

CAVELIER

ABOGADOS

www.cavelier.com
cavelier@cavelier.com

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4 No. 72 - 35
BOGOTÁ 8, COLOMBIA

Teléfono: (57-1) 347 3611
Telefax: (57-1) 211 8650
(57-1) 700 4814
Fax in U.S.A.: (1-305) 675 7743

Señora Directora

DIRECCION DE NUEVAS CREACIONES

Superintendencia de Industria y Comercio

E. S. D.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-081516- -00002-0000

Fecha: 2010-09-29 17:08:38 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 212

Trámite : 011

Evento : 378

Actuación : 444

Referencia : Expediente No. 10.081.516
Asunto : Solicitud de patente para: **COMPOSICIÓN QUE COMPRENDE UN ANTICUERPO MONOCLONAL O EL ANTICUERPO scFv ENLAZADO A UN EPÍTOPO EN LA REGIÓN DE TALLO DE LA PROTEINA DE HEMAGLUTININA (HA)**
Solicitantes : **DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC. y BURNHAM INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH**
Fecha solicitud : 6 de julio de 2010

1. Yo, Luz Clemencia de PÁEZ, obrando como apoderada de las sociedades solicitantes en el asunto antes identificado, me refiero al Oficio No. 9486, notificado por fijación en lista del 30 de julio de 2010.

2. Mediante el oficio No. 9486 se puso en conocimiento del solicitante el resultado del examen de forma realizado por ese Despacho, requiriéndole para completar los siguientes requisitos:

2.1. **Poder conferido por las solicitantes:** Acompaño con este escrito los poderes conferidos por las compañías **DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC. y BURNHAM INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH**, así como los documentos que acreditan la existencia y representación legal de las mismas, los cuales forman parte integral de los poderes. Estos documentos se presentan debidamente notarizados y legalizados por Apostilla, junto con la correspondiente traducción al español.

- 2.2. **Nuevo título:** De acuerdo con el resultado del primer examen de forma se requiere presentar nuevo título que permita identificar la materia de la cual trata la solicitud. Por lo tanto, solicito que el título de la patente sea modificado por:

“COMPOSICIÓN QUE COMPRENDE UN ANTICUERPO MONOCLONAL O EL ANTICUERPO scFv ENLAZADO A UN EPÍTOPO EN LA REGIÓN DE TALLO DE LA PROTEINA DE HEMAGLUTININA (HA)”.

Para efectos de la modificación del título, acompaño con este escrito el correspondiente Formulario Único de Modificaciones y Correcciones.

- 2.3. **Cesión del derecho a la patente de los inventores a favor de las solicitantes:**
Anexo al presente escrito los siguientes documentos:

- 2.3.1 Documento en que consta la cesión de derechos de los inventores Wayne A. Marasco y Jianhua Sui a favor de la sociedad **DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.**, debidamente notariado y legalizado por Apostilla, junto con la correspondiente traducción oficial al español.

- 2.3.2 Documento en que consta la cesión de derechos del inventor Robert C. Liddington a favor de la sociedad **BURNHAM INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH**, debidamente notariado y legalizado por Apostilla, junto con la correspondiente traducción oficial al español.

3. Adicionalmente presento con este escrito una nueva descripción, reivindicaciones y figuras de la solicitud original, en las cuales se han realizado correcciones de forma.

- 3.1. En la descripción se corrigió las referencias de las figuras indicadas en los siguientes párrafos:

- Página 13, líneas 1-3 del texto inglés, se indicó como referencia la Figura 4, siendo correcto la Tabla 1B;
- Página 18, líneas 5-6 del texto inglés, se indicó como referencia Figura 6, siendo correcto las Figuras 4A y 4B;
- Página 19, líneas 20-22 del texto inglés, se indicó como referencia Figuras 4 y 6, siendo correcto la Figura 6;
- Página 19, líneas 32-33 del texto inglés, se indicó como referencia Fig. 12d, e, siendo correcto Figuras 6B y 6C;
- Página 20, líneas 4-5 del texto inglés, se indicó como referencia Fig.12b c, siendo correcto Figura 4D;

- Página 21, líneas 14-18 del texto inglés, se indicó *“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 VH y VL de los anticuerpos 11A y 256 se muestran en la figura 1 y la figura 6 respectivamente.”* No debe existir la referencia a las figuras 1 y 6, por lo tanto el texto correcto es: *“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”;*
- Página 57, líneas 14-15 del texto inglés, se indicó como referencia la Figura 4, siendo correcto Tabla 1B;
- Página 58, líneas 17-24 del texto inglés, se indicó como referencia la Figura 6 panel inferior derecho, siendo correcto Figuras 4A-4C;
- Página 58, líneas 25-26 del texto inglés se indicó como referencia la Figura 6 del panel superior derecho, siendo correcto Figuras 4A-4C y 9B;
- Página 58, líneas 33 a página 59 línea 10, se indicó como referencia la Figura 4, siendo correcto Figura 4A; así mismo se corrigió la referencia a la Figura 16 por Figura 9 y la referencia a la Figura 17 por la Figura 10;
- Página 59, líneas 23-25, se indicó como referencia la Figura 7, siendo correcto Figuras 10A y 10B;
- Página 62, líneas 20-22, se indicó como referencia las Figs. 4 y 6, siendo correcto únicamente Figura 6;
- Página 62, líneas 32-33, se indicó como referencia Fig. 12d,e, siendo correcto Figura 6;
- Página 63, líneas 4-5, se indicó como referencia Fig.12b c, no siendo necesaria una indicación de referencia;
- Página 63, líneas 31-33, se indicó como referencia Fig.6a, siendo correcto Figura 6D.

- 3.2. En cuanto a las figuras se presenta una nueva figura 7, la cual incluye las Figuras 7G y 7H de la Solicitud original.
- 3.3. Adicionalmente, se presenta un nuevo pliego reivindicatorio conformado por 38 reivindicaciones, sobre el cual solicito se efectúe el correspondiente examen de patentabilidad.

Solicito a ese Despacho tener en cuenta que acompaño con este escrito el correspondiente Formulario Único de Modificaciones y Correcciones, en el cual se informa

sobre las correcciones y modificaciones anteriores. Así mismo presento el recibo de pago de la tasa oficial por concepto de modificaciones de solicitud en trámite por \$114.000.00, teniendo en cuenta que se presenta una nueva figura 7 y un nuevo capítulo reivindicatorio.

4. Puesto que se han atendido a cabalidad las observaciones hechas por su Despacho sobre la presente solicitud de patente, atentamente solicito que se continúe su tramitación.

Señora Directora,

Luiz Clemencia Góes Paéz
LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

C.C. No. 35.456.344 de Usaquén

T.P.A. 23.555

COLO-17756-841-001-9

Cb/ JGG\JGG\ID-179493\WPC17756
No. M-2010-179493\JGG

Espacio reservado para el adhesivo de radicación

FORMULARIO UNICO DE CORRECCIONES Y MODIFICACIONES
2000-10

1	SOLICITUD DE:	
☒ Corrección de Error Material		☐ Modificación a una solicitud
2 SOLICITANTE	Nombre: DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC. y BURNHAM INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH Sociedades constituidas y existentes bajo las leyes del Estado de Massachusetts y el Estado de California, Estados Unidos de América, respectivamente Dirección: 44 Binney Street, Boston, Massachusetts 02115, Estados Unidos de América y 10901 North Torrey Pines Road, La Jolla, California 92037, Estados Unidos de América Teléfono: 546 09 70 E-mail: clientes@cavelier.com Fax: 249 40 70 Domicilio: Boston, Massachusetts, Estados Unidos de América y La Jolla, California, Estados Unidos de América, respectivamente.	IDENTIFICACION C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Número: _____
3 REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: Luz Clemencia de PÁEZ Dirección: Carrera 4ª No. 72-35 Teléfono: 347 36 11 E-mail: cavelier@cavelier.com Fax: 217 92 11 Domicilio: Bogotá, Colombia	IDENTIFICACION C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Número: <u>35.456.344</u> TP <u>23.555</u>
4	Número de expediente: <u>10.081.516</u> Clase: <u>C07K 016/010</u> Título del Invento: COMPOSICIÓN QUE COMPRENDE UN ANTICUERPO MONOCLONAL O EL ANTICUERPO scFv ENLAZADO A UN EPÍTOPO EN LA REGIÓN DE TALLO DE LA PROTEINA DE HEMAGLUTININA (HA)	

357

5

Descripción de la corrección o modificación solicitada:

Solicito a ese Despacho tener en cuenta las siguientes modificaciones y correcciones formales:

1. El título de la invención ha sido modificado de "ANTICUERPOS CONTRA EL VIRUS DE INFLUENZA Y MÉTODOS DE USO DE LOS MISMOS" por "**COMPOSICIÓN QUE COMPRENDE UN ANTICUERPO MONOCLONAL O EL ANTICUERPO scFv ENLAZADO A UN EPÍTOPO EN LA REGIÓN DE TALLO DE LA PROTEÍNA DE HEMAGLUTININA (HA)**".
2. Presento un nuevo capítulo descriptivo, reivindicatorio y figuras en el cual se realizaron correcciones de forma en cuanto a la referencia de las figuras.
3. Presento una nueva Figura 7, que contiene las Figuras 7G y 7H de la Solicitud original.
4. Presento un nuevo pliego reivindicatorio conformado por 38 reivindicaciones, sobre el cual solicito se efectúe el correspondiente examen de patentabilidad.

6

Comprobante de pago No. 10-74,192**Fecha:** 6 de septiembre de 2010

7

Anexos:

Comprobante de pago de la tasa por concepto de modificación de solicitud en trámite por \$114.000.oo.



Poderes, si fuere el caso



Certificado de existencia y representación legal, cuando el solicitante sea persona jurídica

8

NOMBRE: LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ**FIRMA:**Luz Clemencia de Páez

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

JGG/ID.179494

Notaría
Sexta

6

DEL CIRCULO DE BOGOTA, D.C.

COPIA NUMERO 2

DE LA ESCRITURA NUMERO:
FECHA: 23/Septiembre/2010

5088

ACTO O CONTRATO:
PODER ESPECIAL
OTORGANTES:
CAVELIER ABOGADOS
LUZ CLEMENCIA DE PAEZ



CERTIFICADO SC 3980-1
PRESTACION DEL
SERVICIO PUBLICO
NOTARIAL
ISO 9001:2000
NTC-ISO 9001:2000



AMPARO QUINTERO ARTURO

NOTARIA SEXTA

CARRERA 9 No. 69-31 - PBX: 317 01 00 - FAX: 314 56 41

Correo Electrónico: notaria6debgta@etb.net.co



ESCRITURA PUBLICA NUMERO 5088 -----
CINCO MIL OCHENTA Y OCHO -----
DE FECHA: SEPTIEMBRE VEINTITRES (23) -
DEL AÑO DOS MIL DIEZ (2.010) -----
OTORGADA EN LA NOTARIA SEXTA (6ª.) DEL
CÍRCULO NOTARIAL DE BOGOTÁ, D.C. -----

ACTO: PODER -----

PODERDANTE: CAVELIER ABOGADOS Nit. 860.041.367-3

APODERADOS: -----

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ C.C. 35.456.344

NIDIA OSORIO LOPEZ C.C. 39.787.682

OSCAR FERNANDO CORREA BARBOSA C.C. 79.524.634

EDNA DARMELY SARMIENTO CHARRY C.C. 52.006.265

JORGE CHAVARRO ARISTIZABAL C.C. 16.209.380

En la ciudad de Bogotá, Distrito Capital, República de Colombia, ante mí **JAIME VARGAS CHAMBO** --- Notaria(o) Sexta(o) (6) ENCARGADO - de este Círculo Notarial, se otorgó la escritura pública que se consigna en los siguientes términos: -----

Compareció: con minuta escrita la señora **ADRIANA ZAPATA GIRALDO**, mayor de edad, vecina de esta ciudad, casada, identificada con la cédula de ciudadanía No. 51.680.061 de Bogotá, y dijo: -----

----- ESTIPULACIONES -----

PRIMERA: Que obra en su calidad de Representante Legal de la sociedad denominada **CAVELIER ABOGADOS** domiciliada en la Carrera 4 No. 72-35, Bogotá, Colombia. -----

SEGUNDA: Que **DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.**, sociedad constituida y existente bajo las leyes del Estado de Massachussets, Estados Unidos de América, domiciliada en 44 Binney Street, Boston, Massachussets, 02115, Estados Unidos de América, designó a **CAVELIER ABOGADOS** como su representante para la Propiedad Industrial en Colombia con facultades de nombrar apoderados tal como consta en la copia auténtica del documento de representación que se protocoliza. -----

TERCERA: Que en su carácter de representante legal de **CAVELIER ABOGADOS**, y en desarrollo de la facultad otorgada por **DANA-FARBER**



CANCER INSTITUTE, INC., confiere poder a los abogados **LUZ CLEMENCIA DE PAEZ**, T.P.A. No. 23.555, identificada con cédula de ciudadanía número **35.456.344** de Usaquen, **NIDIA OSORIO LOPEZ**, T.P.A. No.73.366, identificada con cédula de ciudadanía número **39.787.682** de Bogotá, **OSCAR FERNANDO CORREA BARBOSA**, T.P.A. No. 71.027 identificado con cédula de ciudadanía número **79.524.634** de Bogotá, **EDNA DARMELY SARMIENTO CHARRY**, T.P.A. 65.794 identificada con cédula de ciudadanía número **52.006.265** de Bogotá y **JORGE CHAVARRO ARISTIZABAL**, T.P.A. No. 40.119, identificado con cédula de ciudadanía número **16.209.380** de Cartago (Valle), mayores de edad, vecinos de Bogotá, para que representen a la sociedad a cuyo nombre actúa, ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, incluyendo las del orden administrativo, contencioso administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: -----

a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, diseños industriales, trazado de circuitos integrados, secretos industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, variedades vegetales, denominaciones de origen e indicaciones de procedencia, su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos -----

b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones, cancelación administrativa o judicial, nulidad, medidas cautelares, acción por infracción, concesión de licencias, la protección de secretos industriales y de nombres de dominio junto con su administración y pago; acciones populares, de tutela y de cumplimiento; y en general los procesos civiles, penales, administrativos o contencioso administrativos, de conciliación, arbitramento, tutela relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. -----

CUARTO: Que los apoderados designados están facultados en todos los asuntos arriba determinados para sustituir este mandato, transigir, conciliar, arbitrar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar y ratificar los actos de agentes oficiosos. -----

QUINTO: Que protocoliza con la presente escritura, un certificado expedido por la Cámara de Comercio de Bogotá, que acredita la constitución y personería de la

7.710	10-X-1.984	6A. BTA.	15-XI-1.984-NO.	1.559
7.305	21-X-1.985	6A. BTA.	18-XI-1.985-NO.	1.906
2.567	29-IV-1.987	6A. BTA.	7-V- 1.987-NO.	2.386
4.278	3-VII-1.987	6A. BTA.	23-VII-1987 NO.	215.652
2.657	25- IV-1.988	6A. BTA.	19- V -1988-NO.	2,740
9.033	21-XII-1.990	6A. BTA.	10- I - 1991-NO.	3.786
25	3- I -1.991	6A. BTA.	10- I - 1991-NO.	3.787
1.608	8-III-1.991	6A. BTA.	14-III- 1991-NO.	3.841
2.155	2-IV- 1.991	6A. BTA.	8-IV - 1991-NO.	3.862
797	7-II -1.991	6A. BTA.	7- V -1991-NO.	3.882
1.739	14-III-1.991	6A. BTA.	7- V -1991-NO.	3.881
5.886	21-VIII-1.991	6A. BTA.	27-VIII-1991 NO.	4.019
8.596	4-XII -1.991	6A. BTA.	16-III -1992 NO.	4.430
1.494	10-III -1.992	6A. BTA.	19-III -1992 NO.	4.436
4.205	8 -VII -1.992	6A. BTA.	15-VII -1992 NO.	4.554
8.829	16-XII -1.992	6A. BTA.	24-XII -1992 NO.	4.819
12	5-I -1.993	6 STAFE BTA	13-I -1993 NO.	4.850
4.877	29-VI -1.993	6 STAFE BTA	7-VII -1993 NO.	5.065
5.216	12-VII -1.993	6 STAFE BTA	16-VII -1993 NO.	5.077
ACTA NO.71	2-IX- 1.993	JUNTA DE SOCIOS	29-IX- 1993 NO.	5.174
2.034	18-IV- 1.995	6 STAFE BTA	27- IV -1995 NO.	5.937
2.227	25-IV-1.995	6 STAFE BTA	18-VIII-1.995 NO.	6.092
7.594	12-XII-1.995	6 STAFE BTA	19- XII-1.995 NO.	6.294
676	11- II-1.997	6 STAFE BTA	14- II -1.997 NO.	6.873

CERTIFICA:

REFORMAS:

E.P. NO.	FECHA	NOTARIA	CIUDAD	FECHA	NO. INSC.
0004506	1997/07/28	0006 BOGOTA D.C.	1997/09/02	00007115	
0002103	1998/04/08	0006 BOGOTA D.C.	1998/04/21	00007426	
0005326	1998/08/06	0006 BOGOTA D.C.	1998/08/13	00007544	
0005538	1998/08/14	0006 BOGOTA D.C.	1998/08/27	00007564	
0007760	1998/11/10	0006 BOGOTA D.C.	1998/11/12	00007644	
0006709	1997/11/04	0006 BOGOTA D.C.	2000/12/04	00008481	
0003034	2003/05/30	0006 BOGOTA D.C.	2003/06/04	00882729	
0003786	2004/07/16	0006 BOGOTA D.C.	2004/07/28	00009703	
0001432	2005/03/18	0006 BOGOTA D.C.	2005/04/07	00009917	
0004818	2005/08/22	0006 BOGOTA D.C.	2005/08/26	00010008	
0005506	2007/07/17	0006 BOGOTA D.C.	2007/07/24	00010841	
5453	2009/10/19	0006 BOGOTA D.C.	2009/10/21	00012243	
1336	2010/03/16	0006 BOGOTA D.C.	2010/03/24	00012506	

CERTIFICA:

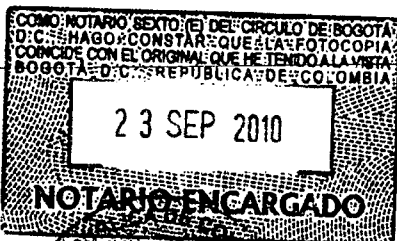
VIGENCIA: QUE LA SOCIEDAD NO SE HALLA DISUELTA. DURACION HASTA EL 10 DE SEPTIEMBRE DE 2024 .

CERTIFICA:

OBJETO SOCIAL: LA SOCIEDAD TENDRA POR OBJETO : EL EJERCICIO DE LA ACTIVIDAD PROFESIONAL DE ABOGADOS. EN DESARROLLO DE ESTE OBJETO LA SOCIEDAD PODRA ADQUIRIR, CONTRAER OBLIGACIONES Y CELEBRAR TODA CLASE DE CONTRATOS DIRECTAMENTE RELACIONADOS Y SUBORDINADOS AL MISMO, INCLUSIVE LOS DE ARRENDAMIENTO, HIPOTECA, MUTUO CON O SIN INTERES, MANDATO CIVIL Y COMERCIAL, Y SOCIEDAD, ASI COMO PARTICIPAR EN ASOCIACIONES CIENTIFICAS, GREMIALES O PROFESIONALES SIN ANIMO DE LUCRO.

CERTIFICA:

CAPITAL Y SOCIOS: \$10,000.00 DIVIDIDO EN 10,000.00 CUOTAS CON VALOR NOMINAL DE \$1.00 CADA UNA, DISTRIBUIDO ASI :
- SOCIO CAPITALISTA (S)





01



* 9 7 1 3 9 3 2 7 *

9

CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE CHAPINERO

14 DE SEPTIEMBRE DE 2010 HORA 15:12:02

R029365395

PAGINA: 2 de 3

ASOCIACION CAVELIER DEL DERECHO	N.I.T. 000008001722568
NO. CUOTAS: 8,800.00	VALOR: \$8,800.00
GAUDEBERT DE CAVELIER AGNES JEANNE	C.E. 000000000131100
NO. CUOTAS: 1,200.00	VALOR: \$1,200.00
- SOCIO INDUSTRIAL (S)	
SUAREZ DE PAEZ LUZ CLEMENCIA	C.C. 000000035456344
NO. CUOTAS: 0.00	VALOR: \$0.00
CHAVARRO JORGE	C.C. 000000016209380
NO. CUOTAS: 0.00	VALOR: \$0.00
TOTALES	
NO. CUOTAS: 10,000.00	VALOR: \$10,000.00

CERTIFICA:

QUE POR ESCRITURAS PUBLICAS NO. 001431 Y 001432 DEL 18 DE MARZO DE 2005 DE LA NOTARIA 06 DE BOGOTA D.C., INSCRITA EL 07 DE ABRIL DE 2005 BAJO EL NO. 0009918 Y 0009917, RESPECTIVAMENTE DEL LIBRO XIII, DE LAS MIL DOSCIENTAS (1200) PARTES DE INTERES SOCIAL RADICADAS EN CABEZA DE AGNES GAUDEBERT DE CAVELIER, SEISCIENTAS (600) PARTES ESTAN GRAVADAS O AFECTADAS EN PROPIEDAD FIDUCIARIA A FAVOR DE LAS SIGUIENTES PERSONAS : GERMAN CAVELIER FRANCO, ERNESTO CAVELIER FRANCO, JORGE CAVELIER FRANCO, INES CAVELIER FRANCO, GUILLERMO CAVELIER FRANCO, ELENA CAVELIER FRANCO, ALEJANDRO CAVELIER FRANCO, BEATRIZ CAVELIER FRANCO, Y LUCIA CAVELIER FRANCO.

CERTIFICA:

REPRESENTACION LEGAL: EL REPRESENTANTE LEGAL ES EL DIRECTOR. EL SOCIO FUNDADOR GERMAN CAVELIER GAVIRIA TENDRA EL CARACTER DE PRESIDENTE DIRECTOR VITALICIO, PARTICIPARA POR DERECHO PROPIO EN EL CONSEJO SUPERIOR Y EN EL CONSEJO DIRECTIVO Y LLEVARA LA REPRESENTACION LEGAL DE LA SOCIEDAD CUANDO LO ESTIME PERTINENTE SIN LIMITACION ALGUNA. IGUAL PARTICIPACION Y ATRIBUCIONES TENDRA SU SUPLENTE AGNES GAUDEBERT DE CAVELIER CUANDO OCUPE EL CARGO, EN CASO DE FALTA ABSOLUTA DE GERMAN CAVELIER GAVIRIA. LOS SOCIOS COLECTIVOS ESTÁN AUTORIZADOS PARA EJERCER LA REPRESENTACIÓN DE LA SOCIEDAD EN CUALQUIER TIEMPO, SIN PERJUICIO DE LAS DELEGACIONES CONFERIDAS A LOS ORGANOS CREADOS POR LOS PRESENTES ESTATUTOS

CERTIFICA:

** NOMBRAMIENTOS **

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0004818 DE NOTARIA 6 DE BOGOTA D.C. DEL 22 DE AGOSTO DE 2005, INSCRITA EL 26 DE AGOSTO DE 2005 BAJO EL NUMERO 00010008 DEL LIBRO XIII, FUE (RON) NOMBRADO (S):

NOMBRE	IDENTIFICACION
PRESIDENTE DIRECTOR VITALICIO	
CAVELIER GAVIRIA GERMAN	C.C. 000000002877924

QUE POR ACTA NO. 26 DE ASAMBLEA GENERAL DEL 13 DE MAYO DE 2010, INSCRITA EL 24 DE MAYO DE 2010 BAJO EL NUMERO 00012618 DEL LIBRO XIII,

COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA
D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA
CONCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA

23 SEP 2010

NOTARIO ENCARGADO



FUE (RON) NOMBRADO (S):

NOMBRE	IDENTIFICACION
DIRECTORA	
ZAPATA GIRALDO ADRIANA	C.C. 000000051680061
REPRESENTANTE LEGAL	
ASOCIACION CAVELIER DEL DERECHO	N.I.T. 000008001722568
REPRESENTANTE LEGAL	
GALLON GIRALDO CARLOS	C.C. 000000019066425
REPRESENTANTE LEGAL	
GAUDEBERT DE CAVELIER AGNES JEANNE	C.E. 000000000131100
SOCIO COLECTIVO	
GAUDEBERT DE CAVELIER AGNES JEANNE	C.E. 000000000131100
SOCIO COLECTIVO	
ASOCIACION CAVELIER DEL DERECHO	N.I.T. 000008001722568

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0004818 DE NOTARIA 6 DE BOGOTA D.C. DEL 22 DE AGOSTO DE 2005, INSCRITA EL 26 DE AGOSTO DE 2005 BAJO EL NUMERO 00010008 DEL LIBRO XIII, FUE (RON) NOMBRADO (S):

NOMBRE	IDENTIFICACION
SUPLENTE DEL PRESIDENTE DIRECTOR VITALICIO	
GAUDEBERT DE CAVELIER AGNES JEANNE	C.E. 000000000131100

CERTIFICA:

QUE EL NOMBRAMIENTO DE GALLÓN GIRALDO CARLOS INSCRITO BAJO EL REGISTRO 00012618 DEL LIBRO XIII, SE DA EN SU CONDICIÓN DE REPRESENTANTE LEGAL DE LA ASOCIACIÓN CAVELIER DEL DERECHO.

CERTIFICA:

FACULTADES DEL REPRESENTANTE LEGAL: APARTE DE LAS FACULTADES Y DEBERES QUE DE TIEMPO EN TIEMPO SE LE ASIGNEN POR EL CONSEJO SUPERIOR, EL DIRECTOR TENDRA LAS SIGUIENTES FUNCIONES : A) LA DE REPRESENTAR LEGALMENTE A LA SOCIEDAD ANTE LAS AUTORIDADES DE CUALQUIER ORDEN O NATURALEZA Y ANTE OTRAS PERSONAS NATURALES O JURIDICAS, CON FACULTADES PARA NOVAR, TRANSIGIR, COMPROMETER Y DESISTIR Y PARA COMPARECER EN JUICIOS INCLUSIVE EN AQUELLOS EN DONDE SE DISPUTE LA PROPIEDAD DE BIENES INMUEBLES; B) CUMPLIR Y HACER CUMPLIR LOS ESTATUTOS Y REGLAMENTOS DE LA SOCIEDAD; Y C) CREAR O SUPRIMIR TODOS LOS EMPLEOS QUE SEAN NECESARIOS DE ACUERDO CON EL CONSEJO SUPERIOR PARA EL BUEN FUNCIONAMIENTO DE LA SOCIEDAD, ASIGNARLES FUNCIONES, FIJAR SUS SALARIOS Y NOMBRAR LAS PERSONAS QUE DEBAN DESEMPEÑARLOS, ASI COMO RETIRARLOS Y REEMPLAZARLOS CUANDO HAYA LUGAR. CUANDO CUALQUIERA DE LOS ACTOS INDICADOS EN LA CLAUSULA ANTERIOR SE REFIERA A OPERACIONES CUYO MONTO EXCEDA DE LA SUMA EQUIVALENTE A CIENTO OCHENTA (180) SALARIOS MINIMOS MENSUALES, SU CELEBRACION REQUERIRA LA APROBACION PREVIA DEL CONSEJO SUPERIOR.

CERTIFICA:

** REVISOR FISCAL **

QUE POR ACTA NO. 0000071 DEL 2 DE SEPTIEMBRE DE 1993, INSCRITA EL 29 DE SEPTIEMBRE DE 1993 BAJO EL NUMERO 00005175 DEL LIBRO XIII, FUE (RON) NOMBRADO (S):

NOMBRE	IDENTIFICACION
REVISOR FISCAL	
RINCON FANDIÑO MIGUEL ALFONSO	C.C. 000000002877024

CERTIFICA:

DE CONFORMIDAD CON LO ESTABLECIDO POR LA LEY 962 DE 2005, LOS ACTOS DE REGISTRO AQUI CERTIFICADOS QUEDAN EN FIRME CINCO (5) DIAS HABLES DESPUES DE LA FECHA DE INSCRIPCION, SIEMPRE QUE NO SEAN OBJETO DE RECURSOS EN LA VIA GUBERNATIVA.

