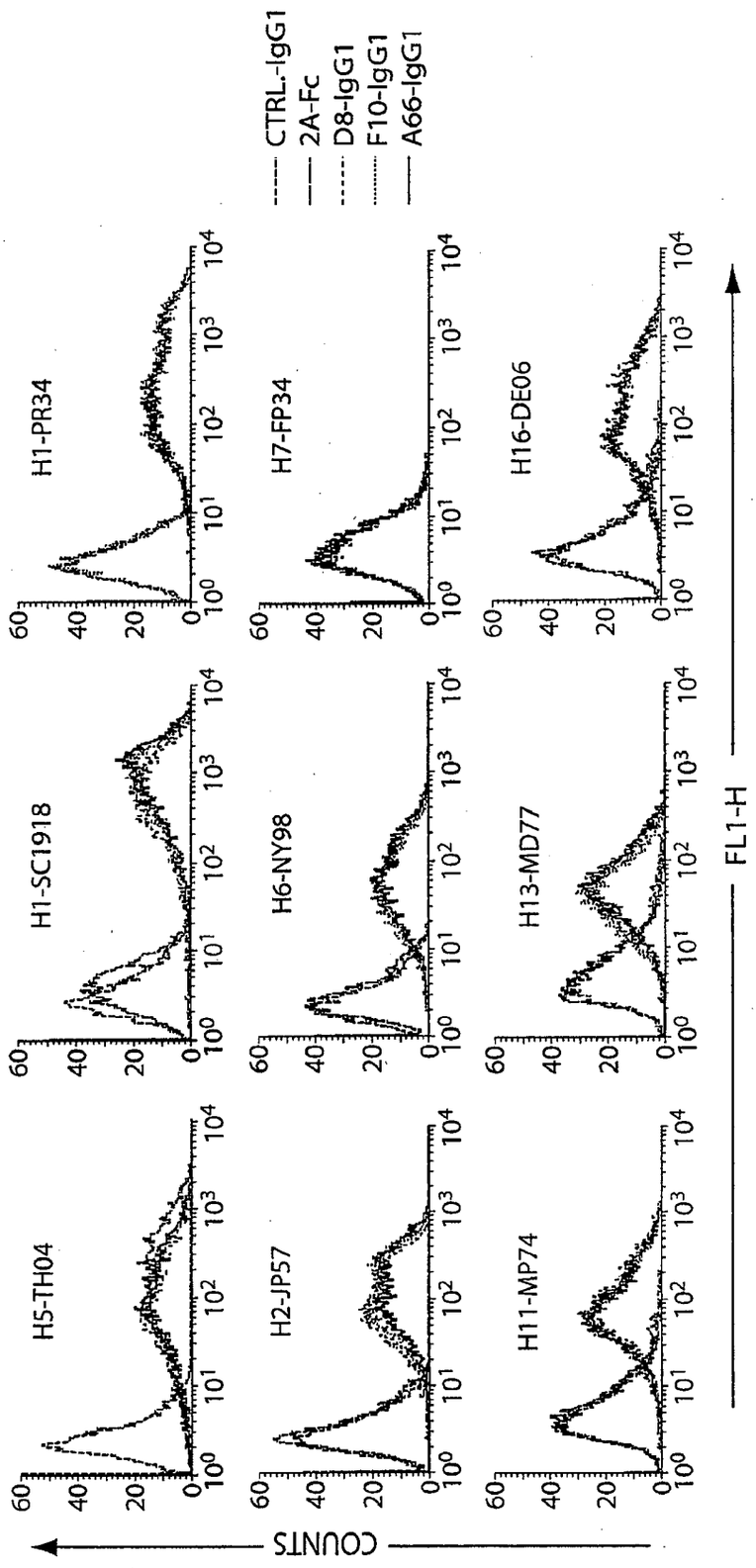

CTRL.-IgG1
2A-Fc
D8-IgG1
F10-IgG1
A66-IgG1
H1-PR34
H7-FP34
H16-DE06
H1-SC1918
H6-NY98
H13-MD77
H5-TH04
H2-JP57
H11-MP74
COUNTS
FL1-H

Fig. 13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/085876

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/10 A61K39/395 G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 631 350 A (OKUNO YOSHINOBU [JP] ET AL) 20 May 1997 (1997-05-20) the whole document	1-44, 72-75
X	OKUNO Y ET AL: "A COMMON NEUTRALIZING EPITOPE CONSERVED BETWEEN THE HEMAGGLUTIININSOF INFLUENZA A VIRUS H1 AND H2 STRAINS" JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 67, no. 5, 1 May 1993 (1993-05-01), pages 2552-2558, XP001005475 ISSN: 0022-538X the whole document	1-44, 72-75