COMO NOTARIO SEXTO (6) DEL CIRCULO DE BOGOTA
D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA
CONCDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA

23 SEP 2010

NOTARIO ENCARGADO





01



* 9 7 1 3 9 3 2 8 *

10

CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE CHAPINERO

14 DE SEPTIEMBRE DE 2010

HORA 15:12:02

R029365395

PAGINA: 3 de 3

*** EL PRESENTE CERTIFICADO NO CONSTITUYE PERMISO DE
*** FUNCIONAMIENTO EN NINGUN CASO

SEÑOR EMPRESARIO, SI SU EMPRESA TIENE ACTIVOS INFERIORES A 30.000 SMLMV Y UNA PLANTA DE PERSONAL DE MENOS DE 200 TRABAJADORES, USTED TIENE DERECHO A RECIBIR UN DESCUENTO EN EL PAGO DE LOS PARAFISCALES DE 75% EN EL PRIMER AÑO DE CONSTITUCION DE SU EMPRESA, DE 50% EN EL SEGUNDO AÑO Y DE 25% EN EL TERCER AÑO. LEY 590 DE 2000 Y DECRETO 525 DE 2009.

RECUERDE INGRESAR A www.supersociedades.gov.co PARA VERIFICAR SI SU EMPRESA ESTA OBLIGADA A REMITIR ESTADOS FINANCIEROS. EVITE SANCIONES.

EL SECRETARIO DE LA CAMARA DE COMERCIO,
VALOR : \$ 3,600

DE CONFORMIDAD CON EL DECRETO 2150 DE 1995 Y LA AUTORIZACION IMPARTIDA POR LA SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO, MEDIANTE EL OFICIO DEL 18 DE NOVIEMBRE DE 1996, LA FIRMA MECANICA QUE APARECE A CONTINUACION TIENE PLENA VALIDEZ PARA TODOS LOS EFECTOS LEGALES

Esteban D.

COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA
D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA
COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA

23 SEP 2010

NOTARIO ENCARGADO



do 11

The Commonwealth of Massachusetts

William Francis Galvin
Secretary of the Commonwealth

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document

2. has been signed by: Heather C. Miller

3. acting in the capacity of: Notary Public

4. bears the seal/stamp of: Heather C. Miller

whose commission expires on: February 14, 2014

Certified

5. at: Boston, Massachusetts

6. the: 27 August, 2010

7. by: the Secretary of the Commonwealth

8. No.: 1476274

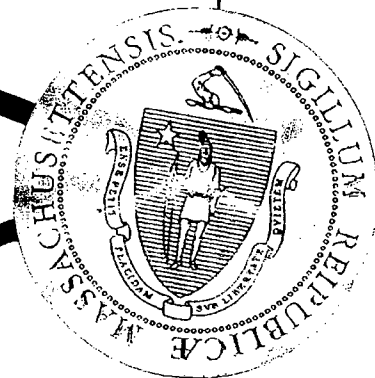
9. Seal/stamp:

Great Seal of the Commonwealth

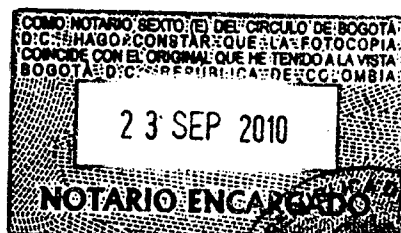
10. Signature:



William Francis Galvin
Secretary of the Commonwealth



prepared by TCoughlin

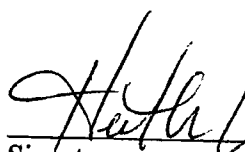


United States of America :

Commonwealth of Massachusetts :

County of Suffolk :

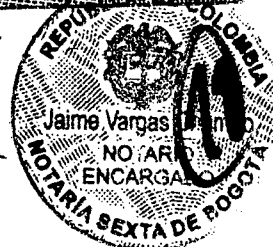
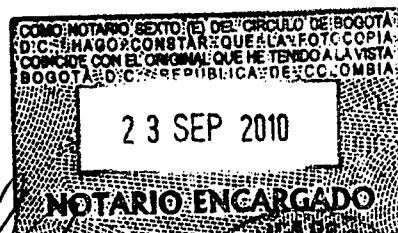
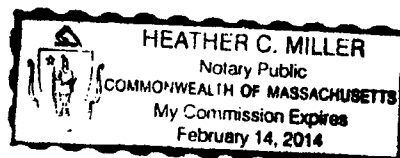
On this 23rd day of AUGUST, 2010, before me, the undersigned Notary Public,
personally appeared ERICA R. CARLSON (name of document signer),
proved to me through satisfactory evidence of identification, which were
I.D. Badge, to be the person whose
name is signed on the preceding or attached document in my presence.


Signature

Heather C. Miller
Printed Name

Notary Public

My commission expires: 2/14/2014



12

12-119.16

CAVELIER

ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 4a N° 72-35
BOGOTÁ, 8 - COLOMBIA

REPRESENTACION

REPRESENTATION

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned

DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.

domiciliado (s) 44 Binney Street, Boston,
en/of Massachusetts 02115, United States of
America

Por el presente nombramos a CAVELIER ABOGADOS, sociedad colectiva constituida de conformidad con las leyes de la República de Colombia, mediante Escritura Pública No. 6233 del 10 de septiembre de 1974, otorgada en la Notaría Sexta del Circuito de Bogotá, domiciliada en Bogotá D.C., con matrícula mercantil No. 00820237 y NIT 860041367-3, domiciliada en la Carrera 4a N° 72-35, Bogotá, Colombia, como nuestra representante en todos los asuntos de Propiedad Industrial, con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales.

CAVELIER ABOGADOS también podrá representarnos, con las mismas facultades arriba indicadas, ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, autoridades administrativas o jurisdiccionales, tribunales de arbitramento, en asuntos de naturaleza civil, comercial, penal, constitucional, competencia, competencia desleal, administrativa, contencioso administrativa, protección del consumidor, variedades vegetales, nombres de dominio, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, acciones de tutela, la protección de secretos industriales, derecho regulatorio y en general para que nos represente en cualesquiera acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan.

La representante podrá, en nuestro nombre, designar apoderados para actuar ante autoridades administrativas y judiciales, por vía extrajudicial y también procesalmente en nuestro nombre, como demandantes, como demandados, como litisconsortes, como agentes oficiosos, como terceros, por llamamiento en garantía o como intervinientes ad excludendum. Dentro de esta autorización, la representante podrá facultar a los apoderados que ella designe para transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar y sustituir el poder que se le otorgue. Así mismo, la representante tendrá la facultad para revocar

Do hereby appoint CAVELIER ABOGADOS, a general partnership organized under the laws of the Republic of Colombia by means of Public Deed No. 6233 of September 10, 1974, granted at Notary Sixth of the Bogota Circuit, domiciled in Bogota D.C., with Mercantile Registration No. 00820237 and Taxpayer Identification Number 860041367-3, domiciled at Carrera 4a N° 72-35, Bogota, Colombia, as our representative for all Industrial Property matters with faculty to receive notifications and appoint attorneys in and out of Court.

CAVELIER ABOGADOS may also represent us, with the same faculties stated above, before any entities or persons, with or without jurisdiction, administrative or jurisdictional authorities, courts of arbitration, in civil, commercial, criminal, constitutional, competition, unfair competition, administrative, administrative contentious, consumer protection, plant varieties, domain names, opposition or observation matters, administrative and Court cancellation, nullity, precautionary measures, licensing, action for writ mandamus, protection of trade secrets, regulatory law and in general represent us in any actions and suits instituted by us or against us.

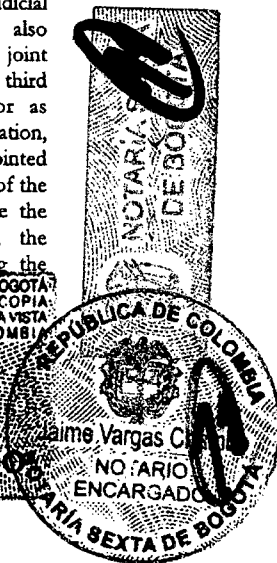
The representative may, in our name, designate attorneys to act before administrative and judicial authorities, through out-of-court channels, and also procedurally in our name as plaintiff, defendant, joint litigant, representative without power of attorney, third party, when summoned to appear in court or as intervener ad excludendum. Under this authorization, the representative may empower the attorneys appointed thereby to compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign and substitute the power of attorney granted thereto. Likewise, the representative shall have the faculty of revoking the

© CAVELIER ABOGADOS
WPC17756/D.173713

COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO DE BOGOTÁ
D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA
CONCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTÁ D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA

23 SEP 2010

NOTARIO ENCARGADO



el poder así otorgado en el momento que considere pertinente. La representante en todo caso podrá ratificar los actos de agentes oficiosos.

power of attorney thus granted at any time it may deem convenient. The representative may in any case ratify the acts of representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/Given and signed this 08-23-10

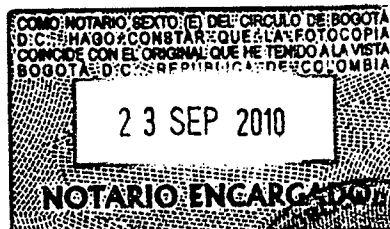
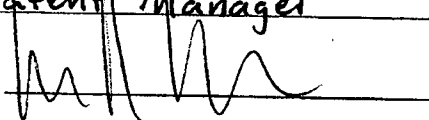
En/in Dana-Farber Cancer Institute, Inc.

44 Binney St. Boston, MA 02115 USA

Por/by Erica R. Carlson

Senior Patent Manager

Firma/Signature



13

CERTIFICACION NOTARIAL (SOCIEDAD)

El infrascrito Notario Certifica: Que la firma que antecede de

es auténtica; que el signatario desempeña actualmente el cargo de

de la compañía

sociedad que actualmente existe y está organizada de acuerdo a las leyes de

que la dirección de dicha compañía es

y que el signatario tiene facultad para otorgar este documento.

Todos los hechos anteriores le constan por haber examinado los documentos respectivos y de todo ello da fe.

Dado y firmado en

El

NOTARIAL CERTIFICATION (COMPANY)

The undersigned Notary certifies: That the preceding signature of

Erica R. Carlson

is authentic, that the signatory currently acts in the position of

Senior Patent Manager

of the company Dana-Farber Cancer Institute, Inc.

a company currently existing and organized under the laws of

Massachusetts

that the address is 44 Binney St.

Boston, MA, 02115 USA

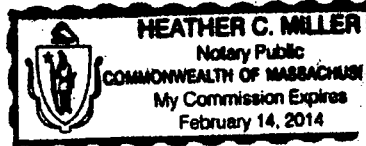
and that the signatory has the power to grant this document.

The Notary Public is aware and attests to the above facts upon examination of the corresponding documents.

Given and signed in Boston, MA

On 23 August, 2010


El Notario Público - The Notary Public
(Firma-sello) (Signature-seal)

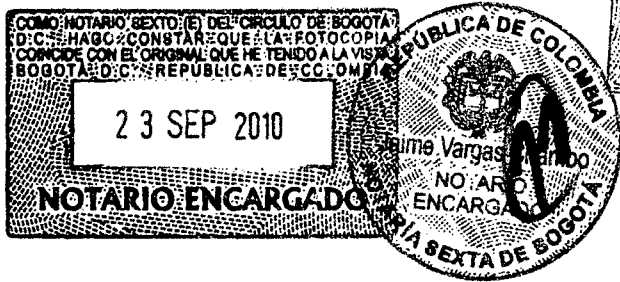


APOSTILLE
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country:
This public document
2. has been signed by
3. acting in the capacity of
4. bears the seal/stamp of

Certified

5. at 6. the
7. by
8. No.
9. Seal/stamp 10. Signature



Nota:

PARA SOCIEDADES

El documento de Representación deberá ser firmado por el representante legal de la compañía. Deberá ser presentado ante Notario Público para que certifique que la persona que firma es quien dice ser. La firma del señor Notario deberá ser legalizada*.

Adicionalmente deberá anexarse copia legalizada* del documento que pruebe la existencia y representación legal de la sociedad.

*La legalización podrá ser por Apostilla si el país del otorgante hace parte de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961 o ante el Cónsul de Colombia en caso contrario. Una sola legalización que incluya ambos documentos sería suficiente.

PARA PERSONAS NATURALES

El documento de Representación deberá ser firmado por el otorgante. El Notario Público deberá certificar que la persona que firma es quien dice ser.

Posteriormente el documento de Representación deberá ser legalizado por Apostilla si el país del otorgante hace parte de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961 o ante el Cónsul de Colombia en caso contrario.

Note:

FOR CORPORATIONS

The Representation document should be signed by the Legal Representative of the company. It should be produced before a Notary Public, who should certify that the person signing the same is in fact who he/she purports to be. The Notary's signature should then be legalized*.

In addition a legalized copy* of the document proving the existence and legal representation of the company should also be attached.

*Legalization may be made by Apostille if the issuing country is a member of the The Hague Convention of October 5, 1961, or before the Colombian Consulate if otherwise. A single legalization that would include both documents would be sufficient.

FOR INDIVIDUALS

The Representation should be signed by the grantor. The Notary Public should certify that the person signing is who he/she purports to be.

Subsequently, the Representation document should be legalized by Apostille if the issuing country is a member of the The Hague Convention of October 5, 1961 or before the Colombian Consulate if otherwise.

COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CÍRCULO DE BOGOTÁ
DICE: HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA
CONCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTÁ, D.C. REPÚBLICA DE COLOMBIA

23 SEP 2010

NOTARIO ENCARGADO

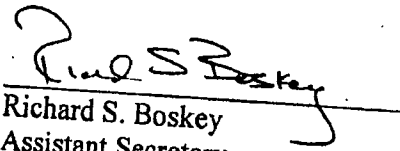


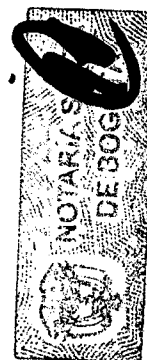
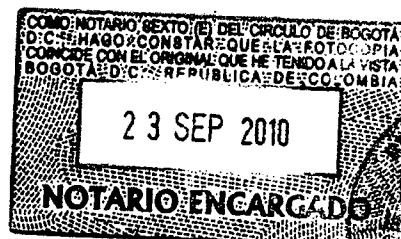
Dana-Farber Cancer Institute, Inc.
Certificate of Corporate Authority

I, Richard S. Boskey, Assistant Secretary of Dana-Farber Cancer Institute, Inc., a Massachusetts not-for-profit corporation with its usual place of business at 44 Binney Street in Boston, Massachusetts (the "Corporation"), hereby certify that Erica Carlson, Senior Patent Manager of the Corporation, is authorized to act on behalf of and bind the Corporation as to the matters specified below:

Copyright, Patent and Trademark Applications and Related Documents

Executed this 5th day of August, 2010.


Richard S. Boskey
Assistant Secretary
Dana-Farber Cancer Institute, Inc.

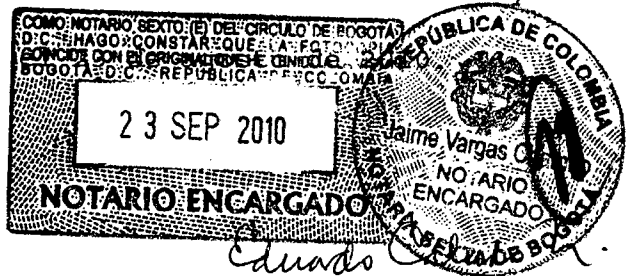


TRADUCCIÓN OFICIAL 280/2010 DE UN DOCUMENTO EN IDIOMA INGLÉS
REALIZADA POR EDUARDO CALADO NOGUERA, TRADUCTOR OFICIAL
APROBADO POR RESOLUCION 541 DEL 27 DE FEBRERO DE 1976
EXPEDIDA POR EL MINISTERIO DE JUSTICIA DE COLOMBIA Y
DEBIDAMENTE REGISTRADO ANTE EL MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES DE COLOMBIA, POR EL CUAL DANA-FARBER CANCER
INSTITUTE, INC. DOMICILIADA EN 44 BINNEY STREET, BOSTON,
MASSACHUSSETTS 02115, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA OTORGA
REPRESENTACIÓN EN ASUNTOS RELACIONADOS CON PROPIEDAD
INDUSTRIAL A CAVELIER ABOGADOS.

DADO Y FIRMADO HOY 23 DE AGOSTO DE 2010 EN DANA-FARBER CANCER
INSTITUTE, INC. 44 BINNEY ST. BOSTON, MA. 02115, ESTADOS
UNIDOS DE AMERICA POR ERICA R, CARLSON, GERENTE DE PATENTES
CERTIFICACION NOTARIAL (SOCIEDAD)

El infrascrito notario certifica que la firma que antecede de
ERICA R. CARLSON es auténtica; que el signatario
actualmente desempeña el cargo de gerente de patentes de la
compañía DANA FARBER CANCER INSTITUTE INC., una sociedad que
actualmente existe y está organizada de acuerdo con las leyes
de Massachussetts; que la dirección de la compañía es 44
Binney St. Boston, MA. 02115, Estados Unidos de América y que
el signatario tiene facultad para otorgar este documento.
Todos los hechos anteriores le constan por haber examinado
los documentos respectivos y que de todo ello da fe. Dado y

firmado en Boston Massachussetts
Firma ilegible: notario público



TRADUCTOR OFICIAL
Inglés - Español - Inglés
Res. 541 Febrero de 1976

Sello: HEATHER MILLER, NOTARIO PÚBLICO, ESTADO DE MASSACHUSSETTS. Mi cargo vence el 14 de febrero de 2014.

DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.

CERTIFICACIÓN DE AUTORIDAD SOCIETARIA

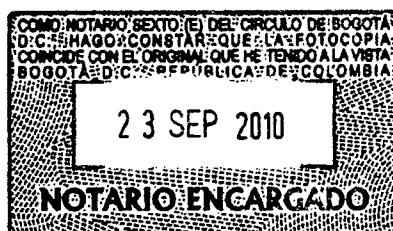
Yo, Richard S. Boskey, subsecretario de Dana Farber Cancer Institute Inc, una sociedad sin ánimo de lucro de Massachusetts, por la presente certifico que Erica Carlson, gerente de patentes de la sociedad, está autorizada para actuar a nombre de la misma y para obligar a la sociedad con respecto a los asuntos que se especifican a continuación

Documentos de derechos de autor, solicitudes de patentes y marcas y asuntos relacionados. Firmado hoy 5 de agosto de 2010. Firmado: RICHARD S. BOSKEY, subsecretario, Dana Farber Cancer Institute, Inc.

ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

ESTADO DE MASSACHUSSETTS

CONDADO DE SUFFOLK



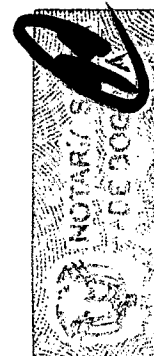
El 22 de agosto de 2010, ante mi, el notario abajo firmante compareció personalmente ERICA R. CARLSON, quien demostró ante mi mediante evidencia de identificación satisfactoria, (insignia de identificación) ser la persona cuyo nombre aparece firmado en el documento precedente o adjunto y en mi presencia.

Firma ilegible. NOMBRE IMPRESO: HEATHER C. MILLER

Mi cargo vence el 14 de febrero de 2014

SELLO: HEATHER C. MILLER, NOTARIO PÚBLICO, ESTADO DE MASSACHUSSETTS. MI CARGO VENCE EL 14 DE FEBRERO DE 2014.

Eduardo Calado H.
 TRADUCTOR OFICIAL
 Inglés - Español - Inglés
 Res. 541 Febrero de 1976



ESTADO DE MASSACHUSSETTS

WILLIAM FRANCIS GALVIN

SECRETARIO DE ESTADO

APOSTILLA

(CONVENCION DE LA HAYA DEL 5 DE OCTUBRE DE 1961)

1. PAIS: ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

Este documento público

2. ha sido firmado por HEATHER C. MILLER

3. quien actúa en su calidad de NOTARIO PÚBLICO

4. lleva el sello/estampilla de HEATHER C. MILLER

cuyo nombramiento vence el 14 de febrero de 2014

CERTIFICADO

5. En Boston, Massachusetts

6. el 27 de agosto

2010

7. Por el secretario del estado

8. No. 1476274

9. Sello/estampilla: GRAN SELLO DEL ESTADO DE FORMA CIRCULAR
 FIJADO SOBRE PAPEL DORADO CON LA LEYENDA : SELLO DE LA
 REPUBLICA DE MASSACHUSSETTS.

10. Firma: WILLIAM FRANCIS GALVIN

SECRETARIO DEL ESTADO

COLO-17756-841-001-9

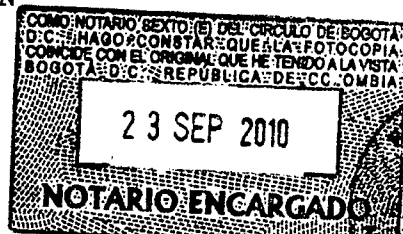
1 HORA, 548 palabras

ECN\ECN\ID-178727\WPCL002G

Bogotá, 19 de septiembre de 2010.

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES
2010 SEP 20 A 12:25
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO
032795
Cuya firma aparece en el
documento de sempena
as funciones indicadas



Eduardo Calado N.

Eduardo Calado Noguera
 TRADUCTOR OFICIAL
 Inglés - Español - Inglés
 Res. 541 Febrero de 1976



sociedad **CAVELIER ABOGADOS**, igualmente protocoliza copia autenticada del documento de representación otorgado el día **23 de Agosto de 2010** por **DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.**, documento que está debidamente legalizado por Apostilla. Presente la señora **ADRIANA ZAPATA GIRALDO** domiciliada en

Bogotá, identificada como aparece al pie de su firma y manifestó que está conforme con el contenido de esta escritura pública. -----

----- **HASTA AQUI LAS DECLARACIONES DEL INTERESADO** -----

OTORGAMIENTO Y AUTORIZACIÓN. Leído, el presente instrumento público por el otorgante, dio su asentimiento y en prueba de ello lo firma junto con la suscrita Notaria quien en esta forma lo autoriza. -----

DERECHOS NOTARIALES: \$ 42.860 -----

IVA: \$ 17.111 -----

RECAUDO SUPERINTENDENCIA: \$3.570.00 -----

RECAUDO FONDO NACIONAL DE NOTARIADO: \$3.570.00 -----

RESOLUCIÓN 10301 DE DICIEMBRE 17 DE 2009 -----

PAPEL NOTARIAL: El presente instrumento público se extendió y firmó en las hojas de papel notarial números: 7-700065, 003802, 7-700065, 003819

EN BLANCO... EN BLANCO


ADRIANA ZAPATA GIRALDO

C.C. 51680001

TEL. 2110318

Representante Legal de **CAVELIER ABOGADOS**



JAIME VARGAS CHAMBO

NOTARIA(O) SEXTA(O) (6) (E) DE BOGOTÁ, D.C.

T. CAVELIER Angelica.PE

ES FIEL Y SEGUNDA (FOTOCOPIA) TOMADA DE LA ESCRITURA PUBLICA
NUMERO 5088 DE FECHA 23 DE SEPTIEMBRE DE 2010.

COPIA QUE EXPIDO CON DESTINO AL INTERESADO EN 10 HOJAS RUBRICADAS
EN SUS MARGENES, LA CUAL CARECE DE NOTAS DE REVOCATORIA,
MODIFICACION O SUSTITUCION, POR TANTO SE PRESUME VIGENTE EL PODER
EN ELLA CONTENIDO.

BOGOTAD.C. SEPTIEMBRE 25 DE 2010

RESOLUCION 01 DE 2009

POR LA NOTARIA SEXTA



JAIME VARGAS CHAMBO
NOTARIO ENCARGADO

Notaría Sexta

6

DEL CIRCULO DE BOGOTA, D.C.

COPIA NUMERO 2

DE LA ESCRITURA NUMERO: 5090
FECHA: 23/Septiembre/2010

ACTO O CONTRATO:
PODER ESPECIAL
OTORGANTES:
CAVELIER ABOGADOS
LUZ CLEMENCIA DE PAEZ



CERTIFICADO SC 3980-1
PRESTACION DEL
SERVICIO PUBLICO
NOTARIAL
ISO 9001:2000
NTC-ISO 9001:2000



AMPARO QUINTERO ARTURO

NOTARIA SEXTA

CARRERA 9 No. 69-31 - PBX: 317 01 00 - FAX: 314 56 41

Correo Electrónico: notaria6debgta@etb.net.co



ESCRITURA PUBLICA NUMERO 5090
CINCO MIL NOVENTA
DE FECHA: SEPTIEMBRE VEINTITRES (23)
DEL AÑO DOS MIL DIEZ (2.010)
OTORGADA EN LA NOTARIA SEXTA (6ª.) DEL
CÍRCULO NOTARIAL DE BOGOTÁ, D.C.

ACTO: PODER

PODERDANTE: CAVELIER ABOGADOS Nit. 860.041.367-3

APODERADOS:

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ	C.C. 35.456.344
NIDIA OSORIO LOPEZ	C.C. 39.787.682
OSCAR FERNANDO CORREA BARBOSA	C.C. 79.524.634
EDNA DARMELY SARMIENTO CHARRY	C.C. 52.006.265
JORGE CHAVARRO ARISTIZABAL	C.C. 16.209.380

En la ciudad de Bogotá, Distrito Capital, República de Colombia, ante mí **JAIME VARGAS CHAMBO** -- Notaria(o) Sexta(o) (6) **ENCARGADO** de este Círculo Notarial, se otorgó la escritura pública que se consigna en los siguientes términos:

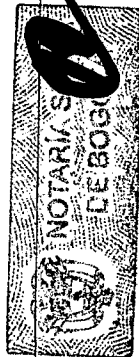
Compareció: con minuta escrita la señora **ADRIANA ZAPATA GIRALDO**, mayor de edad, vecina de esta ciudad, casada, identificada con la cédula de ciudadanía No. 51.680.061 de Bogotá, y dijo:

ESTIPULACIONES

PRIMERA: Que obra en su calidad de Representante Legal de la sociedad denominada **CAVELIER ABOGADOS** domiciliada en la Carrera 4 No. 72-35, Bogotá, Colombia.

SEGUNDA: Que **BURNHAM INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH**, sociedad constituida y existente bajo las leyes del Estado de California, Estados Unidos de América, domiciliada en 10901 North Torrey Pines Road, La Jolla, California 92037, Estados Unidos de América, designó a **CAVELIER ABOGADOS** como su representante para la Propiedad Industrial en Colombia con facultades de nombrar apoderados tal como consta en la copia auténtica del documento de representación que se protocoliza.

TERCERA: Que en su carácter de representante legal de **CAVELIER**



ABOGADOS, y en desarrollo de la facultad otorgada por **BURNHAM INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH**, confiere poder a los abogados **LUZ CLEMENCIA DE PAEZ**, T.P.A. No. 23.555, identificada con cédula de ciudadanía número **35.456.344** de Usaquen, **NIDIA OSORIO LOPEZ**, T.P.A. No.73.366, identificada con cédula de ciudadanía número **39.787.682** de Bogotá, **OSCAR FERNANDO CORREA BARBOSA**, T.P.A. No. 71.027 identificado con cédula de ciudadanía número **79.524.634** de Bogotá, **EDNA DARMELY SARMIENTO CHARRY**, T.P.A. 65.794 identificada con cédula de ciudadanía número **52.006.265** de Bogotá y **JORGE CHAVARRO ARISTIZABAL**, T.P.A. No. 40.119, identificado con cédula de ciudadanía número **16.209.380** de Cartago (Valle), mayores de edad, vecinos de Bogotá, para que representen a la sociedad a cuyo nombre actúa, ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, incluyendo las del orden administrativo, contencioso administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: -----

a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, diseños industriales, trazado de circuitos integrados, secretos industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, variedades vegetales, denominaciones de origen e indicaciones de procedencia, su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos -----

b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones, cancelación administrativa o judicial, nulidad, medidas cautelares, acción por infracción, concesión de licencias, la protección de secretos industriales y de nombres de dominio junto con su administración y pago; acciones populares, de tutela y de cumplimiento; y en general los procesos civiles, penales, administrativos o contencioso administrativos, de conciliación, arbitramento, tutela relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. -----

CUARTO: Que los apoderados designados están facultados en todos los asuntos arriba determinados para sustituir este mandato, transigir, conciliar, arbitrar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar y ratificar los



01



* 9 7 1 3 9 3 2 6 *

18

CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE CHAPINERO

14 DE SEPTIEMBRE DE 2010 HORA 15:12:02

R029365395

PAGINA: 1 de 3

* * * * *

CERTIFICADO DE EXISTENCIA Y REPRESENTACION LEGAL O INSCRIPCION DE DOCUMENTOS

CERTIFICA:

NOMBRE : CAVELIER ABOGADOS
N.I.T. : 860041367-3
DOMICILIO : BOGOTA D.C.