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
21 July 2009	11/11/2009

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Weikl, Martina

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/085876

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SMIRNOV Y A ET AL: "Prevention and treatment of bronchopneumonia in mice caused by mouse-adapted variant of avian H5N2 influenza A virus using monoclonal antibody against conserved epitope in the HA stem region" ARCHIVES OF VIROLOGY, SPRINGER WIEN, AT, vol. 145, no. 8, 1 January 2000 (2000-01-01), pages 1733-1741, XP002473326 ISSN: 0304-8608 the whole document	1-44, 72-75
P,X	SUI JIANHUA ET AL: "Structural and functional bases for broad-spectrum neutralization of avian and human influenza A viruses" NATURE STRUCTURAL & MOLECULAR BIOLOGY, vol. 16, no. 3, March 2009 (2009-03), pages 265-273, XP002538005 ISSN: 1545-9985 the whole document	1-44, 72-75
A	WO 2007/089753 A (HX DIAGNOSTICS INC [US]; XIA NINGSHAO [CN]; CHEN YIXIN [CN]; GE SHENGX) 9 August 2007 (2007-08-09) the whole document	1-44, 72-75

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2008/085876

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

see ANNEX

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-44, 72-75

claims directed to antibodies binding to an epitope in the stem region of the hemagglutinin (HA) protein of an influenza virus; therapeutic and diagnostic use of these antibodies; compositions comprising these antibodies;

---

2. claims: 45-61

claims directed to methods of identifying or producing antibodies that bind specifically to a trimeric hemagglutinin (HA) protein; claims directed to methods of vaccination against influenza comprising administration of a trimeric hemagglutinin protein

---

3. claims: 62-71

claims directed to methods of producing antibodies against pathogenic enveloped viruses comprising exposing an antibody library to a membrane fusion protein of the virus; claims directed to methods of vaccination using such membrane fusion proteins

---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/085876

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5631350 A	20-05-1997	NONE	
WO 2007089753 A	09-08-2007	CA 2637837 A1	09-08-2007
		CN 101379397 A	04-03-2009
		EP 1977015 A2	08-10-2008
		JP 2009524434 T	02-07-2009
		KR 20080090532 A	08-10-2008
		US 2009068637 A1	12-03-2009

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN PCT

(21) N° de solicitud:

22) Fecha de solicitud:

(30) Prioridad (31) ***Prioridad*** (32) ***Fecha*** (33) ***País***
61/005,725 **06/12/2007** **US**
61/091,599 **25/08/2008** **US**

(51) Int Cl: **C07K 016/010**

(71)Solicitante(s) **DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC. y BURNHAM INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH**

(72) Inventor(es) **WAYNE A. MARASCO Y OTROS**

(74) Apoderado: **LUZ CLEMENCIA DE PAEZ**

(85) Fecha limite inicio fase nacional: 06/07/2010
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT
Fecha de presentación de la solicitud: 08/12/2008
No. de solicitud PCT/US2008/085876

(87) Publicación internacional
Fecha: 25/06/2009
N° publicación: ***WO 2009/079259 A9***

(54) Titulo: **ANTICUERPOS CONTRA EL VIRUS DE INFLUENZA Y MÉTODOS DE USO DE LOS MISMOS**

Reivindicación(es):

1. Un anticuerpo monoclonal aislado, donde se dice anticuerpo monoclonal enlazado a un epítopo en la región de tallo de la proteína de hemaglutinina (HA) de un virus de influenza, y neutraliza el virus de influenza A.

2. El anticuerpo monoclonal la reivindicación 1, donde se dice virus de influenza es un virus de influenza de Grupo I.

3. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1, donde se dice virus de influenza es un virus de influenza de cluster H1.

4. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 3, donde se dice virus de influenza de cluster H1 es un virus de influenza de cluster H1a o un virus de influenza de cluster Hb.

5. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1, donde se dice epítopo de es no lineal.

6. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1, donde se dice epítopo comprende el polipéptido HA1 y HA2

7. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1, aquí el epítopo se compone de aminoácido en la posición 18, 38, 40, 291 del polipéptido HA1 y el aminoácido en la posición 18, 19, 20, 21, 38, 41, 42, 45, 52, 53 y 56 del polipéptido HA2.

8. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1, donde se dice anticuerpo monoclonal que inhibe la fusión viral y de membrana celular.

9. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1, donde se dice anticuerpo monoclonal que compite con el enlace de anticuerpo monoclonal D7, D8, F10, G17, H40, A66, D80, E88, E90 O H98 a la proteína HA.

10. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1 donde se dice anticuerpo monoclonal es un anticuerpo completamente humano.

11. Un anticuerpo aislado scFv, donde se dice anticuerpo que se enlaza a un epítopo de proteína de hemaglutinina (HA) de un virus de influenza, y neutraliza el virus de influenza A.

12. El anticuerpo de la reivindicación 11, donde se dice virus de influenza es un virus de influenza del Grupo I.

13. El anticuerpo de la reivindicación 11, donde se dice virus de influenza es virus de influenza de cluster H1.

14. El anticuerpo de la reivindicación 11, donde se dice virus de influenza de cluster H1 es un virus de influenza de cluster H1a.

15. El anticuerpo de la reivindicación 11, donde se dice es no lineal.

16. El anticuerpo de la reivindicación 11, aquí epítopo comprende el polipéptido HA1 y HA2.

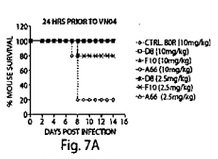


Fig. 7A

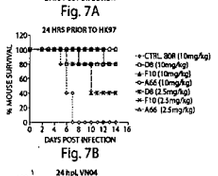


Fig. 7B

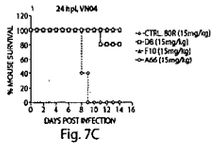


Fig. 7C

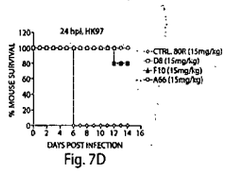


Fig. 7D

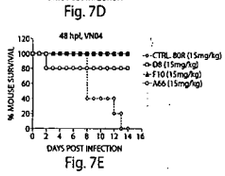


Fig. 7E

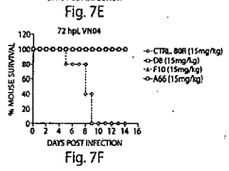


Fig. 7F

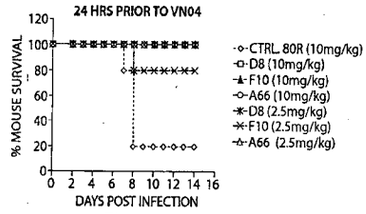


Fig. 7A

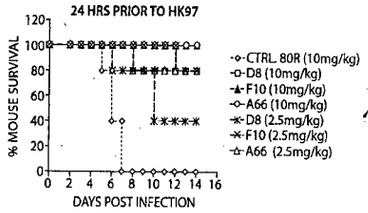


Fig. 7B

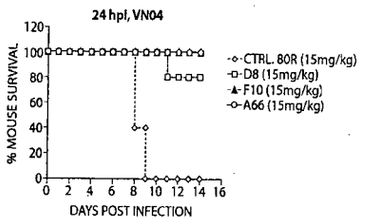


Fig. 7C

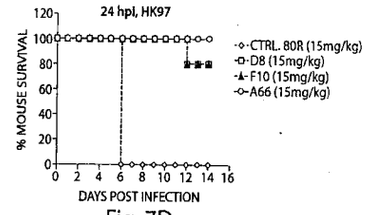


Fig. 7D

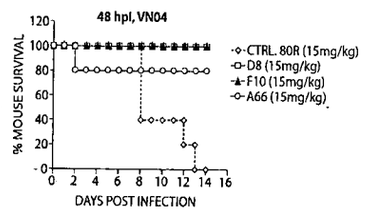


Fig. 7E

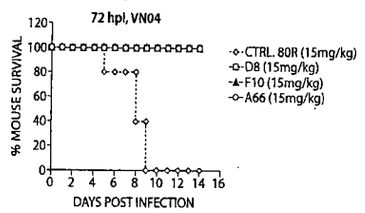


Fig. 7F

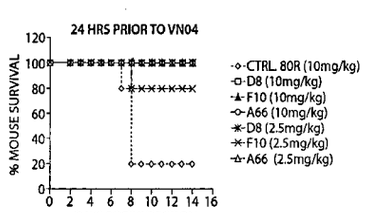


Fig. 7A

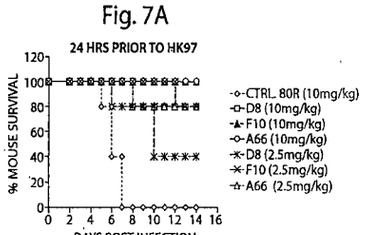


Fig. 7B

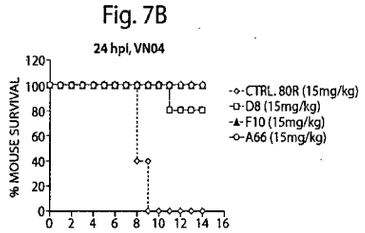


Fig. 7C

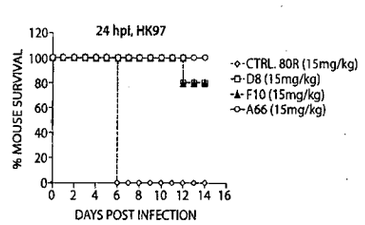


Fig. 7D

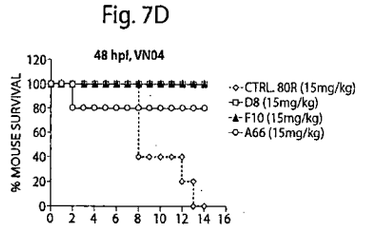


Fig. 7E