CERTIFICA:

NO: 00820237

CERTIFICA:

CONSTITUCION : QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0006233 DE NOTARIA SEXTA DE BOGOTA D.C. DEL 10 DE SEPTIEMBRE DE 1974 , INSCRITA EL 26 DE SEPTIEMBRE DE 1974 BAJO EL NUMERO 00021234 DEL LIBRO IX, SE CONSTITUYO LA SOCIEDAD CIVIL DENOMINADA: CAVELIER PERDOMO Y CAVELIER.

CERTIFICA :

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0001000 DE NOTARIA SEXTA DE BOGOTA D.C. DEL 10 DE MARZO DE 1983 , INSCRITA EL 5 DE ABRIL DE 1983 BAJO EL NUMERO 00130769 DEL LIBRO IX, LA SOCIEDAD CAMBIO SU NOMBRE DE : CAVELIER PERDOMO Y CAVELIER. POR EL DE : CAVELIER ABOGADOS

CERTIFICA:

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NUMERO 1.000 OTORGADA EN LA NOTARIA 6A. DE BOGOTA EL 10 DE MARZO DE 1.983, INSCRITA EN ESTA CAMARA DE COMERCIO EL 5 DE ABRIL DE 1.983 BAJO EL NUMERO 130769 DEL LIBRO IX, LA SOCIEDAD CAMBIO SU NOMBRE DE: CAVELIER PERDOMO Y CAVELIER, POR EL DE: CAVELIER ABOGADOS, E INTRODUJO OTRAS REFORMAS.

CERTIFICA:

CERTIFICA

QUE POR E.P.NO. 2.034 DE LA NOTARIA 6 DE SANTAFE DE BOGOTA DEL 18 DE ABRIL DE 1.995, INSCRITA EL 27 DE ABRIL DE 1.995 BAJO EL NO. 5.937 DEL LIBRO XIII, LA SOCIEDAD TRASLADO SU DOMICILIO DE LA CIUDAD DE SANTAFE DE BOGOTA D.C. AL MUNICIPIO DE TABIO (CUNDINAMARCA)..

CERTIFICA:

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 7710 DE LA NOTARIA SEXTA DE BOGOTA DEL 10 DE OCTUBRE DE 1984, INSCRITA EL 15 DE NOVIEMBRE DE 1984 BAJO EL NO. 1559 DEL LIBRO XIII, LA SOCIEDAD CAMBIO SU NATURALEZA JURIDICA DE SOCIEDAD COMERCIAL A SOCIEDAD CIVIL.

CERTIFICA:

REFORMAS:

ESCRITURAS NO.

FECHA

NOTARIA

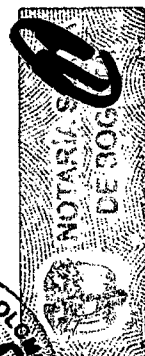
INSCRIPCION

842	10-V-1.977	18. BTA.	27-V-1.977-NO. 46.204
3.430	1-VII-1.980	6A. BTA.	3-IX-1.980-NO. 89.582
4.844	10-IX-1.980	6A. BTA.	8-X-1.980-NO. 91.261
432	10-II-1.983	6A. BTA.	1-III-1.983-NO.129.337

COMO NOTARIO SEXTO (6) DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA CONCORDA CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA

23 SEP 2010

NOTARIO ENCARGADO



7.710	10-X-1.984	6A. BTA.	15-XI-1.984-NO.	1.559
7.305	21-X-1.985	6A. BTA.	18-XI-1.985-NO.	1.906
2.567	29-IV-1.987	6A. BTA.	7-V- 1.987-NO.	2.386
4.278	3-VII-1.987	6A. BTA.	23-VII-1987 NO.	215.652
2.657	25- IV-1.988	6A. BTA.	19- V -1988-NO.	2,740
9.033	21-XII-1.990	6A. BTA.	10- I - 1991-NO.	3.786
25	3- I -1.991	6A. BTA.	10- I - 1991-NO.	3.787
1.608	8-III-1.991	6A. BTA.	14-III- 1991-NO.	3.841
2.155	2-IV- 1.991	6A. BTA.	8-IV - 1991-NO.	3.862
797	7-II -1.991	6A. BTA.	7- V -1991-NO.	3.882
1.739	14-III-1.991	6A. BTA.	7- V -1991-NO.	3.881
5.886	21-VIII-1.991	6A. BTA	27-VIII-1991 NO.	4.019
8.596	4-XII -1.991	6A. BTA	16-III -1992 NO.	4.430
1.494	10-III -1.992	6A. BTA.	19-III -1992 NO.	4.436
4.205	8 -VII -1.992	6A. BTA.	15-VII -1992 NO.	4.554
8.829	16-XII -1.992	6A. BTA.	24-XII -1992 NO.	4.819
12	5-I -1.993	6 STAFE BTA	13-I -1993 NO.	4.850
4.877	29-VI -1.993	6 STAFE BTA	7-VII -1993 NO.	5.065
5.216	12-VII -1.993	6 STAFE BTA	16-VII -1993 NO.	5.077
ACTA NO.71	2-IX- 1.993	JUNTA DE SOCIOS	29-IX- 1993 NO.	5.174
2.034	18-IV- 1.995	6 STAFE BTA	27- IV -1995 NO.	5.937
2.227	25-IV-1.995	6 STAFE BTA	18-VIII-1.995 NO.	6.092
7.594	12-XII-1.995	6 STAFE BTA	19- XII-1.995 NO.	6.294
676	11- II-1.997	6 STAFE BTA	14- II -1.997 NO.	6.873

CERTIFICA:

REFORMAS:

E.P. NO.	FECHA	NOTARIA	CIUDAD	FECHA	NO. INSC.
0004506	1997/07/28	0006	BOGOTA D.C.	1997/09/02	00007115
0002103	1998/04/08	0006	BOGOTA D.C.	1998/04/21	00007426
0005326	1998/08/06	0006	BOGOTA D.C.	1998/08/13	00007544
0005538	1998/08/14	0006	BOGOTA D.C.	1998/08/27	00007564
0007760	1998/11/10	0006	BOGOTA D.C.	1998/11/12	00007644
0006709	1997/11/04	0006	BOGOTA D.C.	2000/12/04	00008481
0003034	2003/05/30	0006	BOGOTA D.C.	2003/06/04	00882729
0003786	2004/07/16	0006	BOGOTA D.C.	2004/07/28	00009703
0001432	2005/03/18	0006	BOGOTA D.C.	2005/04/07	00009917
0004818	2005/08/22	0006	BOGOTA D.C.	2005/08/26	00010008
0005506	2007/07/17	0006	BOGOTA D.C.	2007/07/24	00010841
5453	2009/10/19	0006	BOGOTA D.C.	2009/10/21	00012243
1336	2010/03/16	0006	BOGOTA D.C.	2010/03/24	00012506

CERTIFICA:

VIGENCIA: QUE LA SOCIEDAD NO SE HALLA DISUELTA. DURACION HASTA EL 10 DE SEPTIEMBRE DE 2024 .

CERTIFICA:

OBJETO SOCIAL: LA SOCIEDAD TENDRA POR OBJETO : EL EJERCICIO DE LA ACTIVIDAD PROFESIONAL DE ABOGADOS. EN DESARROLLO DE ESTE OBJETO LA SOCIEDAD PODRA ADQUIRIR, CONTRAER OBLIGACIONES Y CELEBRAR TODA CLASE DE CONTRATOS DIRECTAMENTE RELACIONADOS Y SUBORDINADOS AL MISMO, INCLUSIVE LOS DE ARRENDAMIENTO, HIPOTECA, MUTUO CON O SIN INTERES, MANDATO CIVIL Y COMERCIAL, Y SOCIEDAD, ASI COMO PARTICIPAR EN ASOCIACIONES CIENTIFICAS, GREMIALES O PROFESIONALES SIN ANIMO DE LUCRO.

CERTIFICA:

CAPITAL Y SOCIOS: \$10,000.00 DIVIDIDO EN 10,000.00 CUOTAS CON VALOR NOMINAL DE \$1.00 CADA UNA, DISTRIBUIDO ASI :
- SOCIO CAPITALISTA (S)





01



* 9 7 1 3 9 3 2 7 *

19

CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE CHAPINERO

14 DE SEPTIEMBRE DE 2010

HORA 15:12:02

R029365395

PAGINA: 2 de 3

* * * * *

ASOCIACION CAVELIER DEL DERECHO

NO. CUOTAS: 8,800.00

N.I.T. 000008001722568

VALOR: \$8,800.00

GAUDEBERT DE CAVELIER AGNES JEANNE

NO. CUOTAS: 1,200.00

C.E. 000000000131100

VALOR: \$1,200.00

- SOCIO INDUSTRIAL (S)

SUAREZ DE PAEZ LUZ CLEMENCIA

NO. CUOTAS: 0.00

C.C. 000000035456344

VALOR: \$0.00

CHAVARRO JORGE

NO. CUOTAS: 0.00

C.C. 000000016209380

VALOR: \$0.00

TOTALES

NO. CUOTAS: 10,000.00

VALOR: \$10,000.00

CERTIFICA:

QUE POR ESCRITURAS PUBLICAS NO. 001431 Y 001432 DEL 18 DE MARZO DE 2005 DE LA NOTARIA 06 DE BOGOTA D.C., INSCRITA EL 07 DE ABRIL DE 2005 BAJO EL NO. 0009918 Y 0009917, RESPECTIVAMENTE DEL LIBRO XIII, DE LAS MIL DOSCIENTAS (1200) PARTES DE INTERES SOCIAL RADICADAS EN CABEZA DE AGNES GAUDEBERT DE CAVELIER, SEISCIENTAS (600) PARTES ESTAN GRAVADAS O AFECTADAS EN PROPIEDAD FIDUCIARIA A FAVOR DE LAS SIGUIENTES PERSONAS : GERMAN CAVELIER FRANCO, ERNESTO CAVELIER FRANCO, JORGE CAVELIER FRANCO, INES CAVELIER FRANCO, GUILLERMO CAVELIER FRANCO, ELENA CAVELIER FRANCO, ALEJANDRO CAVELIER FRANCO, BEATRIZ CAVELIER FRANCO, Y LUCIA CAVELIER FRANCO.

CERTIFICA:

REPRESENTACION LEGAL: EL REPRESENTANTE LEGAL ES EL DIRECTOR. EL SOCIO FUNDADOR GERMAN CAVELIER GAVIRIA TENDRA EL CARACTER DE PRESIDENTE DIRECTOR VITALICIO, PARTICIPARA POR DERECHO PROPIO EN EL CONSEJO SUPERIOR Y EN EL CONSEJO DIRECTIVO Y LLEVARA LA REPRESENTACION LEGAL DE LA SOCIEDAD CUANDO LO ESTIME PERTINENTE SIN LIMITACION ALGUNA. IGUAL PARTICIPACION Y ATRIBUCIONES TENDRA SU SUPLENTE AGNES GAUDEBERT DE CAVELIER CUANDO OCUPE EL CARGO, EN CASO DE FALTA ABSOLUTA DE GERMAN CAVELIER GAVIRIA. LOS SOCIOS COLECTIVOS ESTÁN AUTORIZADOS PARA EJERCER LA REPRESENTACIÓN DE LA SOCIEDAD EN CUALQUIER TIEMPO, SIN PERJUICIO DE LAS DELEGACIONES CONFERIDAS A LOS ORGANOS CREADOS POR LOS PRESENTES ESTATUTOS

CERTIFICA:

** NOMBRAMIENTOS **

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0004818 DE NOTARIA 6 DE BOGOTA D.C. DEL 22 DE AGOSTO DE 2005, INSCRITA EL 26 DE AGOSTO DE 2005 BAJO EL NUMERO 00010008 DEL LIBRO XIII, FUE (RON) NOMBRADO (S):

NOMBRE

IDENTIFICACION

PRESIDENTE DIRECTOR VITALICIO

CAVELIER GAVIRIA GERMAN

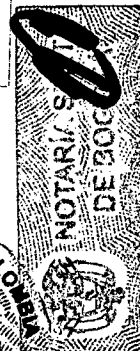
C.C. 000000002877924

QUE POR ACTA NO. 26 DE ASAMBLEA GENERAL DEL 13 DE MAYO DE 2010, INSCRITA EL 24 DE MAYO DE 2010 BAJO EL NUMERO 00012618 DEL LIBRO XIII,

COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA
D.C. HAGO CONSTAR QUE ESTA FOTOCOPIA
CONCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA

23 SEP 2010

NOTARIO ENCARGADO



FUE (RON) NOMBRADO (S):

NOMBRE	IDENTIFICACION
DIRECTORA	
ZAPATA GIRALDO ADRIANA	C.C. 000000051680061
REPRESENTANTE LEGAL	
ASOCIACION CAVELIER DEL DERECHO	N.I.T. 000008001722568
REPRESENTANTE LEGAL	
GALLON GIRALDO CARLOS	C.C. 000000019066425
REPRESENTANTE LEGAL	
GAUDEBERT DE CAVELIER AGNES JEANNE	C.E. 000000000131100
SOCIO COLECTIVO	
GAUDEBERT DE CAVELIER AGNES JEANNE	C.E. 000000000131100
SOCIO COLECTIVO	
ASOCIACION CAVELIER DEL DERECHO	N.I.T. 000008001722568

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0004818 DE NOTARIA 6 DE BOGOTA D.C. DEL 22 DE AGOSTO DE 2005, INSCRITA EL 26 DE AGOSTO DE 2005 BAJO EL NUMERO 00010008 DEL LIBRO XIII, FUE (RON) NOMBRADO (S):

NOMBRE	IDENTIFICACION
SUPLENTE DEL PRESIDENTE DIRECTOR VITALICIO	
GAUDEBERT DE CAVELIER AGNES JEANNE	C.E. 000000000131100

CERTIFICA:

QUE EL NOMBRAMIENTO DE GALLÓN GIRALDO CARLOS INSCRITO BAJO EL REGISTRO 00012618 DEL LIBRO XIII, SE DA EN SU CONDICIÓN DE REPRESENTANTE LEGAL DE LA ASOCIACIÓN CAVELIER DEL DERECHO.

CERTIFICA:

FACULTADES DEL REPRESENTANTE LEGAL: APARTE DE LAS FACULTADES Y DEBERES QUE DE TIEMPO EN TIEMPO SE LE ASIGNEN POR EL CONSEJO SUPERIOR, EL DIRECTOR TENDRA LAS SIGUIENTES FUNCIONES : A) LA DE REPRESENTAR LEGALMENTE A LA SOCIEDAD ANTE LAS AUTORIDADES DE CUALQUIER ORDEN O NATURALEZA Y ANTE OTRAS PERSONAS NATURALES O JURIDICAS, CON FACULTADES PARA NOVAR, TRANSIGIR, COMPROMETER Y DESISTIR Y PARA COMPARECER EN JUICIOS INCLUSIVE EN AQUELLOS EN DONDE SE DISPUTE LA PROPIEDAD DE BIENES INMUEBLES; B) CUMPLIR Y HACER CUMPLIR LOS ESTATUTOS Y REGLAMENTOS DE LA SOCIEDAD; Y C) CREAR O SUPRIMIR TODOS LOS EMPLEOS QUE SEAN NECESARIOS DE ACUERDO CON EL CONSEJO SUPERIOR PARA EL BUEN FUNCIONAMIENTO DE LA SOCIEDAD, ASIGNARLES FUNCIONES, FIJAR SUS SALARIOS Y NOMBRAR LAS PERSONAS QUE DEBAN DESEMPEÑARLOS, ASI COMO RETIRARLOS Y REEMPLAZARLOS CUANDO HAYA LUGAR. CUANDO CUALQUIERA DE LOS ACTOS INDICADOS EN LA CLAUSULA ANTERIOR SE REFIERA A OPERACIONES CUYO MONTO EXCEDA DE LA SUMA EQUIVALENTE A CIENTO OCHENTA (180) SALARIOS MINIMOS MENSUALES, SU CELEBRACION REQUERIRA LA APROBACION PREVIA DEL CONSEJO SUPERIOR.

CERTIFICA:

** REVISOR FISCAL **

QUE POR ACTA NO. 0000071 DEL 2 DE SEPTIEMBRE DE 1993, INSCRITA EL 29 DE SEPTIEMBRE DE 1993 BAJO EL NUMERO 00005175 DEL LIBRO XIII, FUE (RON) NOMBRADO (S):

NOMBRE	IDENTIFICACION
REVISOR FISCAL	
RINCON FANDIÑO MIGUEL ALFONSO	C.C. 000000002877024

CERTIFICA:

DE CONFORMIDAD CON LO ESTABLECIDO POR LA LEY 962 DE 2005, LOS ACTOS DE REGISTRO AQUI CERTIFICADOS QUEDAN EN FIRME CINCO (5) DIAS HABILES DESPUES DE LA FECHA DE INSCRIPCION, SIEMPRE QUE NO SEAN OBJETO DE RECURSOS EN LA VIA GUBERNATIVA.

COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA
D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA
COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA

23 SEP 2010

NOTARIO ENCARGADO





01



* 9 7 1 3 9 3 2 8 *

20

CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE CHAPINERO

14 DE SEPTIEMBRE DE 2010

HORA 15:12:02

R029365395

PAGINA: 3 de 3

* * * * *

* * * EL PRESENTE CERTIFICADO NO CONSTITUYE PERMISO DE * * *
* * * FUNCIONAMIENTO EN NINGUN CASO * * *

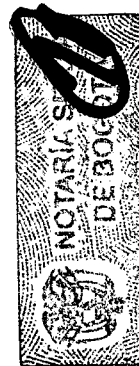
SEÑOR EMPRESARIO, SI SU EMPRESA TIENE ACTIVOS INFERIORES A 30.000 SMLMV Y UNA PLANTA DE PERSONAL DE MENOS DE 200 TRABAJADORES, USTED TIENE DERECHO A RECIBIR UN DESCUENTO EN EL PAGO DE LOS PARAFISCALES DE 75% EN EL PRIMER AÑO DE CONSTITUCION DE SU EMPRESA, DE 50% EN EL SEGUNDO AÑO Y DE 25% EN EL TERCER AÑO. LEY 590 DE 2000 Y DECRETO 525 DE 2009.

RECUERDE INGRESAR A www.supersociedades.gov.co PARA VERIFICAR SI SU EMPRESA ESTA OBLIGADA A REMITIR ESTADOS FINANCIEROS. EVITE SANCIONES.

EL SECRETARIO DE LA CAMARA DE COMERCIO,
VALOR : \$ 3,600

DE CONFORMIDAD CON EL DECRETO 2150 DE 1995 Y LA AUTORIZACION IMPARTIDA POR LA SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO, MEDIANTE EL OFICIO DEL 18 DE NOVIEMBRE DE 1996, LA FIRMA MECANICA QUE APARECE A CONTINUACION TIENE PLENA VALIDEZ PARA TODOS LOS EFECTOS LEGALES

Jaime Vargas Castro



CAVELIER

ABOGADOS
EDIFICIO SIŠKI
CARRERA 4a N° 72-35
BOGOTÁ, 8 - COLOMBIA

REPRESENTACION

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned
**BURNHAM INSTITUTE FOR MEDICAL
RESEARCH**

domiciliado (s) 10901 North Torrey Pines Road, La
en/of Jolla, California 92037, United States
of America

Por el presente nombramos a CAVELIER ABOGADOS, sociedad colectiva constituida de conformidad con las leyes de la República de Colombia, mediante Escritura Pública No. 6233 del 10 de septiembre de 1974, otorgada en la Notaría Sexta del Circuito de Bogotá, domiciliada en Bogotá D.C., con matrícula mercantil No. 00820237 y NIT 860041367-3, domiciliada en la Carrera 4a N° 72-35, Bogotá, Colombia, como nuestra representante en todos los asuntos de Propiedad Industrial, con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales.

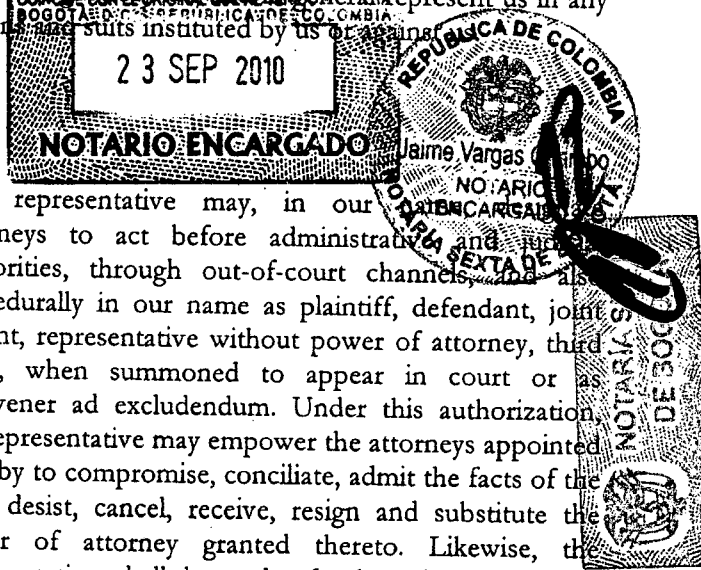
CAVELIER ABOGADOS también podrá representarnos, con las mismas facultades arriba indicadas, ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, autoridades administrativas o jurisdiccionales, tribunales de arbitramento, en asuntos de naturaleza civil, comercial, penal, constitucional, competencia, competencia desleal, administrativa, contencioso administrativa, protección del consumidor, variedades vegetales, nombres de dominio, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, acciones de tutela, la protección de secretos industriales, derecho regulatorio y en general para que nos represente en cualesquiera acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan.

La representante podrá, en nuestro nombre, designar apoderados para actuar ante autoridades administrativas y judiciales, por vía extrajudicial y también procesalmente en nuestro nombre, como demandantes, como demandados, como litisconsortes, como agentes oficiosos, como terceros, por llamamiento en garantía o como intervinientes ad excludendum. Dentro de esta autorización, la representante podrá facultar a los apoderados que ella designe para transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar y sustituir el poder que se le otorgue. Así mismo, la representante tendrá la facultad para revocar

REPRESENTATION

Do hereby appoint CAVELIER ABOGADOS, a general partnership organized under the laws of the Republic of Colombia by means of Public Deed No. 6233 of September 10, 1974, granted at Notary Sixth of the Bogota Circuit, domiciled in Bogota D.C., with Mercantile Registration No. 00820237 and Taxpayer Identification Number 860041367-3, domiciled at Carrera 4a N° 72-35, Bogota, Colombia, as our representative for all Industrial Property matters with faculty to receive notifications and appoint attorneys in and out of Court.

CAVELIER ABOGADOS may also represent us, with the same faculties stated above, before any entities or persons, with or without jurisdiction, administrative or jurisdictional authorities, courts of arbitration, in civil, commercial, criminal, constitutional, competition, unfair competition, administrative, administrative contentious, consumer protection, plant varieties, domain names, opposition or observation matters, administrative and Court cancellation, nullity, precautionary measures, licenses, trademarks, industrial property, protection of trade secrets, and in general represent us in any actions and suits instituted by us or against us.



The representative may, in our name, designate attorneys to act before administrative and judicial authorities, through out-of-court channels, and also procedurally in our name as plaintiff, defendant, joint litigant, representative without power of attorney, third party, when summoned to appear in court or as intervensor ad excludendum. Under this authorization, the representative may empower the attorneys appointed thereby to compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign and substitute the power of attorney granted thereto. Likewise, the representative shall have the faculty of revoking the

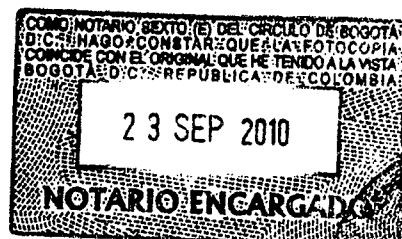
el poder así otorgado en el momento que considere pertinente. La representante en todo caso podrá ratificar los actos de agentes oficiosos.

power of attorney thus granted at any time it may deem convenient. The representative may in any case ratify the acts of representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/Given and signed this 5. August 2010
En/in La Jolla, CA

Por/by MARGARET M. DUNBAR
Sr. Dir. IP and Legal Affairs

Firma/Signature Margaret M. Dunbar



State of California

SECRETARY OF STATE

Requested for use in Colombia.

Not for use within the United States of America.

The purpose of the Apostille is to certify the authenticity of the signature of the official signing the document, the capacity in which the official signing the document has acted, and, where appropriate, the identity of the seal or stamp.

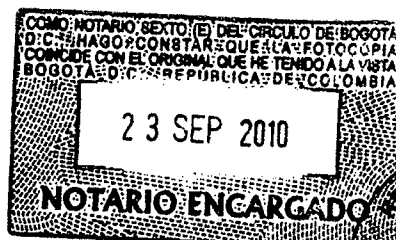
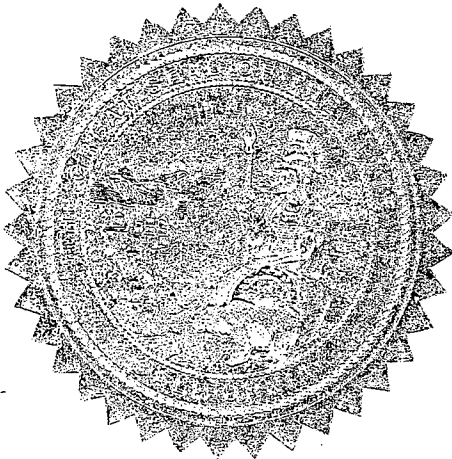
APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America
This public document
2. has been signed by Maureen M. Wilbat
3. acting in the capacity of Notary Public, State of California
4. bears the seal/stamp of Maureen M. Wilbat, Notary Public,
State of California

CERTIFIED

5. At Sacramento, California
6. the 23rd day of August 2010
7. by Deputy Secretary of State, State of California
8. No. 858545
9. Seal/Stamp:



10. Signature

John Bowen
Secretary of State

BY

RAY

CERTIFICACION NOTARIAL (SOCIEDAD)

El infrascrito Notario Certifica: Que la firma que antecede de

es auténtica; que el signatario desempeña actualmente el cargo de

de la compañía

sociedad que actualmente existe y está organizada de acuerdo a las leyes de

que la dirección de dicha compañía es

y que el signatario tiene facultad para otorgar este documento.

Todos los hechos anteriores le constan por haber examinado los documentos respectivos y de todo ello da fe.

Dado y firmado en

El

NOTARIAL CERTIFICATION (COMPANY)

The undersigned Notary certifies: That the preceding signature of

Margaret M. Dunbar

is authentic, that the signatory currently acts in the position of

Sr. Dir, IP and Legal Affairs

of the company Burnham Institute for

Medical Research

a company currently existing and organized under the laws of

California

that the address is 10901 N. Torrey Pines

Road, La Jolla, California

92037

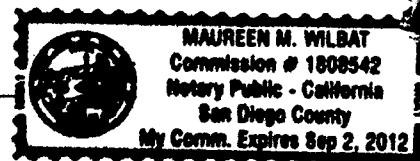
and that the signatory has the power to grant this document.

The Notary Public is aware and attests to the above facts upon examination of the corresponding documents.

Given and signed in La Jolla, California

On 5 August 2010

Maureen M. Wilbat
El Notario Público - The Notary Public
(Firma-sello) (Signature-seal)



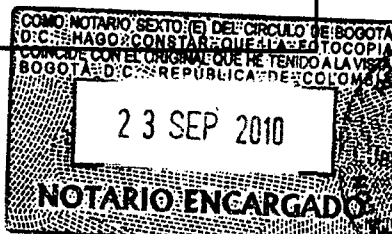
APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country:
This public document
2. has been signed by
3. acting in the capacity of
4. bears the seal/stamp of

Certified

5. at 6. the
7. by
8. No.
9. Seal/stamp 10. Signature



Nota:

PARA SOCIEDADES

El documento de Representación deberá ser firmado por el representante legal de la compañía. Deberá ser presentado ante Notario Público para que certifique que la persona que firma es quien dice ser. La firma del señor Notario deberá ser legalizada.*

Adicionalmente deberá anexarse copia legalizada* del documento que pruebe la existencia y representación legal de la sociedad.

*La legalización podrá ser por Apostilla si el país del otorgante hace parte de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961 o ante el Cónsul de Colombia en caso contrario. Una sola legalización que incluya ambos documentos sería suficiente.

PARA PERSONAS NATURALES

El documento de Representación deberá ser firmado por el otorgante. El Notario Público deberá certificar que la persona que firma es quien dice ser.

Posteriormente el documento de Representación deberá ser legalizado por Apostilla si el país del otorgante hace parte de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961 o ante el Cónsul de Colombia en caso contrario.

23
Note:

FOR CORPORATIONS

The Representation document should be signed by the Legal Representative of the company. It should be produced before a Notary Public, who should certify that the person signing the same is in fact who he/she purports to be. The Notary's signature should then be legalized.*

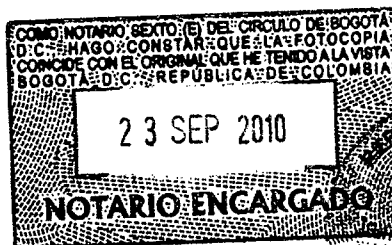
In addition a legalized copy* of the document proving the existence and legal representation of the company should also be attached.

*Legalization may be made by Apostille if the issuing country is a member of the The Hague Convention of October 5, 1961, or before the Colombian Consulate if otherwise. A single legalization that would include both documents would be sufficient.

FOR INDIVIDUALS

The Representation should be signed by the grantor. The Notary Public should certify that the person signing is who he/she purports to be.

Subsequently, the Representation document should be legalized by Apostille if the issuing country is a member of the The Hague Convention of October 5, 1961 or before the Colombian Consulate if otherwise.



TRADUCCIÓN OFICIAL 281/2010 DE UN DOCUMENTO EN IDIOMA INGLÉS
 REALIZADA POR EDUARDO CALADO NOGUERA, TRADUCTOR OFICIAL
 APROBADO POR RESOLUCION 541 DEL 27 DE FEBRERO DE 1976
 EXPEDIDA POR EL MINISTERIO DE JUSTICIA DE COLOMBIA Y
 DEBIDAMENTE REGISTRADO ANTE EL MINISTERIO DE RELACIONES
 EXTERIORES DE COLOMBIA, POR EL CUAL BURNHAM INSTITUTE FOR
 MEDICAL RESEARCH. DOMICILIADA EN 10901 NORTH TORREY PINES
 ROAD, LA JOLLA, CALIFORNIA 92037, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
 OTORGA REPRESENTACIÓN EN ASUNTOS RELACIONADOS CON PROPIEDAD
 INDUSTRIAL A CAVELIER ABOGADOS.

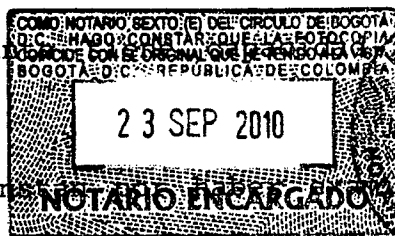
DADO Y FIRMADO HOY 5 DE AGOSTO DE 2010 EN LA JOLLA,
 CALIFORNIA POR MARGARET M. DUNBAR, DIRECTOR PRINCIPAL,
 ASUNTOS JURIDICOS Y DE PROPIEDAD INDUSTRIAL.

CERTIFICACIÓN NOTARIAL (COMPAÑÍA)

El abajo firmante notario certifica que la firma precedente
 de MARGARET M DUNBAR es auténtica y que el firmante
 actualmente desempeña el cargo de DIRECTOR, ASUNTOS JURIDICOS
 Y DE PROPIEDAD INDUSTRIAL de la compañía BURNHAM INSTITUTE
 FOR MEDICAL RESEARCH, una compañía actualmente existente y
 organizada de acuerdo con las leyes de California; que su
 dirección es 10901 N. TORREY PINES ROAD, LA JOLLA,
 CALIFORNIA, 92037 y que el firmante otorga este documento.

Todos los hechos anteriores le constan por los documentos respectivos y de todo ello da fe.

Dado y firmado en La Jolla, California, el 5 de agosto de
 2010. Firmado: MAUREEN M. WILBAT



Eduardo Calado N.
 EDUARDO CALADO NOGUERA
 TRADUCTOR OFICIAL
 Inglés - Español - Inglés
 Res. 541 Febrero de 1976

24

SELLO: MAUREEN M. WILBAT, CARGO #1808542. NOTARIO PÚBLICO,
CALIFORNIA. CONDADO DE SAN DIEGO. MI CARGO VENCE EL 2 DE
SEPTIEMBRE DE 2012.

ESTADO DE CALIFORNIA

SECRETARIA DE ESTADO

Solicitado para uso en Colombia. No es para usarlo en los
Estados Unidos de América. El objetivo de esta apostilla es
certificar la autenticidad de la firma del funcionario
firmante del documento, la calidad de acuerdo con la
dicho funcionario ha actuado y cuando fuere aprobo, la
identidad del sello o estampilla

APOSTILLA

(CONVENCION DE LA HAYA DEL 5 DE OCTUBRE DE 1961)

1. PAIS: ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

Este documento público

2. ha sido firmado por MAUREEN M WILLBAT

3. quien actúa en su calidad de NOTARIO PÚBLICO, ESTADO DE CALIFORNIA

4. lleva el sello/estampilla de MAUREEN M WILLBAT, NOTARIO PÚBLICO, ESTADO DE CALIFORNIA

CERTIFICADO

5. En Sacramento, California

6. e

7. por el secretario de estado suplente, estado de California

8. No. 858545

9. Sello/estampilla: EL GRAN SELLO DEL ESTADO DE CALIFORNIA
FIJADO SOBRE PAPEL DORADO BRILLANTE EN FORMA DE ESTRELLA.

10. Firma: DEBRA BOWEN, secretaria de estado. Por : firma
ilegible.

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES
20 SET 2012 29 1
DEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO
032794
CUYA FIRMA APARECE EN
DOCUMENTOS ENSEMPEN
AS FUNCIONES INDICADAS

NOTARIO ENCARGADO
23 SEP 2010
NOTARIO ENCARGADO
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA



Edmundo Calado
TRADUCTOR OFICIAL
Inglés - Español - Inglés
Res. 541 Febrero de 1976

COLO-17756-841-001-9

ECN\ECN\ID-178757\WPCL002G

417 palabras. 1 hora

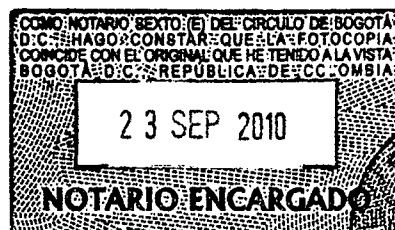
Bogotá, 19 de septiembre de 2010.

Eduardo Colado

TRADUCTOR OFICIAL

Inglés - Español - Inglés

Des. 541 Febrero de 1976





actos de agentes oficiosos. -----

QUINTO: Que protocoliza con la presente escritura, un certificado expedido por la Cámara de Comercio de Bogotá, que acredita la constitución y personería de la sociedad **CAVELIER ABOGADOS**, igualmente protocoliza

copia autenticada del documento de representación otorgado el día **05 de Agosto de 2010** por **BURNHAM INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH**, documento que está debidamente legalizado por Apostilla. -----

Presente la señora **ADRIANA ZAPATA GIRALDO** domiciliada en Bogotá, identificada como aparece al pie de su firma y manifestó que está conforme con el contenido de esta escritura pública. -----

----- **HASTA AQUI LAS DECLARACIONES DEL INTERESADO** -----

OTORGAMIENTO Y AUTORIZACIÓN. Leído, el presente instrumento público por el otorgante, dio su asentimiento y en prueba de ello lo firma junto con la suscrita Notaria quien en esta forma lo autoriza. -----

DERECHOS NOTARIALES: \$ **42.860** -----

VA: \$ **17.560** -----

RECAUDO SUPERINTENDENCIA: \$3.570.00 -----

RECAUDO FONDO NACIONAL DE NOTARIADO: \$3.570.00 -----

RESOLUCIÓN 10301 DE DICIEMBRE 17 DE 2009 -----

PAPEL NOTARIAL: El presente instrumento público se extendió y firmó en las hojas de papel notarial números: **7-700065,003826,7-700065,003833** ✓

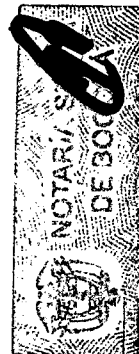
EN BLANCO... EN BLANCO

ADRIANA ZAPATA GIRALDO

C.C. 51650261

TEL. 2110348

Representante Legal de CAVELIER ABOGADOS





JAIME VARGAS CHAMBO
NOTARIA(O) SEXTA(O) (6) (E) / DE BOGOTÁ, D.C.

T CAVELIER,Angelica.PE

48.

ES FIEL Y SEGUNDA (FOTOCOPIA) TOMADA DE LA ESCRITURA PUBLICA
NUMERO 5090 DE FECHA 23 DE SEPTIEMBRE DE 2010.

COPIA QUE EXPIDO CON DESTINO AL INTERESADO EN 10 HOJAS RUBRICADAS
EN SUS MARGENES, LA CUAL CARECE DE NOTAS DE REVOCATORIA,
MODIFICACION O SUSTITUCION, POR TANTO SE PRESUME VIGENTE EL PODER
EN ELLA CONTENIDO.

BOGOTAD.C. SEPTIEMBRE 25 DE 2010

RESOLUCION 01 DE 2009

POR LA NOTARIA SEXTA



JAIME VARGAS C.
NOTARIO ENCARGADO

Ant

2

The Commonwealth of Massachusetts

William Francis Galvin
Secretary of the Commonwealth

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document

2. has been signed by: Karen Frances Lech Elbing

3. acting in the capacity of: Notary Public

4. bears the seal/stamp of: Karen Frances Lech Elbing
whose commission expires on: August 4, 2011

Certified

5. at: Boston, Massachusetts

6. the: 12 August, 2010

7. by: the Secretary of the Commonwealth

8. No.: 1472940

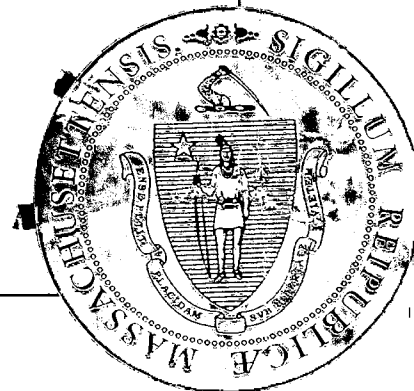
9. Seal/stamp:

Great Seal of the Commonwealth

10. Signature:



William Francis Galvin
Secretary of the Commonwealth



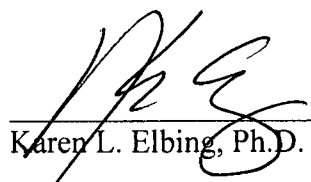
28

United States of America :

Commonwealth of Massachusetts :

County of Suffolk :

On this 17th day of August, 2010, I certify that the attached document is a true, exact, complete, and unaltered copy of a Notice of Recordation of Assignment Document and Assignment as recorded for U.S.S.N. 12/746,622, U.S.S.N. 61/091,599, U.S.S.N. 61/005,725, and International Application Serial No. PCT/US2008/085876, at Reel/Frame No. 024693/0125, recorded 15-Jul-2010 (MARASCO et al. to DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.).



Karen L. Elbing, Ph.D.

Notary Public

My commission expires:

August 4, 2011

•
•

29

A 1807382



THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE

United States Patent and Trademark Office

August 03, 2010

**THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED IS A TRUE COPY FROM THE
RECORDS OF THIS OFFICE OF A DOCUMENT RECORDED ON
JULY 15, 2010.**

**By Authority of the
Under Secretary of Commerce for Intellectual Property
and Director of the United States Patent and Trademark Office**

T. Lawrence

**T. LAWRENCE
Certifying Officer**



PATENT ASSIGNMENT

Electronic Version v1.1
Stylesheet Version v1.1

07/15/2010
501233845

SUBMISSION TYPE:	NEW ASSIGNMENT										
NATURE OF CONVEYANCE:	ASSIGNMENT										
CONVEYING PARTY DATA											
<table border="1"><thead><tr><th>Name</th><th>Execution Date</th></tr></thead><tbody><tr><td>Wayne A. Marasco</td><td>06/30/2010</td></tr><tr><td>Jianhua Sui</td><td>06/29/2010</td></tr></tbody></table>		Name	Execution Date	Wayne A. Marasco	06/30/2010	Jianhua Sui	06/29/2010				
Name	Execution Date										
Wayne A. Marasco	06/30/2010										
Jianhua Sui	06/29/2010										
RECEIVING PARTY DATA											
Name:	Dana-Farber Cancer Institute, Inc.										
Street Address:	44 Binney Street										
City:	Boston										
State/Country:	MASSACHUSETTS										
Postal Code:	02115										
PROPERTY NUMBERS Total: 4											
<table border="1"><thead><tr><th>Property Type</th><th>Number</th></tr></thead><tbody><tr><td>Application Number:</td><td>12746622</td></tr><tr><td>Application Number:</td><td>61091599</td></tr><tr><td>Application Number:</td><td>61005725</td></tr><tr><td>PCT Number:</td><td>US0885876</td></tr></tbody></table>		Property Type	Number	Application Number:	12746622	Application Number:	61091599	Application Number:	61005725	PCT Number:	US0885876
Property Type	Number										
Application Number:	12746622										
Application Number:	61091599										
Application Number:	61005725										
PCT Number:	US0885876										
CORRESPONDENCE DATA											
Fax Number:	(617)428-7045										
<i>Correspondence will be sent via US Mail when the fax attempt is unsuccessful.</i>											
Phone:	6174280200										
Email:	patentadministrator@clarkelbing.com										
Correspondent Name:	Karen L. Elbing										
Address Line 1:	Clark & Elbing LLP										
Address Line 2:	101 Federal Street										
Address Line 4:	Boston, MASSACHUSETTS 02110										
ATTORNEY DOCKET NUMBER:	50474/022XXX										
NAME OF SUBMITTER:	Karen L. Elbing										

CH \$160.00 12746622

REEL: 024693 FRAME: 0125

Total Attachments: 2

source=50474_022003_assignment_Dana_Farber#page1.tif

source=50474_022003_assignment_Dana_Farber#page2.tif

31

REEL: 024693 FRAME: 0126

ASSIGNMENT

WHEREAS, Wayne A. Marasco, a citizen of the United States, residing at 43 Rice Street, Wellesley, Massachusetts 02481, and Jianhua Sui, a citizen of China, residing at 4576 Tremont Street, #212, Boston, Massachusetts 02120, (hereinafter "ASSIGNOR"), have invented a new and useful invention in

180 Main Street 30A,
Stoughton, Massachusetts, JS, 05/29/2010
02150

ANTIBODIES AGAINST INFLUENZA VIRUS AND METHODS OF USE THEREOF

for which provisional application Serial No. 61/005,725 filed on December 6, 2007, provisional application Serial No. 61/091,599 filed on August 25, 2008, International Application No. PCT/US2008/085876 filed on December 8, 2008, and U.S. national phase application Serial No. 12/746,622 filed on June 7, 2010 have been filed;

WHEREAS, DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC., a non-profit corporation organized and existing under and by virtue of the laws of the Commonwealth of Massachusetts, having a place of business at 44 Binney Street, Boston, Massachusetts 02115, is desirous of acquiring an interest in and to said invention, and in and to the Letters Patents to be obtained therefor;

NOW, THEREFORE, be it known by all whom it may concern:

That for good and valuable consideration the receipt of which is hereby acknowledged, the said ASSIGNOR have and do hereby sell, assign, transfer and set over unto the said DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC., its successors and assigns, the full and exclusive right, title and interest including all rights under the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, in and to said invention, and in and to any and all Letters Patents to be granted and issued therefor or any continuation, division, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patents any reissue or re-examination thereof, not only for, to, and in the United States of America, its territories and possessions, but for, to, and in all other countries; and it has been and is hereby authorized and requested that the appropriate government agencies issue said Letters Patents to said DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC., in accordance with this Assignment.

Said ASSIGNOR covenants and agrees to cooperate with DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC., to enable said DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC. to enjoy to the fullest extent the right, title and interest herein conveyed in the United States and foreign countries. Such cooperation by said ASSIGNOR includes prompt production of pertinent facts and documents, giving of testimony, execution of petitions, oaths, specifications, declarations or other papers, and other assistance all to the extent deemed necessary or desirable by said DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC., (a) for perfecting the right, title and interest herein conveyed; (b) for prosecuting any of said applications; (c) for filing and prosecuting applications for reissuance of any of said patents; (d) for interference or other priority proceedings involving said invention; and (e) for legal proceedings involving said invention and any applications therefor and any patents granted thereon, including without limitation opposition proceedings, cancellation proceedings, priority contests, public use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by said ASSIGNOR in providing

33.

such cooperation shall be paid for by said DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC. This assignment also includes the right to sue for past acts of infringement, whether based on any patents listed herein, patents issuing from applications listed herein, or provisional rights from any patent applications listed herein.

If necessary, said ASSIGNOR authorizes and requests that DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC., or their representatives and assigns, hereafter complete this assignment by inserting filing date and serial number information when known.

The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC., its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon said ASSIGNOR, their respective heirs, legal representatives and assigns.

Said ASSIGNOR hereby warrants and represents that he has not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF I undersign as follows;

44 BINNEY ST.
BOSTON, MA 02115

City and Town

Dated: 6-30-2010

44 Binney Street, Boston,
Massachusetts 02115

City and Town

Dated: 06/28/2010


Wayne A. Marasco


Jianhua Sui

34
TRADUCCIÓN OFICIAL No. 09.20/10a realizada por Diego Vargas, Traductor
Oficial, Resolución No. 0001 de 1999 del Ministerio de Justicia,
registrado ante el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia.



LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

A TODOS A QUIENES ESTOS PRESENTES LLEGAREN:

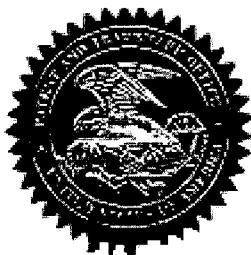
DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE LOS ESTADOS UNIDOS

OFICINA DE MARCAS Y PATENTES DE LOS ESTADOS UNIDOS

3 de agosto de 2010

EL PRESENTE ES PARA CERTIFICAR QUE LA ADJUNTA ES UNA COPIA
FIEL DE LOS ARCHIVOS DE ESTA OFICINA DE UN DOCUMENTO INSCRITO
EL 15 DE JULIO DE 2010.

Por autorización del: Subsecretario de Comercio para
la Propiedad Intelectual y Director de la Oficina de
Marcas y Patentes de los Estados Unidos



Firma Ilegible

T. LAWRENCE
Funcionario de Autenticaciones

Diego F. Vargas
DIEGO F. VARGAS Z.

TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLÉS - INGLÉS - ESPAÑOL

RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999

Sello: Oficina de Marcas y Patentes, Estados Unidos de América

35

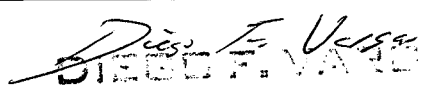
CESIÓN DE PATENTE

Versión Electrónica v1.1 07/15/2010
Versión Formulario v1.1 501233845

CLASE DE PRESENTACIÓN:	NUEVA CESIÓN										
CLASE DE TRANSFERENCIA:	CESIÓN										
INFORMACIÓN DE LA PARTE TRANSFERENTE:											
<table border="1"><thead><tr><th>Nombre</th><th>Fecha de Firma</th></tr></thead><tbody><tr><td>Wayne A. Marasco</td><td>06/30/2010</td></tr><tr><td>Jianhua Sui</td><td>06/29/2010</td></tr></tbody></table>		Nombre	Fecha de Firma	Wayne A. Marasco	06/30/2010	Jianhua Sui	06/29/2010				
Nombre	Fecha de Firma										
Wayne A. Marasco	06/30/2010										
Jianhua Sui	06/29/2010										
INFORMACIÓN DE LA PARTE RECEPTORA											
<table border="1"><tr><td>Nombre:</td><td>Dana-Farber Cancer Institute, Inc.</td></tr><tr><td>Dirección:</td><td>44 Binney Street</td></tr><tr><td>Ciudad:</td><td>Boston</td></tr><tr><td>Estado/País:</td><td>MASSACHUSETTS</td></tr><tr><td>Código Postal:</td><td>02115</td></tr></table>		Nombre:	Dana-Farber Cancer Institute, Inc.	Dirección:	44 Binney Street	Ciudad:	Boston	Estado/País:	MASSACHUSETTS	Código Postal:	02115
Nombre:	Dana-Farber Cancer Institute, Inc.										
Dirección:	44 Binney Street										
Ciudad:	Boston										
Estado/País:	MASSACHUSETTS										
Código Postal:	02115										
NÚMERO DE BIENES Total: 4											
<table border="1"><thead><tr><th>Clase de Propiedad</th><th>Número</th></tr></thead><tbody><tr><td>Solicitud Número:</td><td>12746622</td></tr><tr><td>Solicitud Número:</td><td>61091599</td></tr><tr><td>Solicitud Número:</td><td>61005725</td></tr><tr><td>PCT Número:</td><td>US0885876</td></tr></tbody></table>		Clase de Propiedad	Número	Solicitud Número:	12746622	Solicitud Número:	61091599	Solicitud Número:	61005725	PCT Número:	US0885876
Clase de Propiedad	Número										
Solicitud Número:	12746622										
Solicitud Número:	61091599										
Solicitud Número:	61005725										
PCT Número:	US0885876										
INFORMACIÓN DE CORRESPONDENCIA											
Número de Fax: (617) 428-7045											
<i>Correspondencia será enviada por correo aéreo de los Estados Unidos si la transmisión por fax es infructuosa.</i>											
Teléfono: 6174280200											
Dirección electrónica: patentadministrator@clarkelbing.com											
Nombre del Corresponsal: Karen L. Elbing											
Línea de Dirección 1: Clark & Elbing LLP											
Línea de Dirección 2: 101 Federal Street											
Línea de Dirección 4: Boston, MASSACHUSETTS, 02110											
NÚMERO ASUNTO APODERADO:	50474/022XXX										
NOMBRE DEL REMITENTE:	Karen L. Elbing										

ROLLO:024693 CUADRO: 012

Total Anexos: 2
fuente=50474_022003_assignment_Dana_Farber#pagel.tif
fuente=50474_022003_assignment_Dana_Farber#page2.tif

 ROLLO:024693 CUADRO:
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLÉS - INGLÉS - ESPAÑOL
RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999
MINISTERIO DE JUSTICIA

CESIÓN

CONSIDERANDO que Wayne A. Marasco, ciudadano de los Estados Unidos, domiciliado en 43 Rice Street, Wellesley, Massachusetts 02481 y Jianhua Sui, ciudadano de China, domiciliado en 159 Main Street #30A, Stoneham, Massachusetts, 02180, hemos inventado una nueva y útil invención con relación a

ANTICUERPOS CONTRA EL VIRUS DE LA INFLUENZA Y MÉTODO

DE USO DE LOS MISMOS

para la cual se han presentado la solicitud provisional con número de serie 61/005,725, presentada el 6 de diciembre de 2007, la solicitud provisional con número de serie 61/091,599, presentada el 25 de agosto de 2008, la Solicitud Internacional con número de serie PCT/US2008/085876, presentada el 8 de diciembre de 2008 y la solicitud de fase nacional en los Estados Unidos con número de serie 12/746,622, presentada el 7 de junio de 2010;

CONSIDERANDO que DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC., una sociedad sin ánimo de lucro organizada y existente de conformidad y en virtud de las leyes del Estado de Massachusetts, domiciliada en 44 Binney Street, Boston, Massachusetts 02115, desea adquirir un interés en y a dicha invención, así como en y a las patentes de invención que se lleguen a obtener para la misma;

POR CONSIGUIENTE, se hace saber a quien corresponda:

Que por contraprestación legal y válida, el recibo de la cual se reconoce por el presente, el mencionado CEDENTE ha y por el presente vende, cede, transfiere y traspasa a la mencionada DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC., a sus sucesores y cesionarios, el

DIEGO F. VARGAS Z.

TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL

ESPAÑOL - INGLÉS - INGLÉS - ESPAÑOL

RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999

MINISTERIO DE JUSTICIA

33

total y exclusivo derecho, título e interés, incluyendo todos los derechos de conformidad con la Convención de París para la Protección de la Propiedad Industrial en y a dicha invención, así como en y a todas las patente de invención que se lleguen a obtener y expedir para la misma y para todas las continuaciones, divisiones, renovaciones o reemplazos de las mismas, y con respecto a las patentes de invención, cualquier nueva publicación o nuevo examen de la misma, no sólo para, en y dentro de los Estados Unidos de América, de sus territorios y posesiones, sino para, en y dentro de todos demás países; y ha sido y por el presente se autoriza y se le solicita a las agencias gubernamentales correspondientes para que expidan dichas patentes de invención a nombre de la mencionada DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC. de conformidad con esta Cesión.

Dicho CEDENTE acuerda y se compromete a cooperar con DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC. para permitirle a la mencionada DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC. que disfrute hasta el máximo alcance el derecho, título e interés enajenado por el presente, tanto en los Estados Unidos como los países extranjeros. Dicha cooperación por parte del mencionado CEDENTE, incluye la pronta presentación de los hechos y documentos pertinentes, la rendición de testimonio, suscripción de peticiones, juramentos, descripciones, declaraciones u otros documentos, así como otras ayudas, todas hasta el alcance considerado necesario o conveniente por parte de dicha DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC. (a) para perfeccionar el derecho, título e interés enajenado por el presente; (b) para tramitar todas las mencionadas solicitudes; (c) para presentar y tramitar solicitudes de nueva publicación de cualquiera de dichas patentes; (d) para procesos de interferencia u otro tipos de procesos de prioridad que involucren a dicha invención; y (e) para procesos legales que

DIEGO F. VARGAS Z.

TRANSCRIBIDOR E INTERPRETE OFICIAL

ESPAÑOL - INGLES - INGLES - ESPAÑOL

RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999

MINISTERIO DE JUSTICIA

38

involucren dicha invención y todas las solicitudes para la misma y todas las patentes otorgadas para la misma, incluyendo, sin limitación, procesos de oposición, procesos de cancelación, controversias de prioridad, procesos de uso público, acciones por infracción y acciones de tribunales; siempre y cuando, no obstante lo anterior, los gastos incurridos por dicho CEDENTE para

ROLLO:024693 CUADRO:

proporcionar dicha cooperación sean pagados por la mencionada DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC. Esta cesión incluye también el derecho de presentar demandas por actos de infracción pasados, ya sean basados en cualquiera de las patentes relacionadas en el presente, patentes que surjan de solicitudes relacionadas en el presente o derechos provisionales de cualquier solicitud de patente relacionada en el presente.

En caso de ser necesario, el CEDENTE autoriza y solicita a la mencionada DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC. o a sus representantes y cesionarios, para que completen posteriormente esta cesión mediante la inscripción de la información relativa a la fecha de presentación y el número de serie una vez sean conocidos.

Los términos y cláusulas de este acuerdo redundarán en beneficio de la mencionada DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC., de sus sucesores, cesionarios y de otros representantes legales y serán obligatorios para dicho CEDENTE, para sus respectivos herederos, representantes legales y cesionarios.

El mencionado CEDENTE por el presente garantiza y representa que no ha suscrito, ni suscribirá, ninguna cesión, contrato o entendimiento que esté en conflicto con la presente.


DIEGO F. VARGAS Z.
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLES - INGLES - ESPAÑOL
RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999 5
MINISTERIO DE JUSTICIA

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, lo firmo de la siguiente forma:

44 BINNEY ST.
BOSTON, MA 02115

Firma Ilegible
Wayne A. Marasco

Fechado: 6-30-2010

44 BINNEY ST.
BOSTON, MA 02115

Firma Ilegible
Jianhua Sui

Fechado: 06/29/2010

Estados Unidos de América :
Estado de Massachusetts :
Condado de Suffolk :

Hoy 11 de agosto de 2010, certifico que el documento adjunto es una copia fiel, exacta, completa e inalterada de una Notificación de Inscripción de un Documento de Cesión y Cesión tal como fue inscrita para las solicitudes de los Estados Unidos con números de serie 12/746,622; 61/091,599; 61/005,725 y para la Solicitud Internacional con Número de Serie PCT/US2008/085876 en el Rollo/Cuadro No. 024693/0125, inscrito el 15 de julio de 2010 (MARASCO et al. a DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.).