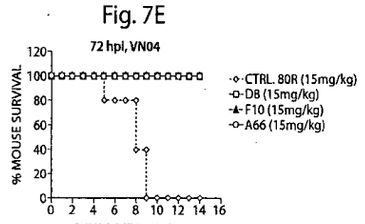
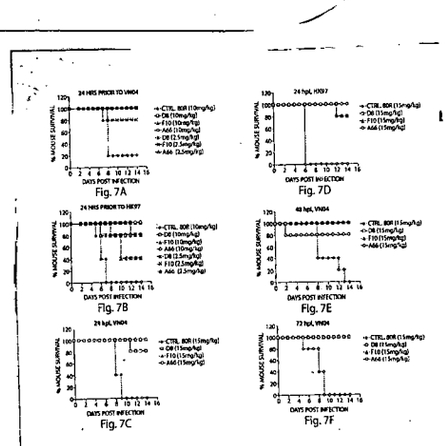


Fig. 7F



Así las cosas, se hace necesario ahondar en cada clase de conexión para permitir al suscriptor tener claridad en la aplicación de las tarifas aceptadas por la Comisión de Regulación de Telecomunicaciones. Así pues, en el acceso a través de Internet por demanda (01948XXXXXXX) en donde el suscriptor únicamente paga lo que consume, el cobro de las tarifas puede ser integral, esto es, que la tarifa que se cobra por este concepto incluye, tanto el componente local TPBCL como el acceso a Internet por medio del proveedor de Internet ISP (por sus siglas en inglés). Sin embargo también está el caso en el cual el cobro de la conexión se hace de manera disgregada, en donde por un lado el portador del servicio de Internet cobra lo concerniente al servicio de TPBCL (Tarifa plana y reducida) y por otro lado está el prestador del servicio de Internet (ISP) que dispone los servidores necesarios para lograr el acceso a Internet.

Ahora bien y con el fin de brindar mayores posibilidades de acceso a Internet y buscar mecanismos que permitieran aumentar el consumo de Internet, la CRT expidió la resolución CRT 307 de 2000 que establece como obligación de los operadores TPBCL, el de ofrecer tarifas diferenciales a quienes a través de la red TPBCL accedieran a proveedores de Internet (ISP). Bajo este esquema se establecieron regulatoriamente la tarifa plana y reducida que se explican a continuación.

En la tarifa reducida el operador local está en la obligación de aplicar las siguientes tarifas a las llamadas locales que se utilicen para acceder a Internet y no es necesario inscribirse en ningún tipo de plan:

Existen dos tarifas según el horario en que se realice la llamada para acceder a Internet, una en el horario de 8:00 a.m. a 8:00 p.m. (día) y otra en el horario de 8:00 p.m. a 8:00 a.m. (noche). Sin embargo, en caso de no estar en capacidad técnica de cumplir con lo dispuesto anteriormente, el operador de TPBCL aplicará una tarifa máxima por cada tres minutos o fracción.