Firma Ilegible
Karen L. Elbing, Ph.D.
Notario Público
Mí Comisión vence:
4 de agosto de 2011

El Estado de Massachusetts

William Francis Galvin

Diego F. Vargas
DIEGO F. VARGAS Z.
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLES - INGLES - ESPAÑOL
RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999
MINISTERIO DE JUSTICIA 6

Secretario del Estado

APOSTILLA

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. ha sido firmado por: Karen Frances Lech Elbing
3. actuando en capacidad de Notario Público
4. lleva el sello/estampilla de: Karen Frances Lech Elbing
cuya comisión vence el: 4 de agosto de 2011

CERTIFICADO

5. en Boston, Massachussets
6. el: 12 de agosto de 2010
7. por el Secretario del Estado
8. No.: 1472940
9. Sello/Estampilla:

Gran Sello del Estado

10. Firma:
Firma ilegible
William Francis Galvin
Secretario del Estado

Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta oficina para su confrontación.

DVZ\DVZ\ID-178956\WPCL002H\COLO 17756-841-001-9

CP: 1334 TMIN: 100

DIEGO F. VARGAS Z.

TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLES - INGLES - ESPAÑOL

RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999

MINISTERIO DE JUSTICIA

BOGOTÁ D.C.

JEFE DE LEGALIZACIONES

2010 SET 23 P 1:24

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

AS FUNCIONES INDICADAS
DOCUMENTO DESEMPENA
CUYA FIRMA APARECE EN EL

033162

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO

The Commonwealth of Massachusetts

William Francis Galvin
Secretary of the Commonwealth

AWT

21

U

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America
This public document
2. has been signed by: Karen Frances Lech Elbing
3. acting in the capacity of: Notary Public
4. bears the seal/stamp of: Karen Frances Lech Elbing
whose commission expires on: August 4, 2011

Certified

5. at: Boston, Massachusetts
6. the: 12 August, 2010
7. by: the Secretary of the Commonwealth
8. No.: 1472945
9. Seal/stamp:

Great Seal of the Commonwealth

10. Signature:

William Francis Galvin

William Francis Galvin
Secretary of the Commonwealth



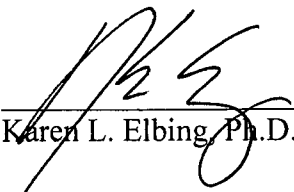
92

United States of America :

Commonwealth of Massachusetts :

County of Suffolk :

On this 11th day of August, 2010, I certify that the attached document is a true, exact, complete, and unaltered copy of a Notice of Recordation of Assignment Document and Assignment as recorded for U.S.S.N. 12/746,622, U.S.S.N. 61/091,599, U.S.S.N. 61/005,725, and International Application Serial No. PCT/US2008/085876, at Reel/Frame No. 024691/0739, recorded 15-Aug-2010 (LIDDINGTON to BURNHAM INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH).



Karen L. Elbing, Ph.D.
Notary Public

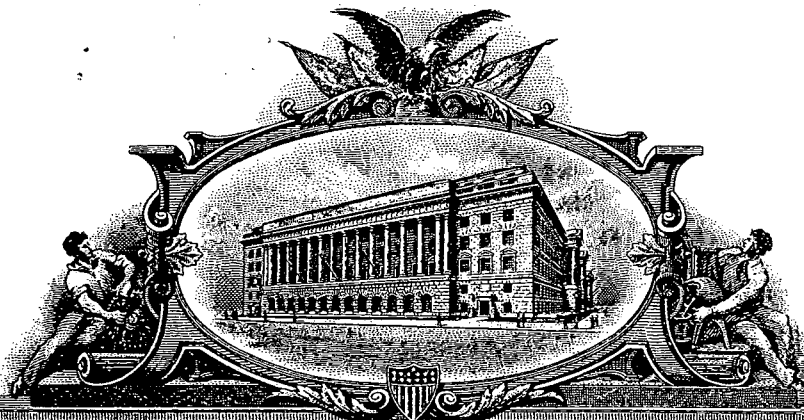
My commission expires:

August 4, 2011



43

A 1807382



THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE

United States Patent and Trademark Office

July 30, 2010

**THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED IS A TRUE COPY FROM THE
RECORDS OF THIS OFFICE OF A DOCUMENT RECORDED ON
JULY 15, 2010.**

**By Authority of the
Under Secretary of Commerce for Intellectual Property
and Director of the United States Patent and Trademark Office**

T. Lawrence

**T. LAWRENCE
Certifying Officer**



PATENT ASSIGNMENT

Electronic Version v1.1
Stylesheet Version v1.1

SUBMISSION TYPE:	NEW ASSIGNMENT
NATURE OF CONVEYANCE:	ASSIGNMENT
CONVEYING PARTY DATA	
Name	Execution Date
Robert C. Liddington	07/14/2010
RECEIVING PARTY DATA	
Name:	Burnham Institute for Medical Research
Street Address:	10901 North Torrey Pines Road
City:	La Jolla
State/Country:	CALIFORNIA
Postal Code:	92037
PROPERTY NUMBERS Total: 4	
Property Type	Number
Application Number:	12746622
Application Number:	61091599
Application Number:	61005725
PCT Number:	US0885876
CORRESPONDENCE DATA	
Fax Number:	(617)428-7045
<i>Correspondence will be sent via US Mail when the fax attempt is unsuccessful.</i>	
Phone:	6174280200
Email:	patentadministrator@clarkelbing.com
Correspondent Name:	Karen L. Elbing
Address Line 1:	Clark & Elbing LLP
Address Line 2:	101 Federal Street
Address Line 4:	Boston, MASSACHUSETTS 02110
ATTORNEY DOCKET NUMBER:	50474/022XXX
NAME OF SUBMITTER:	Karen L. Elbing

501233824

PATENT
REEL: 024691 FRAME: 0739

CH \$160.00 12746622

95

Total Attachments: 2

source=50474_022003_Assignment_Burnham#page1.tif

source=50474_022003_Assignment_Burnham#page2.tif

PATENT
REEL: 024691 FRAME: 0740

ASSIGNMENT

WHEREAS, Robert C. Liddington, a citizen of the United Kingdom, residing at 10901 North Torrey Pines Road, La Jolla, California 92037 (hereinafter "ASSIGNOR"), has invented a new and useful invention in

ANTIBODIES AGAINST INFLUENZA VIRUS AND METHODS OF USE THEREOF

for which provisional application Serial No. 61/005,725 filed on December 8, 2007, provisional application Serial No. 61/091,599 filed on August 25, 2008, International Application No. PCT/US2008/085876 filed on December 8, 2008, and U.S. national phase application Serial No. 12/746,622 filed on June 7, 2010 have been filed;

WHEREAS, BURNHAM INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH, a corporation organized and existing under and by virtue of the laws of the State of California, having a place of business at 10901 North Torrey Pines Road, La Jolla, California 92037, is desirous of acquiring an interest in and to said invention, and in and to the Letters Patents to be obtained therefor;

NOW, THEREFORE, be it known by all whom it may concern;

That for good and valuable consideration the receipt of which is hereby acknowledged, the said ASSIGNOR have and do hereby sell, assign, transfer and set over unto the said BURNHAM INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH, its successors and assigns, the full and exclusive right, title and interest including all rights under the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, in and to said invention, and in and to any and all Letters Patents to be granted and issued therefor or any continuation, division, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patents any reissue or re-examination thereof, not only for, to, and in the United States of America, its territories and possessions, but for, to and in all other countries; and it has been and is hereby authorized and requested that the appropriate government agencies issue said Letters Patents to said BURNHAM INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH, in accordance with this Assignment.

Said ASSIGNOR covenants and agrees to cooperate with BURNHAM INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH, to enable said BURNHAM INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH to enjoy to the fullest extent the right, title and interest herein conveyed in the United States and foreign countries. Such cooperation by said ASSIGNOR includes prompt production of pertinent facts and documents, giving of testimony, execution of petitions, oaths, specifications, declarations or other papers, and other assistance all to the extent deemed necessary or desirable by said BURNHAM INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH, (a) for perfecting the right, title and interest herein conveyed; (b) for prosecuting any of said applications; (c) for filing and prosecuting applications for reissuance of any of said patents; (d) for interference or other priority proceedings involving said invention; and (e) for legal proceedings involving said invention and any applications therefor and any patents granted thereon, including without limitation opposition proceedings, cancellation proceedings, priority contests, public use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by said ASSIGNOR in providing such cooperation shall be paid for by said

PATENT
REEL: 024691 FRAME: 0741

47

BURNHAM INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH. This assignment also includes the right to sue for past acts of infringement, whether based on any patents listed herein, patents issuing from applications listed herein, or provisional rights from any patent applications listed herein.

If necessary, said ASSIGNOR authorizes and requests that BURNHAM INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH, or their representatives and assigns, hereafter complete this assignment by inserting filing date and serial number information when known.

The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said BURNHAM INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon said ASSIGNOR, their respective heirs, legal representatives and assigns.

Said ASSIGNOR hereby warrants and represents that he has not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF I undersign as follows;

La Jolla, CA
City and Town

Robert C. Liddington
Robert C. Liddington

Dated: 7/14/10

RECORDED: 07/15/2010

PATENT
REEL: 024691 FRAME: 0742

48

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 09.20/10b realizada por Diego Vargas, Traductor Oficial, Resolución No. 0001 de 1999 del Ministerio de Justicia, registrado ante el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia.



LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

A TODOS A QUIENES ESTOS PRESENTES LLEGAREN:

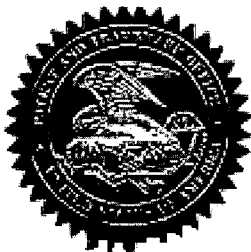
DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE LOS ESTADOS UNIDOS

OFICINA DE MARCAS Y PATENTES DE LOS ESTADOS UNIDOS

30 de julio de 2010

EL PRESENTE ES PARA CERTIFICAR QUE LA ADJUNTA ES UNA COPIA FIEL DE LOS ARCHIVOS DE ESTA OFICINA DE UN DOCUMENTO INSCRITO EL 15 DE JULIO DE 2010.

Por autorización del: Subsecretario de Comercio para la Propiedad Intelectual y Director de la Oficina de Marcas y Patentes de los Estados Unidos



Firma Ilegible

T. LAWRENCE
Funcionario de Autenticaciones

Diego F. Vargas
DIEGO F. VARGAS Z.

TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLES - INGLES - ESPAÑOL

RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999

Sello: Oficina de Marcas y Patentes, Estados Unidos de América

49

CESIÓN DE PATENTE

Versión Electrónica v1.1
Versión Formulario v1.1

CLASE DE PRESENTACIÓN:	NUEVA CESIÓN
CLASE DE TRANSFERENCIA:	CESIÓN
INFORMACIÓN DE LA PARTE TRANSFERENTE:	
Nombre	Fecha de Firma
Robert C. Liddington	07/14/2010
INFORMACIÓN DE LA PARTE RECEPTORA	
Nombre:	Burnham Institute for Medical Research
Dirección:	10901 North Torrey Pines Road
Ciudad:	La Jolla
Estado/País:	CALIFORNIA
Código Postal:	92037
NÚMERO DE BIENES Total: 4	
Clase de Propiedad	Número
Solicitud Número:	12746622
Solicitud Número:	61091599
Solicitud Número:	61005725
PCT Número:	US0885876
INFORMACIÓN DE CORRESPONDENCIA	
Número de Fax:	(617)428-7045
Correspondencia será enviada por correo aéreo de los Estados Unidos si la transmisión por fax es infructuosa.	
Teléfono:	6174280200
Dirección electrónica:	patentadministrator@clarkelbing.com
Nombre del Corresponsal:	Karen L. Elbing
Línea de Dirección 1:	Clark & Elbing LLP
Línea de Dirección 2:	101 Federal Street
Línea de Dirección 4:	Boston, MASSACHUSETTS, 02110
NÚMERO ASUNTO APODERADO:	50474/022XXX
NOMBRE DEL REMITENTE:	Karen L. Elbing

501233824

ROLLO:024691 CUADRO: 0739

Total Anexos: 2
fuelle=50474_022003_Assignment_Burnham#pagel.tif
fuelle=50474_022003_Assignment_Burnham#page2.tif


DIEGO F. VARGAS Z. ROLLO:024691 CUADRO: 0740
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLES - INGLES - ESPAÑOL
RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999
MINISTERIO DE JUSTICIA

CESIÓN

CONSIDERANDO que Robert C. Liddington, ciudadano del Reino Unido, domiciliado en 10901 North Torrey Pines Road, La Jolla, California 92037 (delante en adelante "CEDENTE") ha inventado una nueva y útil invención con relación a

ANTICUERPOS CONTRA EL VIRUS DE LA INFLUENZA Y MÉTODO

DE USO DE LOS MISMOS

para la cual se han presentado la solicitud provisional con número de serie 61/005,725, presentada el 6 de diciembre de 2007, la solicitud provisional con número de serie 61/091,599, presentada el 25 de agosto de 2008, la Solicitud Internacional con número de serie PCT/US2008/085876, presentada el 8 de diciembre de 2008 y la solicitud de fase nacional en los Estados Unidos con número de serie 12/746,622, presentada el 7 de junio de 2010;

CONSIDERANDO que BURNHAM INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH, una sociedad organizada y existente de conformidad y en virtud de las leyes del Estado de California, domiciliada en 10901 North Torrey Pines Road, La Jolla, California 92037, desea adquirir un interés en y a dicha invención, así como en y a las patentes de invención que se lleguen a obtener para la misma;

POR CONSIGUIENTE, se hace saber a quien corresponda:

Que por contraprestación legal y válida, el recibo de la cual se reconoce por el presente, el mencionado CEDENTE ha y por el presente vende, cede, transfiere y traspasa a la mencionada BURNHAM INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH, a sus sucesores y cesionarios, el total y exclusivo derecho, título e interés, incluyendo todos los

DIEGO F. VARELA Z.

TRANSDUCTOR E INTERPRETE OFICIAL

ESPAÑOL - INGLÉS - INGLÉS - ESPAÑOL

RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999

MINISTERIO DE JUSTICIA

51

derechos de conformidad con la Convención de París para la Protección de la Propiedad Industrial en y a dicha invención, así como en y a todas las patente de invención que se lleguen a obtener y expedir para la misma y para todas las continuaciones, divisiones, renovaciones o reemplazos de las mismas, y con respecto a las patentes de invención, cualquier nueva publicación o nuevo examen de la misma, no sólo para, en y dentro de los Estados Unidos de América, de sus territorios y posesiones, sino para, en y dentro de todos demás países; y ha sido y por el presente se autoriza y se le solicita a las agencias gubernamentales correspondientes para que expidan dichas patentes de invención a nombre de la mencionada BURNHAM INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH de conformidad con esta Cesión.

Dicho CEDENTE acuerda y se compromete a cooperar con BURNHAM INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH para permitirle a la mencionada BURNHAM INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH que disfrute hasta el máximo alcance el derecho, título e interés enajenado por el presente, tanto en los Estados Unidos como los países extranjeros. Dicha cooperación por parte del mencionado CEDENTE, incluye la pronta presentación de los hechos y documentos pertinentes, la rendición de testimonio, suscripción de peticiones, juramentos, descripciones, declaraciones u otros documentos, así como otras ayudas, todas hasta el alcance considerado necesario o conveniente por parte de dicha BURNHAM INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH (a) para perfeccionar el derecho, título e interés enajenado por el presente; (b) para tramitar todas las mencionadas solicitudes; (c) para presentar y tramitar solicitudes de nueva publicación de cualquiera de dichas patentes; (d) para procesos de interferencia u otro tipos de procesos de prioridad que involucren a dicha

DIEGO F. VARGAS Z.

TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLES - INGLES - ESPAÑOL

RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999

MINISTERIO DE JUSTICIA

52

invención; y(e) para procesos legales que involucren dicha invención y todas las solicitudes para la misma y todas las patentes otorgadas para la misma, incluyendo, sin limitación, procesos de oposición, procesos de cancelación, controversias de prioridad, procesos de uso público, acciones por infracción y acciones de tribunales; siempre y cuando, no obstante lo anterior, los gastos incurridos por dicho CEDENTE para

ROLLO:024691 CUADRO: 0741

proporcionar dicha cooperación sean pagados por la mencionada BURNHAM INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH. Esta cesión incluye también el derecho de presentar demandas por actos de infracción pasados, ya sean basados en cualquiera de las patentes relacionadas en el presente, patentes que surjan de solicitudes relacionadas en el presente o derechos provisionales de cualquier solicitud de patente relacionada en el presente.

En caso de ser necesario, el CEDENTE autoriza y solicita a la mencionada BURNHAM INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH o a sus representantes y cesionarios, para que completen posteriormente esta cesión mediante la inscripción de la información relativa a la fecha de presentación y el número de serie una vez sean conocidos.

Los términos y cláusulas de este acuerdo redundarán en beneficio de la mencionada BURNHAM INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH, de sus sucesores, cesionarios y de otros representantes legales y serán obligatorios para dicho CEDENTE, para sus respectivos herederos, representantes legales y cesionarios.

El mencionado CEDENTE por el presente garantiza y representa que no ha suscrito, ni suscribirá, ninguna cesión, contrato o entendimiento que esté en conflicto con la presente.

DIEGO F. VAREAS Z.
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLES - INGLES - ESPAÑOL
RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999
MINISTERIO DE JUSTICIA

53

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, lo firmo de la siguiente forma:

La Jolla, CA

Firma Ilegible
Robert C. Liddington

Fechado: 7/14/2010

INSCRITO: 07/15/2010

ROLLO: 024691 CUADRO: 0742

Estados Unidos de América :

Estado de Massachusetts :

Condado de Suffolk :

Hoy 11 de agosto de 2010, certifico que el documento adjunto es una copia fiel, exacta, completa e inalterada de una Notificación de Inscripción de un Documento de Cesión y Cesión tal como fue inscrita para las solicitudes de los Estados Unidos con números de serie 12/746,622; 61/091,599; 61/005,725 y para la Solicitud Internacional con Número de Serie PCT/US2008/085876 en el Rollo/Cuadro No. 024693/0125, inscrito el 15 de julio de 2010 (MARASCO et al. a BURNHAM INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH).

Firma Ilegible
Karen L. Elbing, Ph.D.
Notario Público
Mí Comisión vence:
4 de agosto de 2011

El Estado de Massachusetts

William Francis Galvin

Secretario del Estado

Diego F. Vargas Z.
DIEGO F. VARGAS Z.
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLES - INGLES - ESPAÑOL
RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999
MINISTERIO DE JUSTICIA

54

APOSTILLA

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. ha sido firmado por: Karen Frances Lech Elbing
3. actuando en capacidad de Notario Público
4. lleva el sello/estampilla de: Karen Frances Lech Elbing
cuya comisión vence el: 4 de agosto de 2011

CERTIFICADO

5. en Boston, Massachussets
6. el: 12 de agosto de 2010
7. por el Secretario del Estado
8. No.: 1472945
9. Sello/Estampilla:

Gran Sello del Estado

10. Firma:
Firma ilegible
William Francis Galvin
Secretario del Estado

Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta oficina para su confrontación.

DVZ\DVZ\ID-178961\WPCL002H\COLO 17756-841-001-9

CP: 1324 TMIN: 20

Diego F. Vargas Z.
DIEGO F. VARGAS Z.
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLÉS - INGLÉS - ESPAÑOL
RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999
MINISTERIO DE JUSTICIA

AS FUNCIONES INDICADAS
DOCUMENTO DESEMPEÑA
CUYA FIRMA APARECE EN EL
033161

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO

JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTÁ D.C.
2000 SET 23 P 1: 25
MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

SS

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

APLICACIONES RELACIONADAS

5

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

10

SOPORTE DE OTORGAMIENTO

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

15

CAMPO DE LA INVENCIÓN

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

20

ANTECEDENTES

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

56

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

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

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

RESUMEN DE LA INVENCION

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

virus de influenza A es un virus de influenza A grupo I como el conjunto H1 de virus de influenza, el conjunto H1 de virus de influenza es un conjunto H1a o un conjunto H1b. El anticuerpo monoclonal es completamente humano. En algunos aspectos, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo bivalente, un anticuerpo monovalente, un anticuerpo de cepa sencilla o fragmentos de los mismos.

Específicamente, tales lazos monoclonales a un epítipo en la región del tallo de la proteína hemaglutinina (HA), como los polipéptidos HA1 o HA2. El epítipo es no-lineal.

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

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

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

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

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

58

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

5 anticuerpo tiene una región V_H CDR1 que tiene la secuencia de aminoácido SYAFS, TNAFS, AYAF, SFAIS, SYAIS, GYYIH, MTAFT, o DNAIS; una región V_H CDR2 que tiene la secuencia de aminoácido GIIPMFGTPNYAQKFQG, GVIPLFRTASYAQNQQ, GIIGMFGTANYAQKFQG, GISPMFGTPNYAQKFQG, GIIGVFGVPKYAQKFQG, WINPMTGGTNYAQKFQV, GISPIFRTPKY AQKFQG, o

10 GIIPIFGKPNY AQKFQG; una región V_H CDR3 que tiene la secuencia de aminoácido SSGYYYGGGFDV, SSGYHFGRSHFDS, GLLYYYESSLDY, SPSYICSGGTCVFDH, EPGYYVGKNGFDV, GASVLRYFDWQPEALDI, TLSSYQPNNDFAI, o DADAYYYGSGGMDV; región V_L CDR1 que tiene la secuencia de aminoácido TGSSSNIGNYVA, TGSSSNIAANYVQ,

15 TGTSSDVGGYNSVS, TGNSNNGVGNQGAA, TGDSNNGVGHQGTA, 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,

20 SNEQRPS, o VNSDGSHTKGD y/o región V_L CDR3 que tiene la secuencia de aminoácido QSYDSL SAYV, QSYDTNNHAV, CSYAGHSAYV, STWDSSLSAVV, SVWDSSLSAWV, QVWD SGNDRPL, QQYGSSPQV, QQYDGVPR, QSYDSRLSASL, QQYDSSPYT, ASWDDNL SGWV, o ETWDTKIHV.

En otro aspecto más, la invención provee An aislado un anticuerpo de

25 proteína hemaglutinina monoclonal anti-influenza o fragmento del mismo donde el anticuerpo tiene una secuencia de aminoácido V_H codificada por el gen V_H de línea germinal IGHV1-69*01 y el aminoácido en la posición: a) 27 es una valina; b)

59

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 iónico como la amantadina o rimantadina. El anticuerpo es administrado posterior a 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-antígeno, por lo tanto detectando la presencia de un virus de influenza en una muestra. La muestra de prueba es generalmente obtenida de la sangre, pelo, raspadura o frotis de cachete, saliva, biopsia, orina, heces, esputo, aspiración nasal, o semen.

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



presentación dominante del epítipo de tallo mientras oculta la normalmente inmunodominante cabeza globular.

Por consiguiente, también incluido en la invención esta un método para producir un anticuerpo aislado que enlaza específicamente un virus patogénico
5 envuelto por la exposición de una cadena simple o expresión Fab de colecciona a una proteína de fusión de membrana del virus, identificando un anticuerpo en la colecciona que específicamente enlaza dicha proteína; y aislando el anticuerpo de la colecciona. Preferiblemente, la proteína de fusión es inmovilizada en una superficie solida, p.e. plástico. En varios aspectos la proteína de fusión tiene
10 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
15 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 trimero (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.

20 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
25 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 los 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

62

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

La figura 5 muestra el mecanismo de neutralización. (a) ensayo de inhibición de enlace de virus utilizando virus de longitud-completa HA de pseudotipo H5-TH04 HIV-1. El enlace de virus a células en grupos Ab-tratados fueron comparados con enlaces a células en la ausencia de Ab (definido como 100%). Ninguno de los tres virus inhibidos nAbs (D8, F10 y A66) enlazados a células, mientras que un ratón anti-H5 mAb, 17A2.1.2, y hurón con suero anti-H5N1, los dos hemaglutinina inhibidos y presuntamente enlazados a la cabeza, redujeron enlace significativamente. (b) Inhibición de formación de sincitios por nAbs. Células HeLa fueron transferidas con plásmido de expresión H5-TH04. Formación de sincitios inducida por la exposición corta a tapón de pH 5.0 fue

completamente inhibida por nAbs D8, F10 y A66, a 20 µg/ml, mientras que el control y un anti-HA1 mAb (2A) a la misma concentración no tuvieron efecto.

La figura 6 muestra la estructura del epítipo H5-F10, y conservación secuencial/estructural. (a) Estructura del trímero H5 enlazado a F10 (scFv). H5 es muy similar a la estructura des compleja²¹ (pares RMSD (Ca) = 1.0 y 0.63 Å para 2 trómeros 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 epítipo (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 epítipo están etiquetados con blanco (HA2) o amarillo (HA1). (c) Acercamiento del epítipo mostrando la punta de F10 (cinta roja) y lados de cadena CDR seleccionados. De 1500 Å² 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 W21₂, que está ligado a dirección alterna de lado de cadena a 18₁ y 38₁, el entierro de la tirosina más larga (Grupo 1) versus histidina (Grupo 2) a 17₁, y el paquete de entierro His111₂ (Grupo 1) contra W21₁. Otros residuos de epítipos son indicados por círculos blancos. N38₁ 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

54

contactos inter-hélices que estabilizan la estructura²⁹ 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 (MLD₅₀) de los H5N1 o H1N1s. (a) Inyección 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 MLD₅₀ de cualquiera de los virus H5-VN04 o H5-HK97.

La figura 8 ilustra SDS-PAGE y análisis de filtración de gel de proteínas HA. (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 colecciones 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 epítipo reconocido por los 10 H5-seleccionados Abs. Todos los H5-seleccionados scFv-Fcs compitieron cruzado. De estos, Ab F10 (phage-scFv) enlazado al trímero H5 fue el menos inhibido por los otros scFv-Fcs sugiriendo que tiene la mayor afinidad entre los Abs probados.

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 sustraída) y las curvas calculadas están superimpuestas de cerca. Cada valor k_a , k_d y K_D representa el promedio y el error estándar de los tres experimentos.

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

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

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

20 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

25 fueron transfectadas transientemente con diferentes plásmidos expresando-HA, y enlace mAb a las células expresando-HA fue analizado por FACS. El anti-SARS mAb 80R fue utilizado como control. 2A-Fc es un anticuerpo H5 HA específico. La

falta de enlace a un Grupo 2 HA, H7, también se muestra. Detalles de cepa viral de H11, H13 y H16 son: H11-MP74 (A/Duck/memphis/546/74 (H11N9)), H13-MD77 (A/Gull/MD/704/77 (H13N6)) y H16-DE06 (A/Shorebird/DE/172/06 (H16N3)).

5

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

La influenza A es un virus de sentido-negativo, RNA de filamento-sencillo, con proteínas de genoma codificado 10 de ocho-segmentos. Pertenece a la familia Orthomyxoviridae que incluye el género de virus de influenza A, B y C como se define por la antigenicidad de las proteínas nucleocapsidas y matriz.

Generalmente, el virus de influenza A es además sub tipificado por dos proteínas de superficie, hemaglutinina (HA) que sujeta el virión a la célula huésped para entrada de células, y neuraminidasa (NA) que facilita el esparcimiento del virus progenie separando el ácido siálico sujeto al virus progenie o a la superficie celular.

Hay 16 subtipos HA y 9 subtipos NA que constituyen todos los subtipos de los virus de influenza A por varias combinaciones de HA y NA. Todas las combinaciones los 16 HA y 9 NA subtipos de virus son encontrados en agua de aves de corral. De los cientos de cepas de los virus de influenza A aviar, solo cuatro se sabe que causan infecciones a humanos: H5N1, H7N3, H7N7 y H9N2. En general, la infección humana con estos virus ha resultado en síntomas ligeros y muy pocas enfermedades severas: solo ha habido un caso fatal de neumonía causada por H7N7. Sin embargo, la excepción es el altamente patogénico virus H5N1, para la cual no hay una inmunidad natural en humanos. La infidelidad de la polimerasa RNA y la presión selectiva de la inmunidad de huésped puede llevar a la acumulación de mutaciones y cambio en la superficie de antigenicidad de estas

proteínas. Este cambio de antigenicidad es llamado deriva de antigenicidad.

Adicionalmente, como resultado de su genoma segmentado, la mezcla de segmentos de gen pueden ocurrir si dos diferentes subtipos de virus de influenza A infectan a la misma célula. Por ejemplo, si un virus humano H3N2 y un virus a
5 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
10 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
15 virus de influenza, y es responsable por la entrada de virus a las células. Es sintetizado como un precursor trímero polipéptido HA0 que es separado post-translacionalmente a dos polipéptidos HA1 y HA2 enlazados por un vínculo disulfídico sencillo. La cadena HA1 de HA es responsable por la sujeción del virus a la superficie celular. HA2 media la fusión de membranas virales y celulares en
20 endosomas, permitiendo la liberación del complejo ribonucleoproteínico al citoplasma. En contraste con HA1, la molécula HA2 representa una parte relativamente conservada de HA. Una segunda proteína inmunogénica de la influenza es neuraminidasa (NA). Esta glicoproteína tetramérica es responsable por la liberación de viriones desde la superficie de ácidos siálico en las células del
25 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 secuenciación del HA de variaciones de desplazamiento antigénico y escape de mutaciones, y los epítomos antigénicos fueron mapeados en la estructura tridimensional de la molécula. Desde entonces, los lugares antigénicos en H1, H2 y H5 de un virus aviar patógeno fueron mapeados en las estructuras tridimensionales de H3. Después del brote de infecciones H5N1 en humanos en Hong Kong en 1997 y el aislamiento del virus H9N2 de los casos humanos en 1999, las estructuras de rayos X de ambas proteínas fueron resueltas. Sin embargo el desplazamiento antigénico del aislado porcino (A/Duck/Singapore/3/97) de 1997 que fue utilizado para resolver la estructura, y más recientemente el aislamiento de cepas altamente patógenas, es significativa. Claramente, hay 28 cambios menores y dos potenciales cambios

mayores entre los aislados porcinos (A/Duck/Singapore/3/97) y la cepa HPAI H5N1 (A/Vietnam1203/04).

Análisis filogenético de los genes H5 HA del brote 2004-2005 han mostrado dos linajes diferentes de genes HA, denominados clados 1 y 2. La cepa HPAI H5N1 (A/Vietnam1203/04) es un miembro del clado 1. Los virus en cada uno de estos clados son distribuidos en regiones geográficas no superpuestas de Asia. Los virus H5N1 de Indochina están justamente reunidos 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, endemidad y evolución³⁶. El análisis filogenético muestra que todos los virus de Indonesia forman un sublinaje H5N1 distintivo de virus con genotipo Z, sugiriendo que este brote fue originado probablemente de una sola introducción por el esparcimiento a través del país durante los últimos dos años. Actividades continuas de virus en Indonesia fueron atribuidas a la transmisión por medio del movimiento de aves de corral dentro del país, en vez de repetidas introducciones por aves migratorias. En Indonesia y Vietnam, virus H5N1 han evolucionado a través del tiempo en grupos geográficamente distintos al interior de cada país.

Recientemente, la estructura de HA de A/Vietnam1203/4 fue resuelta. Comparaciones de su secuencia de aminoácidos con los genes HA de HPAI 2004 y 2005 aislados de los virus del clado 1 y 2 identificaron 13 posiciones de variación

antigénica que están principalmente reunidas alrededor del dominio de enlace del receptor, mientras que el resto están dentro del dominio de esterasa vestigial.

Regiones de variación antigénica han sido identificadas en serotipos H1 y H3 (Figura 1A). Para H1, estos lugares son designados Sa, Sb, Ca y Cb mientras que

5 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 H²; lugar 2: residuos HA1 156 y 157 que corresponden al lugar antigénico B en H3 serotipos; y 3) HA1 129-133, que está restringido al lugar Sa en serotipos H1 HAs y H9. En estudios

10 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

15 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

20 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

25 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 epítipo 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 epítipo, 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 epítipos 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 colección 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 colección 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 Tabla 1B.

Diez anti-HA-0 scFvs únicos fueron identificados por análisis de secuencia de 97 clones positivos HA-0. Estos scFvs fueron designados como 7, 8, 10, 17, 40, 66, 80,88, 90, y 98. Seis diferentes genes VH y 10 genes diferentes VL fueron 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 GCTGGGTGCGACAGGCCCCAGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGGGGGCATCA TTCCTATCTTTGGAAAACCAAACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACG ATTACTGCGGACGAATCCACGAGCACAGCCTACATGGACCTGAGGAGCCTGA GATCTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCGAGAGATTGAGACGCGTATTA CTATGGTTCGGGGGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGCACCCTGGTCACCGT CTCCTCA
Cadena V _L de 2A (SEQ ID NO:3)
CTGCCTGTGCTGACTCAATCATCCTCTGCCTCTGCTTCCCTGGGATCCTCGGT CAAGCTCACCTGCACTCTGAGCAGTGGGCATAGTAACTACATCATCGCATGG CATCAACAGCAGCCAGGGAAGGCCCCCTCGGTACTTGATGAAGGTTAATAGTG ATGGCAGCCACACCAAGGGGGACGGGATCCCTGATCGCTTCTCAGGCTCCA GCTCTGGGGCTGACCGCTACCTCACCATCTCCAACCTCCAGTCTGAGGATGA GGCTAGTTATTTCTGTGAGACCTGGGACACTAAGATTCATGTCTTCGGAAGTG GGACCAAGGTCTCCGTCCTCAG

Tabla 1B. Anticuerpo 2A Región Variable secuencia de aminoácido
Cadena V _H de 2A (SEQ ID NO:2)
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSDNAISWVRQAPGQGLEWMGGIPI FGKPNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMDLRSLRSEDTAVYYCARDSDAYYYGSG GMDVWGQGTLVTVSS
Cadena V _L de 2A (SEQ ID NO:4)
LPVLTQSSSASASLGSSVKLTCTLSSGHSNYIIAWHQQPGKAPRYLMKVNSDGS

75

HTKGDGIPDRFSGSSSGADRYLTIS
NLQSEDEASYFCETWDTKIHVFGTGTKVSVL

Tabla 1C. Anticuerpo D7 Región Variable secuencia de ácido nucléico
Cadena V _H de D7 (SEQ ID NO:5)
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCG GTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTCCTGGAGGTATCTTCAACACCAATGCTTTCAG CTGGGTCCGACAGGCCCTGGACAAGGTCTTGAGTGGGTGGGAGGGGTCAT CCCTTTGTTTCGAACAGCAAGCTACGCACAGAACGTCCAGGGCAGAGTCACC ATTACCGCGGACGAATCCACGAACACAGCCTACATGGAGCTTACCAGCCTGA GATCTGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAAGTAGTGGTTACCATTTT AGGAGTCACTTTGACTCCTGGGGCCTGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
Cadena V _L de D7 (SEQ ID NO:9)
AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTGCGCGTCTCCGGGGAAGACGG 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 CTGGGTCCGACAGGCCCTGGACAAGGTCTTGAGTGGGTGGGAGGGGTCAT CCCTTTGTTTCGAACAGCAAGCTACGCACAGAACGTCCAGGGCAGAGTCACC ATTACCGCGGACGAATCCACGAACACAGCCTACATGGAGCTTACCAGCCTGA GATCTGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAAGTAGTGGTTACCATTTT AGGAGTCACTTTGACTCCTGGGGCCTGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
Cadena V _L de H98 (SEQ ID NO:11)
TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGAAACACGGGCAGAGG GTCACCATCTCTTGTTCTGGAGGCACCTCCAACATCGGACGTAATCATGTTAA CTGGTACCAGCAACTCCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTATAGTAAT GAACAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAATCTGGCA CCTCCGCCTCCCTGGCCGTGAGTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTA TTACTGTGCATCATGGGATGACAACTTGAGTGGTTGGGTGTTCTGGCGGAGGG 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)
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKAPGGIFNTNAFSWVRQAPGQGLEWVGGVIP LFRTASYAQNVTITADESTNTAYMELTSLSADTAVYYCARSSGYHFRSHF DSWGLGTLVTVSS

FA

Cadena V _L de D7 (SEQ ID NO:8)
NFMLTQPHSVSASPGKTVTISCTGSSGNIAANYVQWYQQRPGSAPTTVIYEDDR RPSGVPDRFSGSIDRSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQTYDTNNHAVFGGGTHLT VL
Cadena V _L de H98 (SEQ ID NO:10)
SYELTQPPSASGKHGQRVTISCSGGTSNIGRNHVNWYQQLPGTAPKLLIYSNEQ RPSGVPDRFSGSKSGTSASLAVSGLQSEDEADYYCASWDDNLSGWVFGGGTKL TVL

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

CAACACGGCCTCCCTGACCGTCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGATGAGGCTGA
TTATTTCTGCTGCTCATATGCAGGCCACAGTGCTTATGTCTTCGGAAGTGGGA
CCAAGGTCACCGTCCTG

Tabla 1G. Anticuerpo D80 Región Variable secuencia de ácido nucléico
Cadena V _H de D80 (SEQ ID NO:15)
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCG GTGAAGGTCTCCTGCAGGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCGCTTATGCTTTCA CCTGGGTGCGGCAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGCATCA CCGGAATGTTTGGCACAGCAAACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCAC GATTACCGCGGACGAACTCACGAGCACAGCCTACATGGAGTTGAGCTCCCTG ACATCTGAAGACACGGCCCTTTATTATTGTGCGAGAGGATTGTATTACTATGA GAGTAGTCTTGACTATTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAG
Cadena V _K de D80 (SEQ ID NO:19)
GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAA GAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTCTTAGCAGCAAGTACTTAGC CTGGTATCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCA TCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGG ACAGACTTCACCCTCACCATCAGTAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTA TTCCTGTCAGCAGTATGATGGCGTACCTCGGACGTTCCGGCCAAGGGACCACG 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)
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFSAY AFTWVRQAPGQGLEWMGGIT GMFGTANYAQKFQGRVTITADELTSTAYMELSSLTSEDTALYYCARGLYYYESSL DYWGQGGLVTVSS
Cadena V _L de D8 (SEQ ID NO:14)
QSVLTQPPSASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNSVSWYQQHPGKAPKLMIEVT KRPSGVPDRFSASKSGNTASLTVSGLQAEDEADYFCCSYAGHSAYVFGTGTKVT VL
Cadena V _K de D80 (SEQ ID NO:16)
EIVLTQSPGTL SLSPGERATLSCRASQSLSSKYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSR ATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYSCQQYDGVPRTFGQGTTVEIK

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

GATCTGAGGACACGGCCGTGTATTATTGTGCGAGATCTCCTTCTTACATTTGT TCTGGTGGAACCTGCGTCTTTGACCATTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCG TCTCCTCA
Cadena V _L de F10 (SEQ ID NO:25)
CAGCCTGGGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCCAAGGGCTTGAGACAGACC GCCACACTCACCTGCACTGGGAACAGCAACAATGTTGGCAACCAAGGAGCAG CTTGGCTGCAGCAGCACCAGGGCCACCCTCCCAAACCTCCTATCCTACAGGAA TAATGACCGGCCCTCAGGGATCTCAGAGAGATTCTCTGCATCCAGGTCAGGA AACACAGCCTCCCTGACCATTACTGGACTCCAGCCTGAGGACGAGGCTGACT ATTACTGCTCAACATGGGACAGCAGCCTCAGTGCTGTGGTATTCGGCGGAGG GACCAAGCTGACCGTCCTA

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

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACA
GAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGG
TATCAGCAGAAACCAGGGGAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCA
GTTTGCAAAGAGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGA
CTTCACTCTCACCATTAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACT
GTCAGCAGTATGATAGTTCACCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGGTAGA
GATCAAA

Tabla 1K. Anticuerpo F10 y E90 Región Variable secuencias de aminoácido
Cadena V _H de F10 y E90 (SEQ ID NO:18)
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCTSSSEVTFSSFAISWVRQAPGQGLEWLGGISPM FGTPNYAQKFQGRVTITADQSTRTAYMDLRSLRSEDTAVYYCARSPSYICSGGTC VFDHWGQGTLVTVSS
Cadena V _L de F10 (SEQ ID NO:20)
QPGLTQPPSVSKGLRQTATLTCTGNSNNVGNQGAAWLQQHQGHPPKLLSYRNN DRPSGISERFSASRSGNTASLTITGLQPEDEADYYCSTWDSSLSAVVFGGGTKLT VL
Cadena V _L de E90 (SEQ ID NO:22)
DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQR GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQYDSSPYTFGQGTKVEIK

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

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

Cadena V _L de G17 (SEQ ID NO:26)
SYELTQPPSVSKGLRQTALITCTGDSNNVGHQGTAWLQQHQGHPPKLLSYRNG NRPSGISERFSASRSGNTASLTIIGLQPEDEADYYCSVWDSSLSAWVFGGGTKLT VL

Tabla 1N. Anticuerpo H40 Región Variable secuencia de ácido nucléico
Cadena V _H de H40 (SEQ ID NO:33)
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAGGAAGCCTGGGGCCTCA GTGAAGGTCTCATGTAAGGCTTCTGGATACACCTTCACCGGTTATTATATTCA CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGACTTGAGTGGATGGGTTGGATCAA CCCTATGACTGGTGGCACAACTATGCACAGAAGTTTCAGGTCTGGGTCACC ATGACCCGGGACACGTCCATCAACACAGCCTACATGGAGGTGAGCAGGCTGA CATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGGGGGGCTTCCGTATTACG ATATTTTGACTGGCAGCCCGAGGCTCTTGATATCTGGGGCCTCGGGACCACG GTCACCGTCTCCTCA
Cadena V _L de H40 (SEQ ID NO:35)
CAGCCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGGCCCCAGGACAGACG GCCAGCATTCCCTGTGGGGGGAACAACATTGGAGGCTACAGTGTACACTGGT ACCAACAAAAGCCGGGCCAGGCCCCCTCTTGGTCATTTATGACGATAAAGA CCGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCGCCAACTCTGGGAGCAC GGCCACCCTGACAATCAGCAGGGTCTGAAGCCGGGGATGAGGGCGACTACTA CTGTCAGGTGTGGGATAGTGGTAATGATCGTCCGCTGTTCCGGCGGAGGGAC CAAGCTGACCGTCCTA

Tabla 1O. Anticuerpo H40 Región Variable secuencia de aminoácido
Cadena V _H de H40 (SEQ ID NO:28)
QVQLVQSGAEVRKPGASVKVSKASGYTFTGYYIHWVRQAPGQGLEWMGWINP MTGGTNYAQKFQVWVTMTRDTSINTAYMEVSRLTSDDTAVYYCARGASVLR YFD WQPEALDIWGLGTTVTVSS
Cadena V _L de H40 (SEQ ID NO:30)
QPVLTQPPSVSVAPGQTASIPCGGNNIGGYSVHWYQQKPGQAPLLVIYDDKDRP SGIPERFSGANSSTATLTISRVEAGDEGDYYCQWWD SGNDRPLFGGGTKLTVL

5

Tabla 1P. Anticuerpo A66 Región Variable secuencia de ácido nucléico
Cadena V _H de A66 (SEQ ID NO:37)
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAAGTGAAGAAGCCTGGCTCCTCG GTGAAGGTTTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCCCTTCAGCATGACTGCTTTCA CCTGGCTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGTGGGATCA GCCCTATCTTTCGTACACCGAAGTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCAC GATTACCGCGGACGAATCCACGAACACAGCCAACATGGAGCTGACCAGCCTG AAATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAACCCTTTCCTCCTACCA ACCGAATAATGATGCTTTTGCTATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCT CTTCA
Cadena V _K de A66 (SEQ ID NO:39)

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAA
GAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTG
GTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCC
AACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACA
GACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTCTATTT
CTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCTCAATTCGGCCAAGGGACACGACTGGAG
ATTAAA

Tabla 1Q. Anticuerpo A66 Región Variable secuencia de aminoácido
Cadena V _H de A66 (SEQ ID NO:32)
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGPFSMTAFTWLRQAPGQGLEWMGGIS PIFRTPKYAQKFQGRVTITADESTNTANMELTSLKSEDTAVYYCARTLSSYQPNN DAFAIWGQGTMVTVSS
Cadena V _K de A66 (SEQ ID NO:34)
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA TGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYFCQQYGSSSPQFGQGTRLEIK

Tabla 1R. Anticuerpo E88 Región Variable secuencia de ácido nucléico
Cadena V _H de E88 (SEQ ID NO:40)
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAAGTGAAGAAGCCTGGCTCCTCG GTGAAGGTTTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCCCTTCAGCATGACTGCTTTCA CCTGGCTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGTGGGATCA

GCCCTATCTTTCGTACACCGAAGTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCAC GATTACCGCGGACGAATCCACGAACACAGCCAACATGGAGCTGACCAGCCTG AAATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAACCCTTTCCTCCTACCA ACCGAATAATGATGCTTTTGCTATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCT CTTCA
Cadena V _L de E88 (SEQ ID NO:42)
CTGCCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGG GTCACCATCTCTTGTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTAATACTGTAAA CTGGTACCAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTATAGTAAT AATCAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAGGTCAGGCA CCTCAGCCTCCCTGGCCATCATTGGA CTCCGGCCTGAGGATGAAGCTGATTA T TACTGTCAGTCGTATGACAGCAGGCTCAGTGCTTCTCTCTTCGGA ACTGGGA CCACGGTCACCGTCCTC

Tabla 1S. Anticuerpo E88 Región Variable secuencia de aminoácido
Cadena V _H de E88 (SEQ ID NO:36)
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGPFSMTAFTWLRQAPGQGLEWMGGIS 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
CONSENS US	SYAFS (SEQ ID NO: 43)	GIIPMFGTPNYAQKFQ G (SEQ ID NO: 51)	SSGYYYGGGFDV (SEQ ID NO: 59)
07/H98VH	TNAFS (SEQ ID NO: 44)	GVIPLFRTASYAQNVD G (SEQ ID NO: 52)	SSGYHFGRSHFDS (SEQ ID NO: 60)
08/D80VH	AYAFT (SEQ ID NO: 45)	GIIGMFGTANYAQKFQ G (SEQ ID NO: 53)	GLYYYESSLDY (SEQ ID NO: 61)
F10/90VH	SFAIS (SEQ ID NO: 46)	GISPMFGTPNYAQKF QG (SEQ ID NO: 54)	SPSYICSGGTCVFDH (SEQ ID NO: 62)
G17VH	SYAIS (SEQ ID NO: 47)	GIIGVFGVPKYAQKFQ G (SEQ ID NO: 55)	EPGYVVGKNGFDV (SEQ ID NO: 63)
H40VH	GYIYH (SEQ ID NO: 48)	WINPMTGGTNYAQKF Q (SEQ ID NO: 56)	GASVLRVFDWQPEAL DI (SEQ ID NO: 64)
A66VH	MTAFT (SEQ ID NO: 49)	GISPIFRTPKYAQKFQ G (SEQ ID NO: 57)	TLSSYQPNNDFAFI (SEQ ID NO: 65)
2AVH	DNAIS (SEQ ID NO: 50)	GIIPIFGKPNYAKFQG (SEQ ID NO: 58)	DSDAYYYGSGGMDV (SEQ ID NO: 66)

CONSENS US	TGSSSNIGNYVA (SEQ ID NO: 67)	SNSDRPS (SEQ ID NO: 79)	QSYDSL SAYV (SEQ ID NO: 91)
D7VL	TGSSSNIAANYVQ (SEQ ID NO: 68)	EDDRRPS (SEQ ID NO: 80)	QSYDTNNHAV (SEQ ID NO: 92)
DD8VL	TGTSSDVGGYNS VS (SEQ ID NO: 69)	EVTKRPS (SEQ ID NO: 81)	CSYAGHSAYV (SEQ ID NO: 93)
F10VL	TGNSNNVGNQGA A (SEQ ID NO: 70)	RNNDRPS (SEQ ID NO: 82)	STWDSSLSAVV (SEQ ID NO: 94)
G17VH	TGDSNNVGHQGT A (SEQ ID NO: 71)	RNGNRPS (SEQ ID NO: 83)	SVWDSSL\$AWV (SEQ ID NO: 95)
H40VH	GGNNIGGYSVH (SEQ ID NO: 72)	DDKDRPS (SEQ ID NO: 84)	QVWD SGNDRPL (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)	QQYDGV PRT (SEQ ID NO: 98)
E88VL	TGSSSNIGNYVA (SEQ ID NO: 75)	SNNQRPS (SEQ ID NO: 87)	QSYDSRLSASL (SEQ ID NO: 99)
E90VK	SGSSSNIGSNTVN (SEQ ID NO: 76)	AASSLQR (SEQ ID NO: 88)	QQYDSSPYT (SEQ ID NO: 100)
H98VL	RASQSISSYLN (SEQ ID NO: 77)	SNEQRPS (SEQ ID NO: 89)	ASWDDNLSGWV (SEQ ID NO: 101)
2AVL	TLSSGHSNYIIA (SEQ ID NO: 78)	VNSDGSHTKGD (SEQ ID NO: 90)	ETWDTKIHV (SEQ ID NO: 102)

Aquellos hábiles en el arte reconocerán que scFvs y anticuerpos monoclonales adicionales con diferentes afinidades de enlace también pueden ser terapéuticamente efectivos. Por ejemplo, anticuerpos y scFvs que tienen afinidades de enlace que van desde más o menos 1 pM a más o menos 200 mM pueden también ser efectivos terapéuticamente.

Neutralización de H5N1 con anticuerpos anti-influenza.

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

Caracterización de los 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 epítipo 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 epítipo nAb

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

en el complejo, cada trímero enlaza tres moléculas de F10, en lugares de simetría-relacionada, enterrando $\sim 1500 \text{ Å}^2$ 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
10 región (Fig. 6), haciendo contacto íntimo con el péptido de fusión, elementos de HA1 y HA2 (los cuales son integrales a la estructura de esta región) y asegurar el péptido en su lugar en la confrontación de pH neutra, así como el largo gancho helicoidal de HA2 que sobrelleva un masivo cambio de conformación en el pH ácido de forma que propulsa el péptido de fusión de su bolsillo membrana-
15 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
20 monómero del trímero HA (Fig 6). La región de contacto comprende bolsillo formado por parte del péptido de fusión HA2, con elementos de HA1 en un lado y una cara expuesta de hélice αA de HA2 en la otra (Fig. 6). Una tríada de residuos

M

de anticuerpo – F55 y M54 de CDR H2, y Y102 de CDR H3 – forman puntos de contacto mayores. El anillo de fenilo de F55 se ubica a través de una superficie plana formada por una curva prominente de la curva de péptido de fusión (residuos HA2 DGW 19₂-21₂ (esquema de numeración H3; subíndices 1 y 2 se refieren a cadenas HA1 y HA2)) y las cadenas-laterales aromáticas de dos histidinas de flanqueo (residuos 18₁ y 38₁) y un triptófanom W21₂, que forma la parte posterior del bolsillo. La cadena-lateral de M54 también contacta los anillos aromáticos de W21₂ y H38₁, así como la cadena-lateral de I45₂ de la hélice α A, mientras su cadena-principal enlaces-carbonilo oxígeno hidrógeno con la cadena-lateral de H38₁. Y102 inserta su cadena-lateral en una grieta hidrofóbica creada por cuatro cadenas-laterales de la hélice α A, y también enlaces-hidrogeno a una columna carbonilo (D19₂) del péptido de fusión. La curva CDR H1 hace múltiples contactos con el extremo terminal-C DE la hélice α A y una curva de HA1 en la base de la región de cabeza (Figuras 6B y 6C).

En paralelo, experimentos de mutagénesis fueron llevados a cabo en la hélice α A para ayudar a definir el epítipo (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. 4D). Por lo tanto la mutagénesis del la hélice α A es completamente consistente con el epítipo definido cristalográficamente en F10. Además, los otros dos nAbs, para los cuales no existen datos estructurales, mostraron un perfil de enlace casi idéntico a nAb-mutado, indicativo de un epítipo con sobre posición cercana y consistente con enlace competitivo (Fig. 6, Fig. 9). Tomados juntos, concluimos que todos los tres 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.

5

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

En general, moléculas de anticuerpos obtenidas de humanos se relacionan a cualquiera de las clases IgG, IgM, IgA, IgE e IgD, que se diferencian entre sí por la naturaleza de la cadena pesada presente en la molécula. Algunas clases también tienen subclases, como IgG₁, IgG₂, y otras. Además, en humanos, la cadena liviana puede ser una cadena kappa o una cadena lambda.

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

una de las cadenas pesada y liviana se refiere como "regiones complementarias-determinantes", o "CDRs".

Como se usa aquí, el término "epítipo" incluye cualquier proteína determinante capaz de enlazarse específicamente a una inmunoglobulina, a un scFv, o a un receptor de célula T. Epitopos 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 ratio 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 epítipo de influenza cuando el equilibrio de la constante de enlace (K_d) es $\leq \mu\text{M}$, preferiblemente $\leq 100 \text{ nM}$, más preferiblemente $\leq 10 \text{ nM}$, y más preferiblemente $\leq 100 \text{ pM}$, como es medido por ensayos como los ensayos de enlace radioligand o ensayos similares conocidos a aquellos con habilidad en el arte.

Una proteína de influenza (p.e. HA o neuraminidasa) de la invención, o un derivado, fragmento, análogo, homólogo u ortólogo del mismo puede ser utilizado como gen inmunológico en la generación de anticuerpos que se enlazan inmunológica-específicamente estos componentes de proteínas.

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

Otra forma de terminar si un anticuerpo monoclonal humano tiene la especificidad de un anticuerpo monoclonal humano de la invención es la pre incubación del anticuerpo monoclonal humano de la invención con la proteína de influenza HA, que es normalmente reactiva, y luego añadir el anticuerpo monoclonal humano que se está probando para determinar si el anticuerpo monoclonal humano probado es inhibido en su habilidad de enlazarse con la proteína HA. Si el anticuerpo monoclonal humano que está siendo probado es inhibido entonces, con toda probabilidad, éste tiene la misma, o funcionalmente

equivalente, especificidad de epítipo como el anticuerpo monoclonal de la invención. La examinación de anticuerpos monoclonales humanos de la invención, también puede ser llevada a cabo utilizando el virus de influenza y determinando si el anticuerpo monoclonal de prueba es capaz de neutralizar el virus de influenza.

5 Varios procedimientos conocidos dentro del arte pueden ser utilizados para la producción de anticuerpos policlonales o monoclonales dirigidos contra una proteína de la invención, o contra derivados, fragmentos, análogos, homólogos u ortólogos del mismo. (Véase, *por ejemplo*, Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow E, and Lane D, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, incorporado aquí por referencia).

10 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
15 buscada, o un epítipo de la misma, puede ser inmovilizada en una columna para purificar el anticuerpo inmune específico por la cromatografía de inmuno-afinidad. La purificación de inmunoglobulinas se discute, por ejemplo, por D. Wilkinson ((The Scientist, publicado por The Scientist, Inc., Philadelphia PA, Vol. 14, No. 8 (April 17, 2000), pp. 25-28).

20 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
25 complementariedad (CDRs) del anticuerpo monoclonal son idénticas en todas las moléculas de la población. Las MAbs contienen un lugar de enlace de antígeno

97

capaz de inmuno-reaccionar con un epítipo 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).

5 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*.

10 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

15 fusionados con una línea de células inmortalizadas utilizando un agente de fusión adecuado, como el glicol polietileno, para formar una célula hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103). Las líneas de células inmortalizadas son normalmente células mamíferas transformadas, particularmente células de mieloma de origen roedor, bovino o

20 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

25 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
5 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 hidroxapatita, gel electroforesis, diálisis, o
10 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
15 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
20 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
25 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.

5 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
10 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
15 (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
20 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
25 completamente inactivados. Una vez tratados, la producción de anticuerpos humanos se observa, lo cual se parece mucho a lo visto en humanos en todos los aspectos, incluyendo la reorganización de genes, ensamblaje, y repertorio de

anticuerpos. Esta aproximación se describe, por ejemplo, en U.S. Patent Nos. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016, y en Marks et al., Bio/Technology 10, 779-783 (1992); Lonberg et al., Nature 368 856-859 (1994); Morrison, Nature 368, 812-13 (1994); Fishwild et al, Nature Biotechnology 14, 845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14, 826 (1996); y Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13 65-93 (1995).