En cuanto a la tarifa plana, el usuario residencial podrá inscribirse dentro de los cinco días anteriores al cierre de su periodo de facturación a un plan en el cual por una suma específica el operador debe ofrecer, como mínimo, 90 horas mensuales de consumo por concepto de llamadas locales utilizadas para acceder a Internet. No obstante lo anterior, si por razones técnicas el operador no puede ofrecer dicho plan, deberá ofrecer una tarifa plana a todos sus usuarios residenciales consistente en un cargo fijo mensual e independiente del consumo para todas las llamadas locales.

Es importante tener en cuenta que la resolución CRT 785 de 2003, modificó los valores de actualización de los valores de la tarifa del servicio TPBCL, inicialmente definidas en la resolución 307 de 1999 de la misma Comisión.

Ahora bien, en caso que el proveedor no cuente con un número 01947XXXXXXX para realizar la conexión a Internet en el área de ubicación de donde se pretende realizar la conexión, se hace necesario que la conexión se realice por medio de dos servicios diferentes; por un lado, el servicio de telefonía básica conmutada para el acceso a Internet y por el otro, el de Internet propiamente dicho.

5.4 Oportunidad de facturación

Adicionalmente y considerando que el operador manifiesta en su comunicación del 10 de enero de 2007, que los consumos facturados en el mes de octubre de 2006 corresponden a las conexiones de Internet realizadas durante el periodo de agosto de 2006, es menester analizar si la sociedad operadora cumplió con su obligación de facturar oportunamente los cargos correspondientes al servicio prestado, por lo anterior debe precisarse en primer lugar el marco normativo dentro del cual debe cumplirse, por parte del operador, la

796

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 14,398
FECHA : FEBRERO 22 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 10-081516- -00000-0000

Fecha: 2010-07-06 17:36:45 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 300

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	175552554	22/02/2010	57,025,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	5 TRAMITES DE SOL. DE MODELO DE UTI	325,000.00
		TOTAL : $	325,000.00

SON: TRESCIENTOS VEINTICINCO MIL PESOS

RESPONSABLE: _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

Cb 17756-891-001-9

297

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 34,533
FECHA : MAYO 4 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 10-081516- -00000-0000
Fecha: 2010-07-06 17:36:45 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 300

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	175534520	03/05/2010	61,670,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	93 TASA ANUAL MANTENIMIENTO MODELO D	174,000.00
		TOTAL : $	174,000.00

SON: CIENTO SETENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

Polo - 17750-841-001-9

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 48,304
FECHA : JUNIO 15 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 10-081516- -00000-0000

Fecha: 2010-07-06 17:36:45 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 300

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	132666984	15/06/2010	51,356,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-03 CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICA	12 MARCAS Y LEMAS COMERCIALES	114,000.00
		TOTAL : $	114,000.00

SON: CIENTO CATORCE MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

CAO 17756-891-0029

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 52,230
FECHA : JUNIO 28 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-081516- -00000-0000
Fecha: 2010-07-06 17:36:45 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 300

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	175542485	28/06/2010	62,897,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-02 PRORROGAS Y RENOVACIONES	30 PRORROGAS Y RENOVACIONES	819,000.00
		TOTAL : $	819,000.00

SON: OCHOCIENTOS DIEZ Y NUEVE MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

CDO 17756-84-001-9

300

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 52,231
FECHA : JUNIO 28 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 10-081516- -00000-0000

Fecha: 2010-07-06 17:36:45 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 300

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	175542485	28/06/2010	62,897,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-02 PRORROGAS Y RENOVACIONES	30 PRORROGAS Y RENOVACIONES	819,000.00
		TOTAL : $	819,000.00

SON: OCHOCIENTOS DIEZ Y NUEVE MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

Colo 17756- 841-0019

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
SUAREZ DE PAEZ LUZ CLEMENCIA
Apoderado(a) y/o Representante de
BURNHAM INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH

REFERENCIA	Radicación No.	10 081516
	Solicitud internacional	PCT/US2008/085876
	Fecha inicio fase nacional	06/07/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	09486

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

2. El solicitante debe presentar un nuevo titulo que permita identificar la materia de la cual trata la solicitud, ya que el titulo relacionado no se encuentra con la precisión necesaria para identificar claramente el objeto de la solicitud de patente. (Regla 4.3 PCT, Art 26-27 D-486, Circular única 5.2.9)

3. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Continua en la página siguiente...

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 30 JUL. 2010.
adpa11

Sede Centro: Carrera 13 No. 27-00 Pisos 2, 5 , 7 y 10 PBX: 5870000
Sede CAN: Av. Cra 50 No. 26-55 int. 2 Tel: 5880070
Call Center 6513240. Línea 01800-910165
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co