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

recobrados y expresados para obtener los anticuerpos directamente, o pueden ser todavía más modificados para obtener análogos de los anticuerpos como, por ejemplo, moléculas de cadena simple Fv (scFv).

Un ejemplo de un método para producir un huésped no humano, ejemplificado un ratón, que no tenga la expresión de una cadena pesada de inmunoglobulina endógena es revelado en U.S. Patent No. 5,939,598. Puede ser tenido por un método, que incluye la eliminación de genes de segmento J de por lo -1 lugar de cadena pesada endógena en una célula madre de embrión para prevenir la reorganización del lugar y para prevenir la formación de una transcripción de un lugar de cadena pesada de inmunoglobulina reorganizada, la eliminación se efectúa focalizando un vector que contenga un gen codificando un marcador seleccionable; y produciendo desde la célula madre de embrión un ratón transgénico cuyas células somáticas y de germen contienen el gen codificando un marcador seleccionado.

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 epítipo clínicamente relevante en un inmuno gen, y un método correlativo para seleccionar un anticuerpo que se enlace inmuno específicamente al epítipo 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 cromosomáticos, no cromosomáticos o sintéticos.

Los vectores preferidos incluyen vectores virales, proteínas de fusión y conjugados químicos. Vectores retrovirales incluyen virus es de leucemia moloney murino. Los vectores virales de DNA son preferidos. Estos vectores incluyen vectores pox como los vectores ortopox o avipox, vectores de herpesvirus como el 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 disulfidos de un fragmento $F_{(ab')_2}$; (iii) un fragmento F_{ab} generado por el tratamiento de la molécula anticuerpo con papaina y un agente reductor y (iv) fragmentos F_v .

Anticuerpos hetero conjugados también están dentro del alcance de la presente invención. Los anticuerpos hetero conjugados están compuestos por dos anticuerpos covalentemente unidos. Tales anticuerpos han, por ejemplo, sido propuestos para dirigirse a las células del sistema inmune hacia células no 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-mercaptopbutyrimidate 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 F_c , por lo tanto permitiendo la formación de uniones

106

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

Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden ser utilizadas incluyen cadena de difteria A, fragmentos de no enlazantes activos de toxina de difteria, cadena exotoxina A (de Pseudomonas aeruginosa), cadena de ricino A, cadena de abrin A, cadena modécina A, alpha-sarcina, proteínas Aleurites fordii, proteínas diantinas, proteínas Phytolaca americana (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor 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), derivados bifuncionales de imidoesters (como dimethyl adipimidate HCL), esters activos

(como disuccinimidyl suberate), aldehydes (como glutarelddehyde), compuestos bis-azido (como bis (p-azidobenzoyl) hexanediamine), derivados de bis-diazonium (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).

10 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
15 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
20 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,
25 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

5 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

10 particularmente preferidos incluyen: (i) EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl) carbodiimide hydrochloride; (ii) SMPT (4-succinimidylloxycarbonyl-alpha-methyl-alpha-(2-pyridyl-dithio)-toluene (Pierce Chem. Co., Cat. (21558G); (iii) SPDP (succinimidyl-6-[3-(2-pyridyldithio) propionamido]hexanoate (Pierce Chem. Co., Cat #21651G); (iv) Sulfo-LC-SPDP (sulfosuccinimidyl-6-[3-(2-pyridyldithio)-

15 propionamide] hexanoate (Pierce Chem. Co. Cat. #2165-G); y (v) sulfo-NHS (N-hydroxysulfo-succinimide: Pierce Chem. Co., Cat. #24510) conjugado a EDC.

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

20 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

25 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

10

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 ^3H .

M

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 antivirio 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 antivirio 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

112

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.

5 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

10 matrices son en forma de artículos moldeados, *p.e.*, películas, o micro cápsulas. Ejemplos de matrices de dispensa sostenida incluyen poliesters, hidrogels (por ejemplo, poly(2-hydroxyethyl-methacrylate), o poly(vinylalcohol)), polylactides (U.S. Pat. No. 3,773,919), copolímeros de ácido L-glutamic y γ ethyl-L-glutamate, acetato vinil-etileno no degradable, copolímeros de ácido ácido-glicólico láctico

15 degradable como el LUPRON DEPOTTM (micro esferas inyectables impuestas de copolímero de ácido ácido-glicólico láctico y acetato leuprolide), y ácido poly-D-(-)-3-hydroxybutyric. Mientras que polímeros como el acetato vinil-etileno y el ácido ácido-glicólico láctico permiten la liberación de moléculas por más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas por períodos de tiempo más cortos.

20 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

25 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

114

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

5 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

10 fracción o componente de sangre incluyendo suero de sangre, plasma de sangre, o linfas. Esto es, que el método de detección de la invención puede ser utilizado para detectar un analyte mRNA, proteína o DNA genómica en una muestra biológica *in vitro* así como *in vivo*. Por ejemplo, técnicas *in vitro* para la detección de analyte mRNA incluyen hibridaciones nórdicas e hibridaciones *in situ*. Técnicas

15 *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

20 Practice: Methods in Molecular Biology", Vol. 42, J. R. Crowther (Ed.) Human Press, Totowa, NJ, 1995; "Immunoassay", E. Diamandis and T. Christopoulos, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1996; y "Practice and Theory of Enzyme Immunoassays", P. Tijssen, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1985. Aún más, Técnicas *in vivo* para la detección de una proteína analyte incluye la

25 introducción en un sujeto de un anticuerpo de proteína etiquetada anti-analyte. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser etiquetado con un marcador radiactivo cuya

115

presencia y ubicación en un sujeto puede ser detectada con técnicas de obtención de imágenes estándar.

5 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.*, tópicas), transmucosas, y rectales. Las soluciones o suspensiones utilizadas para aplicaciones parental, intradérmicas, o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, glicoles polietilenos, glicerina, glicoles propilenos u otros solventes sintéticos; agentes antibacteriales como alcohol bencílico o methyl parabens; antioxidantes como ácido ascórbico o bisulfato de sodio; agentes quelantes como el ácido ethylenediaminetetraacético (EDTA); tampones como acetatos, citratos o fosfatos, y agentes para el ajuste de tonicidad como cloruro de sodio o dextrosa. El pH puede ser ajustado con ácidos o bases, así como el ácido hidrocórico o el hidróxido de sodio. La preparación parenteral puede ser contenida en ampollas, jeringas desechables o ampollas de dosis múltiples hechas de vidrio o plástico.

Composiciones farmacéuticas apropiadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (donde el agua soluble) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones estériles inyectables o dispersión. Para administración intravenosa, portadores apropiados incluyen solución salina fisiológica, agua bacterio-estática, Cremophor ELTM (BASF, 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 líquido glicol polietileno, y parecidos), y mezclas apropiadas de los mismos. La fluidez

apropiada puede ser mantenida, por ejemplo, utilizando una cubierta como lecitina, manteniendo el tamaño de partículas requeridos en el caso de dispersión y por el uso de surfactantes. La prevención de acción de microorganismos se 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 fluidos 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

118

cual el compuesto en el portador líquido es aplicado oralmente y se hace un buche y es expectorado o tragado. Agentes de enlace farmacéutica mente compatibles, y/o materiales adyuvantes pueden ser incluidos como parte de la composición. Las tabletas, píldoras, cápsulas, trociscos, y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante como celulosa micro cristalina, goma tragacanto o gelatina; un excipiente como almidón o lactosa, un agente desintegrante como el ácido alginico, Primogel, o almidón de maíz; un lubricante como stearato de magnesio o Sterotes; un deslizante como un dióxido de silicio coloidal; un agente endulzante como sacarosa o sacarina; o un agente saborizante como la menta, salicilato de metilo, o saborizante de naranja.

Para administración por inhalación, los compuestos son entregados en la forma de spray aerosol de un contenedor presurizado o dispensador que contiene 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.

19

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

5 La invención provee métodos (también referidos aquí como “ensayos de detección”) para identificar moduladores, *p.e.*, candidatos compuestos de prueba o agentes (*p.e.*, péptidos, peptidomiméticos, moléculas pequeñas u otras drogas) que modulen o de otra forma interfieran con la fusión de un virus de influenza a la membrana celular. También se proveen métodos de identificación de compuestos
10 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
15 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
20 sintéticos utilizando selecciones de cromatografía de afinidad. En enfoque de colección biológica está limitado a colecciones de péptidos, mientras que los otros cuatro enfoques son aplicables a péptidos, oligómeros no péptidos o colecciones de compuestos de moléculas pequeñas. (Véase, *p.e.*, Lam, 1997. Anticancer Drug Design 12: 145).

25 Una “molécula pequeña” como se utiliza aquí, se refiere a una composición que tiene un peso molecular de menos de más o menos 5 kD y más preferiblemente menos de 4 kD. Las moléculas pequeñas pueden ser, *p.e.*, ácidos

nucleicos, péptidos, polipéptidos, peptidomiméticos, carbohidratos, lípidos u otras moléculas orgánicas o inorgánicas. Colecciones de mezclas químicas y/o biológicas, así como extractos de hongos, bacterias, o algas, son conocidos en el arte y pueden ser detectados con cualquiera de los ensayos de la invención.

5 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., 10 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), 15 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. 20 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 25 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.

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

En una materialización, el ensayo comprende contactar un complejo anticuerpo-antígeno con un compuesto prueba, y determinar la habilidad del compuesto prueba de interactuar con el antígeno o de otra forma perturbar el complejo anticuerpo-antígeno existente. En esta materialización, determinar la habilidad del compuesto prueba para interactuar con el antígeno y/o perturbar el complejo anticuerpo-antígeno comprende determinar la habilidad del compuesto

prueba para enlazarse preferiblemente al antígeno o a la porción biológicamente activa del mismo, comparado con el anticuerpo.

En otra materialización, el ensayo comprende contactar un complejo anticuerpo-antígeno con un compuesto prueba y determinar la habilidad

- 5 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
- 10 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
- 15 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
- 20 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
- 25 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

120

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

5 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

10 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

15 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

20 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

25 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

2

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

5 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

10 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

15 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

20 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

25 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 influenza 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.

5

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
10 antigénicos a los sistemas inmunológicos. (Véase Zanetti, Nature 355:476-77 (1992); Zaghouani et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:631-35 (1995)). Cuando un péptido es incluido como una parte integral de una molécula IgG (p.e., el anticuerpo monoclonal 11A o 256 IgG1 descrito aquí), la antigenicidad e inmunogenicidad de los epítomos péptido es altamente mejorada comparado con
15 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
20 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
25 inmunes humorales y celulares. (Véase Bona et al., Immunol. Today 19:126-33 (1998)).

BO

Las quimeras epítomos específicos implantadas en la curva CDR3 han sido utilizadas para inducir respuestas humorales ya sea a HIV-1 gp120 V3-loop o al primer dominio extracelular (D1) de receptor humano CD4. (Véase Lanza et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:11683-87 (1993); Zaghouani et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:631-35 (1995)). El suero inmune fue capaz de prevenir infección de células CD4 SupT1I por HIV-1MN (anti-gp120 V3C) o inhibir la formación de sincitias (anti-CD4-D1). Las CDR2 y CDR3 pueden ser reemplazadas con péptidos epítomos simultáneamente, y la longitud del péptido insertado puede ser hasta de 19 aminoácidos de longitud.

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

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

Vacuna de DNA

Las vacunas de DNA son estables, pueden proveer al antígeno una oportunidad para ser naturalmente procesado, y pueden incluir una respuesta de larga duración. Aunque es una estrategia de inmunización muy atractiva, las

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

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

Aplicando el mismo principio, las quimeras antígeno-Ig que codifican DNA que cargan una región funcional anti-MHC II específica scFv de gen también puede dirigirse a los inmuno genes de todos los tres tipos de APCs- las respuestas 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
5 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
10 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
15 chemokines, incluyendo, pero no limitado a, IL-2, IL-2 modificado (Cys125 →
Ser125), GM-CSF, IL-12, γ -interferon, IP-10, MIP1 β , y RANTES.

Métodos de Inmunización

20 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
25 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 oxígeno de cadenas laterales de serina y treonina.

La fracción de carbohidrato es endógena al sujeto que se va a vacunar.

Alternativamente la fracción de carbohidrato es exógena al sujeto que se va a vacunar. La fracción de carbohidrato son fracciones de carbohidrato que no son típicamente expresadas en polipéptidos del sujeto que se va a vacunar. Por ejemplo, las fracciones de carbohidrato son carbohidratos específicos de plantas. Fracciones de carbohidrato específicas de plantas incluyen por ejemplo glicanos ligados N que tienen un enlace de núcleo α 1,3 fucose o un enlace de núcleo β 1,2 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 trímica. 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

B24

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

5 metodologías estándar. Un sujeto que requiere inmunización es identificado por métodos conocidos en el arte. Por ejemplo, sujetos son inmunizados como se determina en el CDC's General Recommendation on Immunization (51(RR02) ppl-36). El cáncer es diagnosticado por ejemplo por un examen físico, biopsia, examen de sangre o rayos X. El sujeto es *p.e.*, cualquier mamífero *p.e.*, un
10 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
15 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

20 Vacunación

Una vacuna candidata que se dirige a la inmunidad humoral debe llenar por lo menos tres criterios para ser exitosa: debe provocar una respuesta de anticuerpos fuerte ("inmunogenicidad"); una fracción significativa de los
25 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

BS

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.

5

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.

20

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

25

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

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

La salud inmunogénica alcanzada por APFs es evaluada por la inmuno absorción de suero anti-APF con puntas purificadas o proteína de membrana, en un procedimiento análogo al descrito en Matthews et al., J. Immunol. 169:837 (2002). IgG es purificado del suero recogido de ratones que han sido inmunizados. Proteínas purificadas, biotinylated (como se ha apropiado, dependiendo del APF particular con el cual los ratones fueron inmunizados) son mezcladas con el IgG de ratón e incubado. Esferas sepharose cubiertas con streptavidina son entonces añadidas en cantidades suficientes para capturar todos las proteínas biotiniladas, junto con cualquier IgG enlazado. Las esferas cubiertas con streptavidina son removidas por centrifuga a 13,000 rpm en una micro centrifuga, dejando los IgG que han sido despojados de anticuerpos dirigidos contra la proteína, respectivamente. Inmuno absorciones falsas son llevadas a cabo en paralelo de la misma forma, excepto que los BSA biotinilados serán sustituidos por proteínas de 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-

137

para las potencialmente glicosiladas 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

B8

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, 5 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.

10

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 15 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 20 enfermedad o desorden.

Métodos combinados

25 La invención provee tratamiento de una enfermedad o desorden relacionada con influenza, como la gripe aviar, en pacientes administrando dos o

B9

más anticuerpos, como D7, D8, F10, G17, H40, A66, D80, E88, E90 y H98 que se enlazan al mismo epítipo de la proteína HA.

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

5

EJEMPLOS

Ejemplo 1: métodos generales

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

10

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.

15

20

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 anteriormente³³. Esta construcción contiene un terminal C trimerizante de secuencia 'foldon' del bacteriófago T4 fibrin 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. 9×10^6 células fueron infectadas con

25

4D

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-

10

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

Dos colecciones de scFv humanas no inmunes (un total de 2.7×10^{10} miembros) construidas de células B de 57 donantes no inmunizados fueron utilizados para seleccionar scFv contra el HA1 purificado o HA0 trimérico. 5×10^{11} pfu de fago-scFvs preparados de cada colección fueron incubados con inmuno tubos (Nunc, Naperville, IL) cubiertos con 10 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.

25

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

Fago-scFvs de clones individuales fueron producidos por ensayo de
5 neutralización utilizando el mismo método que para hacer la colección fago.
Partículas fago fueron concentradas 25 veces utilizando precipitación PEG/NaCl.
scFv-Fcs e IgG1s humanos completos fueron producidos como se describió
anteriormente. En resumen, los scFvs seleccionados fueron convertidos a scFv-Fcs
subclonando los scFv en vector de expresión Fc pcDNA 3.1-Hinge que contiene la
10 bisagra, CH2 y dominios CH3 de IgG1 humano pero le falta CH1. Para IgG1
humanos completos, los fragmentos de gen VH y VL de scFv fueron subclonados
separadamente en IgG1 humanos cadena liviana kappa o cadena liviana lambda
vectores de expresión TCAE5 o TCAE6. scFv-Fcs o IgG1s fueron expresados en
células 293T o 293F (Invitrogen) por transfección transiente y purificados por
15 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
20 (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
25 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

142

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

Virus y Células

Los virus de influenza de tipo salvaje A/Vietnam/1203/2004 (H5N1; H5-VN04), A/HongKong/483/1997 (H5N1; H5-HK97), A/Netherlands/219/2003 (H7N7; H7-NL03), y A/Ohio/4/1983 (H1N1; H1-0H83) así como cepas de vacuna adaptadas a frío de A/Ann Arbor/6/1960 (H2N2) fueron obtenidas de la red WHO Global Influenza Surveillance Network y provistas por Alexander Klimov (CDC, Atlanta, USA). H1-PR34 y células Madin-Darby canine kidney (MDCK) fueron obtenidas de la American Type Culture Collection y propagadas en Dulbecco's Modification del Eagle's Medium con 10% de suero fetal bovino. La infectividad viral fue determinada por ensayos de placa en células MDCK. Virus vivo de tipo salvaje H5N1 fueron manejados en contención de bioseguridad nivel 3, incluyendo

mejoras requeridas por el Departamento de Agricultura de los EEUU y el programa de Agentes Seleccionados

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

5 *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-
10 SP33, y gen de neuraminidasa de A/Vietnam 1203/2004, N1, fueron codón-
optimizadas y clonadas en vector pcDNA3.1 para obtener la expresión plásmida
pcDNA3.1-H5-SP33 y pcDNA3.1-N1, separadamente. La plásmida codificada
pCAGGS-H1(SC) A/South Carolina/1/1918 (H1N1) proteína HA de largo completo
HA protein fue amablemente proveida por forma de Dr. P.Palese (Mount Sinai
15 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

20

La ronda simple de reporte de virus HIV luciferase de H5N1 o H1N1
pseudotipo por H5-SP33, H1-SC/1918 o H1-PR/34 fueron hechos por co-
transfección de células 293T con 4 plásmidos que son pcDNA3.1-H5-SP33, vector
de empaque HIV pCMVΔR 8.2 codificando HIV-1 Gag-Pol⁵⁷, vector de
25 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 trypsin 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 trypsin-tratado por 30 mins a RT. La mezcla fue entonces adicionada a células 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 luminómetro de micro plato.

Mapeo de epítipo de anticuerpo 8, 10 y 66

15 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 anteriormente⁴⁸. En corto, 100 TCID₅₀ (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.

146

Ensayo de inhibición de hemaglutinización (HI)

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

Ensayo de inhibición de enlace viral

25 0.5×10^6 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.

147

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 lipofectamine 2000 (Invitrogen). El medio de cultivo fue suplantado con 1 ml de anti-H5, control o falsos mAbs a 6 horas post-transfección, y células cultivadas por 36 horas. Las células fueron observadas por formación de sincitias con un microscopio de fase contrastante. Micro fotografías fueron tomadas a una magnificación de 10x.

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).

15 *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 anteriormente⁶. 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 His₆. El cDNA de la proteína de fusión fue clonada en el

NA

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 eluidas con TBS con 250 mM Imidazole. Las proteínas H5 eluidas 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

50

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

Recolección de datos, determinación de estructura, y refinamiento

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

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

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

Protección de ratones con hMabs contra H5

Todos los estudios de ratones fueron realizados en facilidades animales acreditadas por USDA y CDC como nivel de bioseguridad 3 (BSL3) conforme con

151

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.

5

Estudio profiláctico en ratón

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

10

Estudio terapéutico en ratón

15

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

20

Identificación de anticuerpos anti-H5 fago

Anticuerpos contra HA1

25

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

152

específicamente positivos. Tres anti-HA1 únicos scFvs fueron identificados (38B y 1C) por análisis de secuencia de los 58 clones HA1 positivos. Experimentos de selección y detección similares fueron repetidas; no se identificaron nuevos clones pero se obtuvieron los mismos tres scFvs descritos arriba. Secuencia de aminoácidos 2A se muestra en la tabla 1B.

Anticuerpos contra el ectodominio de H5 (HA0)

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

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

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

153

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

5 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.

10 **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.

15 scFvFc 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 epítipo) descrito abajo.)

20 Utilizando el trómero 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

25 neutralización inmediatamente después de ser detectados por ELISA para clones positivos en 96 platos de pozo. En este esquema, la actividad de neutralización

154

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

Los resultados de ensayos de micro neutralización. Como se muestra en las figuras 4A-4C y 9B, los 10 anticuerpos anti-H5 exhibieron diferentes niveles de neutralización. F10-Fc, A66-Fc, E88-Fc y E90-Fc parecen ser los inhibidores más potentes, los cuales neutralizaron más de 95% de 10,000pfu virus a 10ug/ml y más de 50% a 1ug/ml. También hemos visto reducción de placa completa cuando 100pfu fue utilizado para estos cuatro anticuerpos a 10ug/ml o 1ug/ml (datos no 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, sugiriendo que el (los) epítipo (s) neutralizantes se conservan a través de diferentes clades H5. Sin embargo, ninguno de los Abs neutralizó un

155

virus Grupo 2, cepa HPAI H7N7, A/Netherlands/219/03 (H7N7) (H7-NL03) (Figura 4A).

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

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

Mabs fueron capturados en un chip CM4 via IgG1 anti humano, y trimerico HA0 a varias concentraciones (20, 10, 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 k_a , k_d , 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, k_a , k_d y KD similares de D8 y F10 fueron observados, y A66 tuvo un doble 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 ($8.8 \pm 1.1 \times 10^{-5}$

56

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

(Figuras 10A y 10B).

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

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

Eficacia profiláctica

10 (Figura 7 a, b, g y h). Los ratones fueron tratados con anti-H5 nAbs o control mAb 24 horas antes del reto letal intranasalmente (i.n.) con 10 dosis letales medias (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
15 anticuerpo (2.5 mg/kg) fue también altamente protectora. (Figura 7a) protección profiláctica contra virus H5-HK97 (A/HongKong/483/97 (H5N1), Clade O) fue observada en 80-100% de los ratones tratados con 10 mg/kg de cualquiera de los tres nAbs. (Figura 7b) cualquiera de los tres nAbs (a 10 mg/kg de una inyección) proveyeron protección completa de los ratones retados con los virus H1-WSN33
20 (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

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

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

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

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

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

58

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

15 **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 epítomo en HA esto no solamente es altamente conservado entre clades H5, pero también presente en subtipos H1, H2 y H6, y

189

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

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

5 Dos formas en las cuales anti-HA Abs pueden mediar neutralización son enlaces de bloqueo HA a su receptor celular, e inhibición de fusión de membrana de virus huésped interfiriendo con cambios de conformación de pH bajo inducido de HA. Encontramos que los tres nAbs no afectaron el enlace del virus a las células ni inhibieron hemaglutinación (el enlace y unión cruzada de células rojas de la sangre), mientras que anti-H5 nAb de ratón, 17A2.1.2, y suero anti-H5N1 de hurón, ambos de los cuales inhibieron hemaglutinación, enlace reducido a niveles de fondo.

Después probamos la habilidad de los nAbs para inhibir la fusión de membrana celular huésped utilizando un sistema de modelo en el cual células 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 sincitia fue observado en todos los 3 casos. En la ausencia de nAbs, las células expuestas brevemente (3-4 minutos) a un medio ácido (pH 5) 30 horas post-trasfección formaron extensiva sincitia. Los nAbs (5 µg/ml) también bloquearon completamente la formación de sincitia bajo estas condiciones (datos no mostrados). Juntos, estos resultados indican que los tres nAbs inhibieron la fusión de membrana sin interferir con el enlace receptor.

Ejemplo 9: caracterización estructural del epítipo nAb

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

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

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

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

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

Ejemplo 10: base estructural de neutralización de espectro amplio

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

Estructuras de cristal han sido determinadas para los subtipos H1, H5, y H9 del Grupo 1 y H3 y H7 del Grupo 2, y las estructuras entran en dos clases distintas, coincidentes con los dos grupos definidos por el análisis filogenético. Más comparaciones muestran que las dos clases también son fácilmente distinguibles en el detalle a nivel tridimensional dentro de la región definida por el epítipo F10. Diferentes secuencias en unos pocos aminoácidos clave enterrados en el núcleo que son característica de cada clase (p.e. a 17₁ y 111₂) llevan a diferencias consistentes en la orientación de varias cadenas laterales dentro del epítipo, así como la disposición del bolsillo con respecto a la hélice α A.

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

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

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

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

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

164

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

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

165

REFERENCIAS

1. W.H.O. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/2003/fs211/en/>. World Health Organization factsheet 211: influenza (2003).
- 5 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).
- 10 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 15 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).
- 20 9. W.H.O. (http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/summaryH5_20070403.pdf, 2007).
- 25 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).

167

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

21. W.H.O.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

168

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).

169

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

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

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

	FRH1	CDRH1				CDRH2			CDRH3				
10	S23	V27	T28	S30	S31	M54	F55	T07	P100	S101	Y102	I103	S105
A1	S25	S291 M292		Q40		H38	H18 H38						
A2		I56	V52 N53		I45 T49	W21 I45	V18 D19 Q42 W21	V18	Q42	Q42	D19 K38 T41 Q42 I45	D19 K38	K38

- 5 Residuos de contacto definidos por tener una distancia inter atómica de < 4.5 . El esquema de color indica contribuciones de residuos individuales a la energía de enlace libre: muy favorable (rojo (V27, T28, I45, D19, W21)), favorable (naranja (S25, S291, M292, I56, V52, N53, T49, H18, V18, G20, T57, T41)), insignificante (azul (S30, S31, Q40, H38)), no favorable (negro), muy no favorable (negro ennegrecido). Basado en cálculos de energía utilizando el servidor en
- 0 <http://structure.pitt.edu/servers/fastcontact1>.

Tabla 4. Recolección de datos y refinamiento de estadísticas

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

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

172

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

Grupo	CHAMF	Subtipo	# de secuencias comparadas	# de secuencias diferentes	HA1	HA2	HA3	HA4	HA5	HA6	HA7	HA8	HA9	HA10	HA11	HA12	HA13	HA14	HA15	HA16	HA17	HA18	HA19	HA20	HA21	HA22	HA23	HA24	HA25	HA26	HA27	HA28	HA29	HA30	HA31	HA32	HA33	HA34	HA35	HA36	HA37	HA38	HA39	HA40	HA41	HA42	HA43	HA44	HA45	HA46	HA47	HA48	HA49	HA50	HA51	HA52	HA53	HA54	HA55	HA56	HA57	HA58	HA59	HA60	HA61	HA62	HA63	HA64	HA65	HA66	HA67	HA68	HA69	HA70	HA71	HA72	HA73	HA74	HA75	HA76	HA77	HA78	HA79	HA80	HA81	HA82	HA83	HA84	HA85	HA86	HA87	HA88	HA89	HA90	HA91	HA92	HA93	HA94	HA95	HA96	HA97	HA98	HA99	HA100	HA101	HA102	HA103	HA104	HA105	HA106	HA107	HA108	HA109	HA110	HA111	HA112	HA113	HA114	HA115	HA116	HA117	HA118	HA119	HA120	HA121	HA122	HA123	HA124	HA125	HA126	HA127	HA128	HA129	HA130	HA131	HA132	HA133	HA134	HA135	HA136	HA137	HA138	HA139	HA140	HA141	HA142	HA143	HA144	HA145	HA146	HA147	HA148	HA149	HA150	HA151	HA152	HA153	HA154	HA155	HA156	HA157	HA158	HA159	HA160	HA161	HA162	HA163	HA164	HA165	HA166	HA167	HA168	HA169	HA170	HA171	HA172	HA173	HA174	HA175	HA176	HA177	HA178	HA179	HA180	HA181	HA182	HA183	HA184	HA185	HA186	HA187	HA188	HA189	HA190	HA191	HA192	HA193	HA194	HA195	HA196	HA197	HA198	HA199	HA200	HA201	HA202	HA203	HA204	HA205	HA206	HA207	HA208	HA209	HA210	HA211	HA212	HA213	HA214	HA215	HA216	HA217	HA218	HA219	HA220	HA221	HA222	HA223	HA224	HA225	HA226	HA227	HA228	HA229	HA230	HA231	HA232	HA233	HA234	HA235	HA236	HA237	HA238	HA239	HA240	HA241	HA242	HA243	HA244	HA245	HA246	HA247	HA248	HA249	HA250	HA251	HA252	HA253	HA254	HA255	HA256	HA257	HA258	HA259	HA260	HA261	HA262	HA263	HA264	HA265	HA266	HA267	HA268	HA269	HA270	HA271	HA272	HA273	HA274	HA275	HA276	HA277	HA278	HA279	HA280	HA281	HA282	HA283	HA284	HA285	HA286	HA287	HA288	HA289	HA290	HA291	HA292	HA293	HA294	HA295	HA296	HA297	HA298	HA299	HA300	HA301	HA302	HA303	HA304	HA305	HA306	HA307	HA308	HA309	HA310	HA311	HA312	HA313	HA314	HA315	HA316	HA317	HA318	HA319	HA320	HA321	HA322	HA323	HA324	HA325	HA326	HA327	HA328	HA329	HA330	HA331	HA332	HA333	HA334	HA335	HA336	HA337	HA338	HA339	HA340	HA341	HA342	HA343	HA344	HA345	HA346	HA347	HA348	HA349	HA350	HA351	HA352	HA353	HA354	HA355	HA356	HA357	HA358	HA359	HA360	HA361	HA362	HA363	HA364	HA365	HA366	HA367	HA368	HA369	HA370	HA371	HA372	HA373	HA374	HA375	HA376	HA377	HA378	HA379	HA380	HA381	HA382	HA383	HA384	HA385	HA386	HA387	HA388	HA389	HA390	HA391	HA392	HA393	HA394	HA395	HA396	HA397	HA398	HA399	HA400	HA401	HA402	HA403	HA404	HA405	HA406	HA407	HA408	HA409	HA410	HA411	HA412	HA413	HA414	HA415	HA416	HA417	HA418	HA419	HA420	HA421	HA422	HA423	HA424	HA425	HA426	HA427	HA428	HA429	HA430	HA431	HA432	HA433	HA434	HA435	HA436	HA437	HA438	HA439	HA440	HA441	HA442	HA443	HA444	HA445	HA446	HA447	HA448	HA449	HA450	HA451	HA452	HA453	HA454	HA455	HA456	HA457	HA458	HA459	HA460	HA461	HA462	HA463	HA464	HA465	HA466	HA467	HA468	HA469	HA470	HA471	HA472	HA473	HA474	HA475	HA476	HA477	HA478	HA479	HA480	HA481	HA482	HA483	HA484	HA485	HA486	HA487	HA488	HA489	HA490	HA491	HA492	HA493	HA494	HA495	HA496	HA497	HA498	HA499	HA500	HA501	HA502	HA503	HA504	HA505	HA506	HA507	HA508	HA509	HA510	HA511	HA512	HA513	HA514	HA515	HA516	HA517	HA518	HA519	HA520	HA521	HA522	HA523	HA524	HA525	HA526	HA527	HA528	HA529	HA530	HA531	HA532	HA533	HA534	HA535	HA536	HA537	HA538	HA539	HA540	HA541	HA542	HA543	HA544	HA545	HA546	HA547	HA548	HA549	HA550	HA551	HA552	HA553	HA554	HA555	HA556	HA557	HA558	HA559	HA560	HA561	HA562	HA563	HA564	HA565	HA566	HA567	HA568	HA569	HA570	HA571	HA572	HA573	HA574	HA575	HA576	HA577	HA578	HA579	HA580	HA581	HA582	HA583	HA584	HA585	HA586	HA587	HA588	HA589	HA590	HA591	HA592	HA593	HA594	HA595	HA596	HA597	HA598	HA599	HA600	HA601	HA602	HA603	HA604	HA605	HA606	HA607	HA608	HA609	HA610	HA611	HA612	HA613	HA614	HA615	HA616	HA617	HA618	HA619	HA620	HA621	HA622	HA623	HA624	HA625	HA626	HA627	HA628	HA629	HA630	HA631	HA632	HA633	HA634	HA635	HA636	HA637	HA638	HA639	HA640	HA641	HA642	HA643	HA644	HA645	HA646	HA647	HA648	HA649	HA650	HA651	HA652	HA653	HA654	HA655	HA656	HA657	HA658	HA659	HA660	HA661	HA662	HA663	HA664	HA665	HA666	HA667	HA668	HA669	HA670	HA671	HA672	HA673	HA674	HA675	HA676	HA677	HA678	HA679	HA680	HA681	HA682	HA683	HA684	HA685	HA686	HA687	HA688	HA689	HA690	HA691	HA692	HA693	HA694	HA695	HA696	HA697	HA698	HA699	HA700	HA701	HA702	HA703	HA704	HA705	HA706	HA707	HA708	HA709	HA710	HA711	HA712	HA713	HA714	HA715	HA716	HA717	HA718	HA719	HA720	HA721	HA722	HA723	HA724	HA725	HA726	HA727	HA728	HA729	HA730	HA731	HA732	HA733	HA734	HA735	HA736	HA737	HA738	HA739	HA740	HA741	HA742	HA743	HA744	HA745	HA746	HA747	HA748	HA749	HA750	HA751	HA752	HA753	HA754	HA755	HA756	HA757	HA758	HA759	HA760	HA761	HA762	HA763	HA764	HA765	HA766	HA767	HA768	HA769	HA770	HA771	HA772	HA773	HA774	HA775	HA776	HA777	HA778	HA779	HA780	HA781	HA782	HA783	HA784	HA785	HA786	HA787	HA788	HA789	HA790	HA791	HA792	HA793	HA794	HA795	HA796	HA797	HA798	HA799	HA800	HA801	HA802	HA803	HA804	HA805	HA806	HA807	HA808	HA809	HA810	HA811	HA812	HA813	HA814	HA815	HA816	HA817	HA818	HA819	HA820	HA821	HA822	HA823	HA824	HA825	HA826	HA827	HA828	HA829	HA830	HA831	HA832	HA833	HA834	HA835	HA836	HA837	HA838	HA839	HA840	HA841	HA842	HA843	HA844	HA845	HA846	HA847	HA848	HA849	HA850	HA851	HA852	HA853	HA854	HA855	HA856	HA857	HA858	HA859	HA860	HA861	HA862	HA863	HA864	HA865	HA866	HA867	HA868	HA869	HA870	HA871	HA872	HA873	HA874	HA875	HA876	HA877	HA878	HA879	HA880	HA881	HA882	HA883	HA884	HA885	HA886	HA887	HA888	HA889	HA890	HA891	HA892	HA893	HA894	HA895	HA896	HA897	HA898	HA899	HA900	HA901	HA902	HA903	HA904	HA905	HA906	HA907	HA908	HA909	HA910	HA911	HA912	HA913	HA914	HA915	HA916	HA917	HA918	HA919	HA920	HA921	HA922	HA923	HA924	HA925	HA926	HA927	HA928	HA929	HA930	HA931	HA932	HA933	HA934	HA935	HA936	HA937	HA938	HA939	HA940	HA941	HA942	HA943	HA944	HA945	HA946	HA947	HA948	HA949	HA950	HA951	HA952	HA953	HA954	HA955	HA956	HA957	HA958	HA959	HA960	HA961	HA962	HA963	HA964	HA965	HA966	HA967	HA968	HA969	HA970	HA971	HA972	HA973	HA974	HA975	HA976	HA977	HA978	HA979	HA980	HA981	HA982	HA983	HA984	HA985	HA986	HA987	HA988	HA989	HA990	HA991	HA992	HA993	HA994	HA995	HA996	HA997	HA998	HA999	HA1000	HA1001	HA1002	HA1003	HA1004	HA1005	HA1006	HA1007	HA1008	HA1009	HA1010	HA1011	HA1012	HA1013	HA1014	HA1015	HA1016	HA1017	HA1018	HA1019	HA1020	HA1021	HA1022	HA1023	HA1024	HA1025	HA1026	HA1027	HA1028	HA1029	HA1030	HA1031	HA1032	HA1033	HA1034	HA1035	HA1036	HA1037	HA1038	HA1039	HA1040	HA1041	HA1042	HA1043	HA1044	HA1045	HA1046	HA1047	HA1048	HA1049	HA1050	HA1051	HA1052	HA1053	HA1054	HA1055	HA1056	HA1057	HA1058	HA1059	HA1060	HA1061	HA1062	HA1063	HA1064	HA1065	HA1066	HA1067	HA1068	HA1069	HA1070	HA1071	HA1072	HA1073	HA1074	HA1075	HA1076	HA1077	HA1078	HA1079	HA1080	HA1081	HA1082	HA1083	HA1084	HA1085	HA1086	HA1087	HA1088	HA1089	HA1090	HA1091	HA1092	HA1093	HA1094	HA1095	HA1096	HA1097	HA1098	HA1099	HA1100	HA1101	HA1102	HA1103	HA1104	HA1105	HA1106	HA1107	HA1108	HA1109	HA1110	HA1111	HA1112	HA1113	HA1114	HA1115	HA1116	HA1117	HA1118	HA1119	HA1120	HA1121	HA1122	HA1123	HA1124	HA1125	HA1126	HA1127	HA1128	HA1129	HA1130	HA1131	HA1132	HA1133	HA1134	HA1135	HA1136	HA1137	HA1138	HA1139	HA1140	HA1141	HA1142	HA1143	HA1144	HA1145	HA1146	HA1147	HA1148	HA1149	HA1150	HA1151	HA1152	HA1153	HA1154	HA1155	HA1156	HA1157	HA1158	HA1159	HA1160	HA1161	HA1162	HA1163	HA1164	HA1165	HA1166	HA1167	HA1168	HA1169	HA1170	HA1171	HA1172	HA1173	HA1174	HA1175	HA1176	HA1177	HA1178	HA1179	HA1180	HA1181	HA1182	HA1183	HA1184	HA1185	HA1186	HA1187	HA1188	HA1189	HA1190	HA1191	HA1192	HA1193	HA1194	HA1195	HA1196	HA1197	HA1198	HA1199	HA1200	HA1201	HA1202	HA1203	HA1204	HA1205	HA1206	HA1207	HA1208	HA1209	HA1210	HA1211	HA1212	HA1213	HA1214	HA1215	HA1216	HA1217	HA1218	HA1219	HA1220	HA1221	HA1222	HA1223	HA1224	HA1225	HA1226	HA1227	HA1228	HA1229	HA1230	HA1231	HA1232	HA1233	HA1234	HA1235	HA1236	HA1237	HA1238	HA1239	HA1240	HA1241	HA1242	HA1243	HA1244	HA1245	HA1246	HA1247	HA1248	HA1249	HA1250	HA1251	HA1252	HA1253	HA1254	HA1255	HA1256	HA1257	HA1258	HA1259	HA1260	HA1261	HA1262	HA1263	HA1264	HA1265	HA1266	HA1267	HA1268	HA1269	HA1270	HA1271	HA1272	HA1273	HA1274	HA1275	HA1276	HA1277	HA1278	HA1279	HA1280	HA1281	HA1282	HA1283	HA1284	HA1285	HA1286	HA1287	HA1288	HA1289	HA1290	HA1291	HA1292	HA1293	HA1294	HA1295	HA1296	HA1297	HA1298	HA1299	HA1300	HA1301	HA1302	HA1303	HA1304	HA1305	HA1306	HA1307	HA1308	HA1309	HA1310	HA1311	HA1312	HA1313	HA1314	HA1315	HA1316	HA1317	HA1318	HA1319	HA1320	HA1321	HA1322	HA1
-------	-------	---------	-------------------------------	----------------------------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	-----

73

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.

HA

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal aislado, donde se dice anticuerpo monoclonal
enlazado a un epítipo 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 epítipo de
es no lineal.
6. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1, donde se dice epítipo
comprende el polipéptido HA1 y HA2
7. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1, aquí el epítipo 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.

5 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 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 epítipo de proteína de hemaglutinina (HA) de un virus de influenza, y neutraliza el virus de influenza A.

15

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

20

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.

25

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



16. El anticuerpo de la reivindicación 11, aquí epítipo 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.

5 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.

10

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.

15

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.

20

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.

25

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

78

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
5 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
10 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.

15 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
20 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
25 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.

JP

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

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

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

15 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.

20 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.

25 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.

(70)

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)

181

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.

5

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.

10

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.

15

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.

20

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.

25

172

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.

183

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.

5 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.

10

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.

15

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

20

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.

25

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-

184

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*.

5

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

10

comprende una secuencia de aminoácidos VH codificada por el gen germilínea 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 epítipo en la región de tallo de la proteína de hemaglutinina (HA) de un virus de influenza, y neutraliza virus de influenza A.

15

185

RESUMEN

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

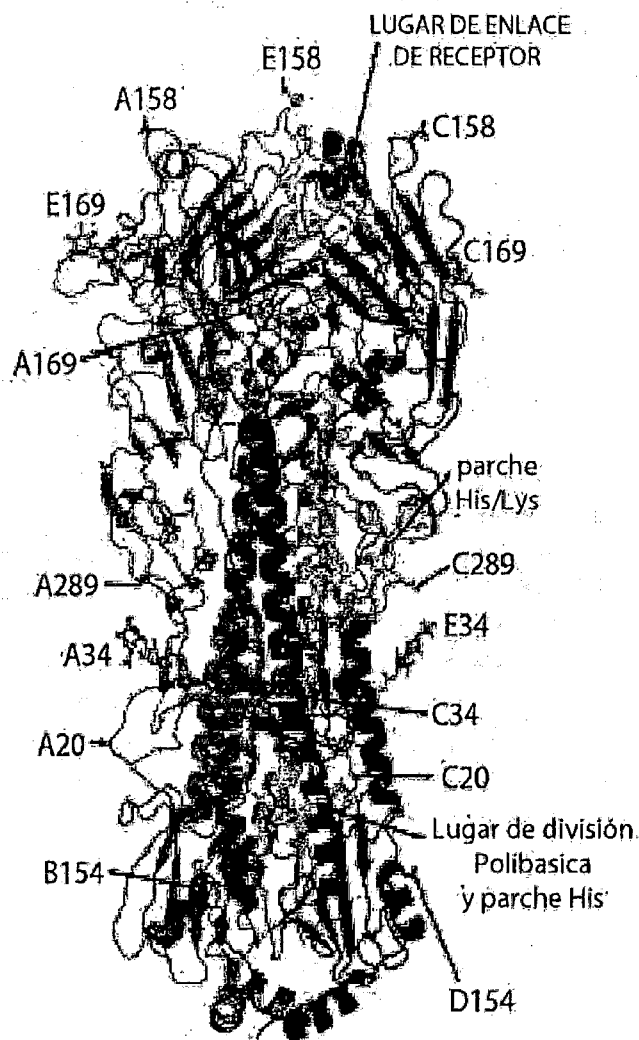
10

15

20

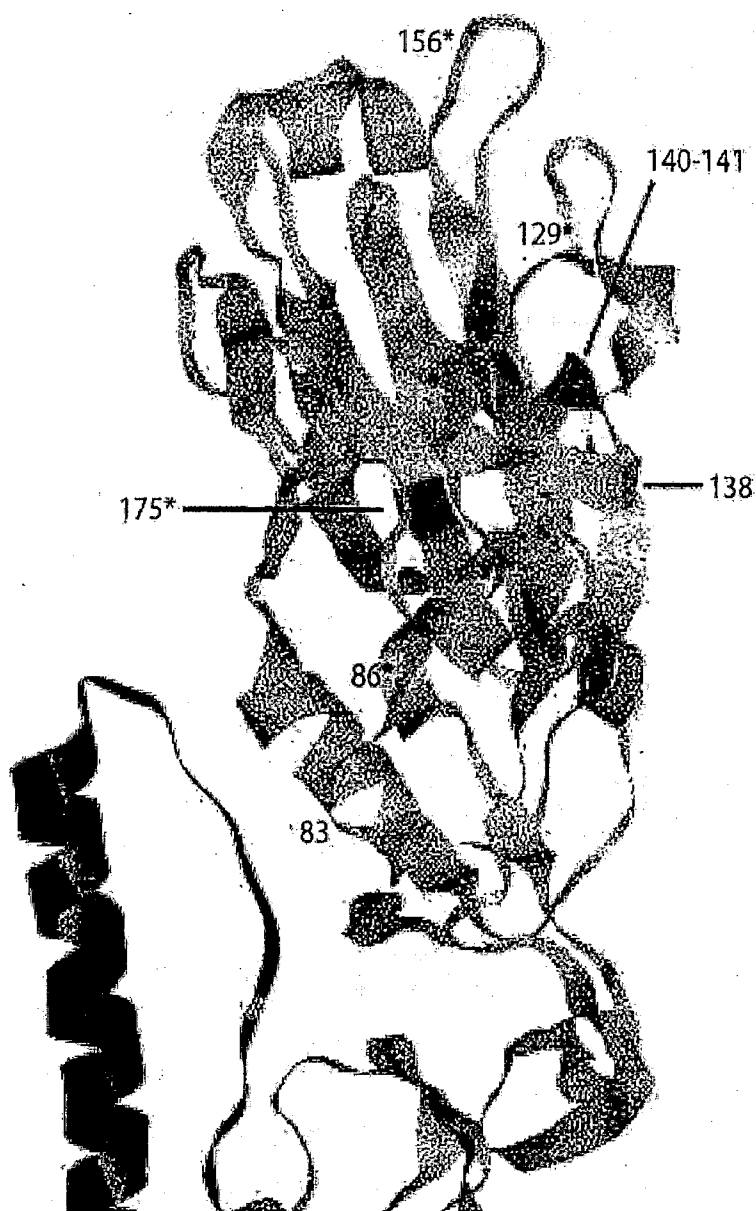
25

186



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

Fig. 1A



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

Fig. 1B

188

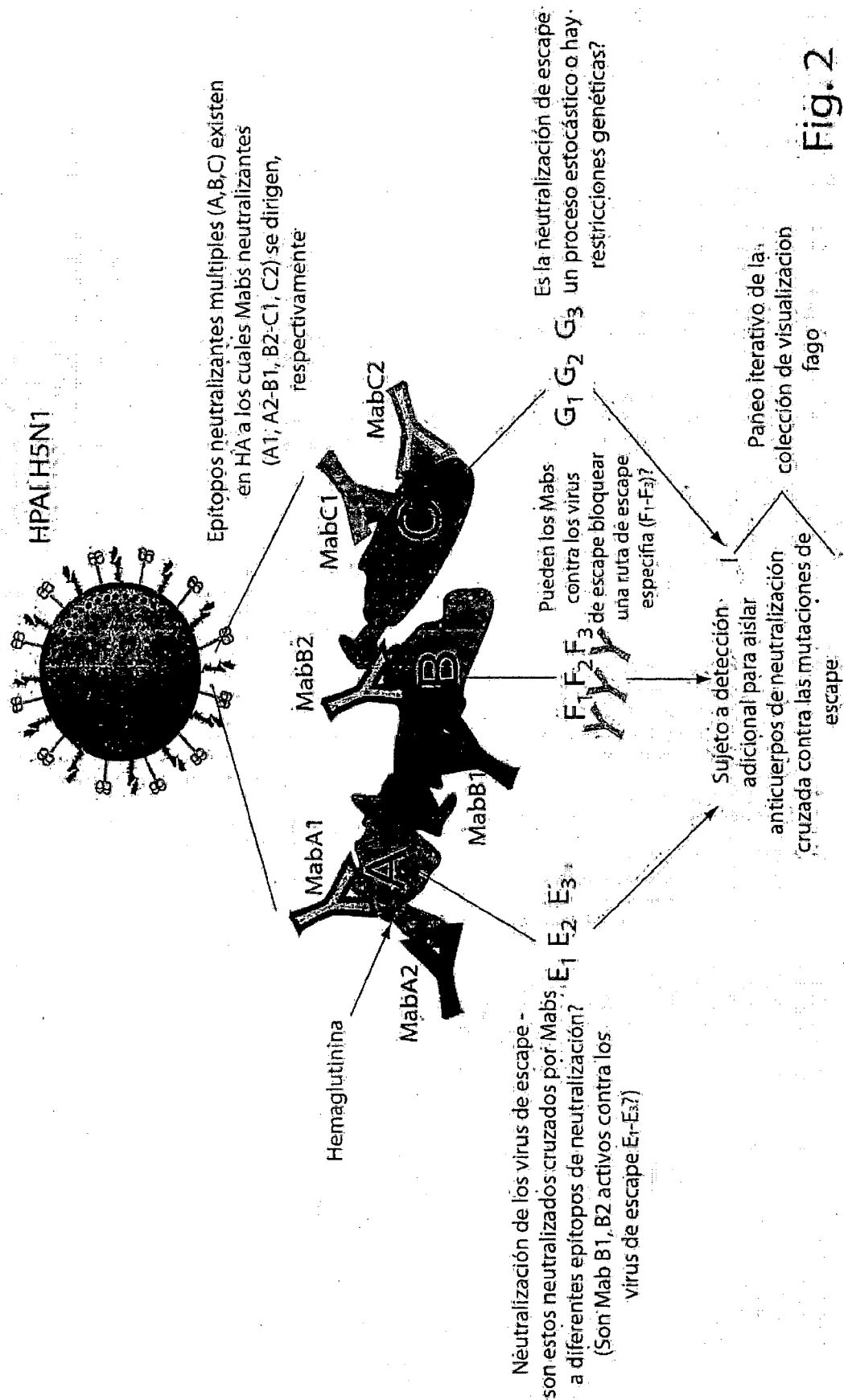


Fig. 2

189

Secuencias de Aminoácidos de regiones variables de mAbs anti-H5

VH	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	V GENE
Cons.	KKPGSSVKVCKAS	GGTSSYA	LSNVKQAPGQLEMMGG	IIPFGTP	NVAQKQFRVITADESTAYMELSSLRSEDTAVYIC	AR		WGQGTU
IGHV		GGTSS		IPFGT				1-69
F10/E90	TSS	EVHSSP	L	S.MF	Q.R	D.R	SPSWTSSGTCVFDH	1-69
D8/D80	SA	PT		GMPTA	L	T	GLVYESS	1-69
A66/E88	SMT	FTL		S.PRM	N.N	T.K	TISSQPNND	1-69
G17	A	T		GVFM	K	N.A	EPQVWCKN	1-69
D7/H98	NTN	F	V	V.LPRTA	S	NV	SSGTFRSH	1-69
H40	R...A	P	H	W.N	VH	N.R.T	GASVLRVFDKOP	1-2

VL	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	GENE
Cons.	QPVLTQPPS-ASSSPGQRVTISCTGS		VANYQKPGQAPKLLIY		DRPSGTPRPSGSR--SGTASITISGLQPEDEADYYC		FGGGLTLVL	
D7VA	NFM...H-V.A	KT	Q...R.S	TTV	EDD	R...V	QFYDTNNHAV	1V6-57
D8VA	S	S	H.K	M	EVT	K...V	CSVAGHSAYV	VL2-11
F10VA	V.KGLR	TA.LT	N	SNNVGNQ	A...L	HQ.HP	STWDSLSAVV	1V10-54
G17VA	V.KGLR	TALIT	D	SNNVGHQ	T...L	HQ.HP	SVWDSLSAVV	1V10-54
H40VA	V.VA	TAS.P.C	N	NIGGS	H	L.V	QVWDSGNDRLP	VL3-21
A66VK	EI...S.ATL	L...E.A.L	RA	QSVSSY	L	R	QQYGSSPQ	KV3-20
D80VK	EI...S.GTL	L...E.A.L	RA	QSLSSKY	L	L.T	QQYDGVPT	KV3-20
E88VA	L.....T	I	S	SSNIGSNT	N	L.T	QSDVSRLSASL	1V1-44
E90VK	DIQ...S	SL.A.V	D	TSISSY	LN	K	QQYDSSPYT	KV1-39
H98VA	SYE.....KH	S	G	TSNIGRNH	N	L.T	ASWDDNLSGVV	1V1-44

Marco de trabajo de regiones 1-4 (FR1-4) y regiones complementariamente determinantes 1-3 (CDR1-3) para VH y VL son mostrados. FR, CDR y nombres de gen son definidos utilizando la base de datos IMGT. Para VH, los primeros 11 residuos de FR1 (QVQLVQ56AEV) y los últimos 5 residuos de FR4 (VTVSS) son invariantes y no son mostrados. Puntos denotan identidad con la secuencia de consenso, guiones denotan espacios en blanco. Seis genes diferentes VH y 10 genes diferentes VL fueron encontrados. 4 de 6 anticuerpos comparten el mismo gen VH. 5 de los 6 VH pertenecen a una familia de gen, IGHV1-69*01. Los genes VL son mucho más diversos que los genes VH, consistente con la falta de contactos observados entre F10 y H5; tres de los 10 VL son cadena k. Las 3 cadenas VH utilizadas para generar IgG1s son coloreadas de rojo. Contactos de residuos H5 a F10 son resaltados, junto con residuos correspondientes en otros VHs, en cian (residuos críticos como se define por cálculos de energía de FastContact) y gris (otros contactos <4.5 Å).

Fig.3

190

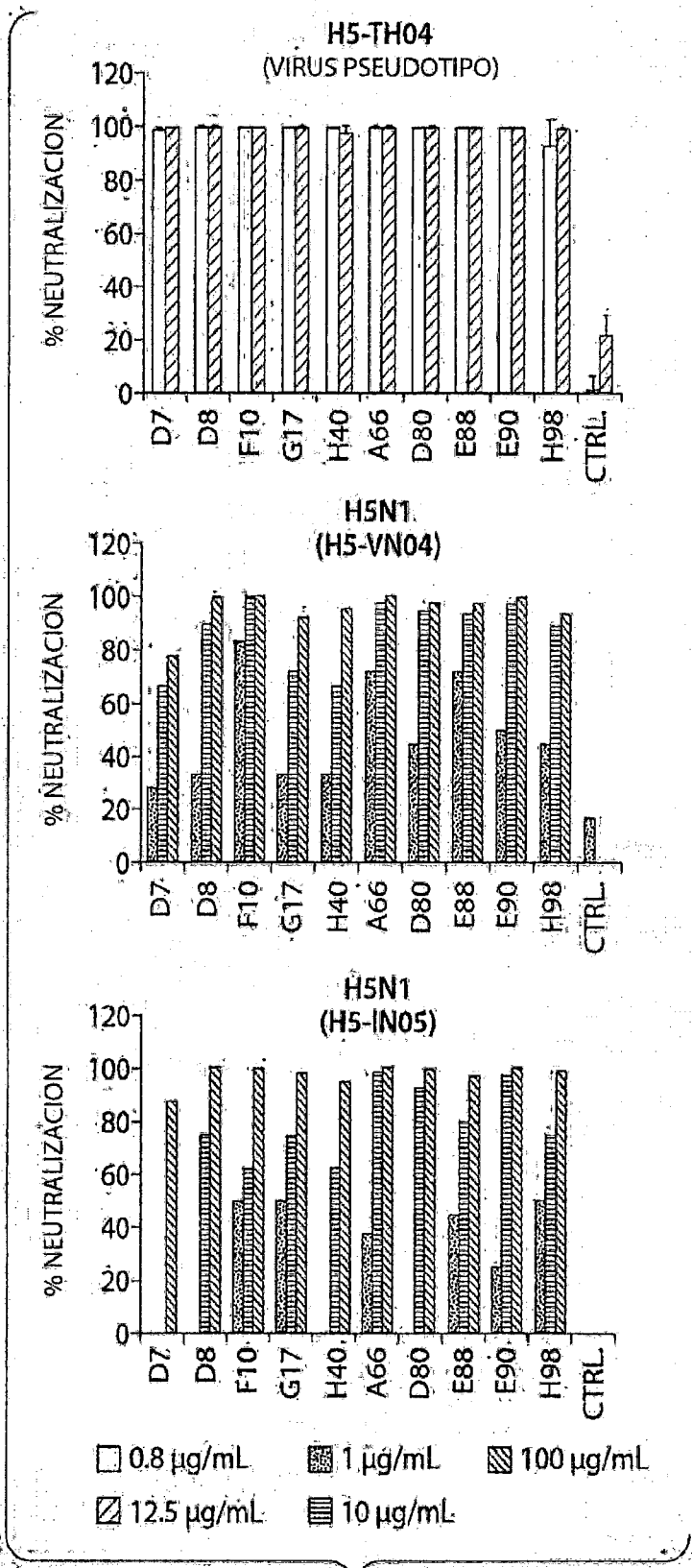


Fig. 4A

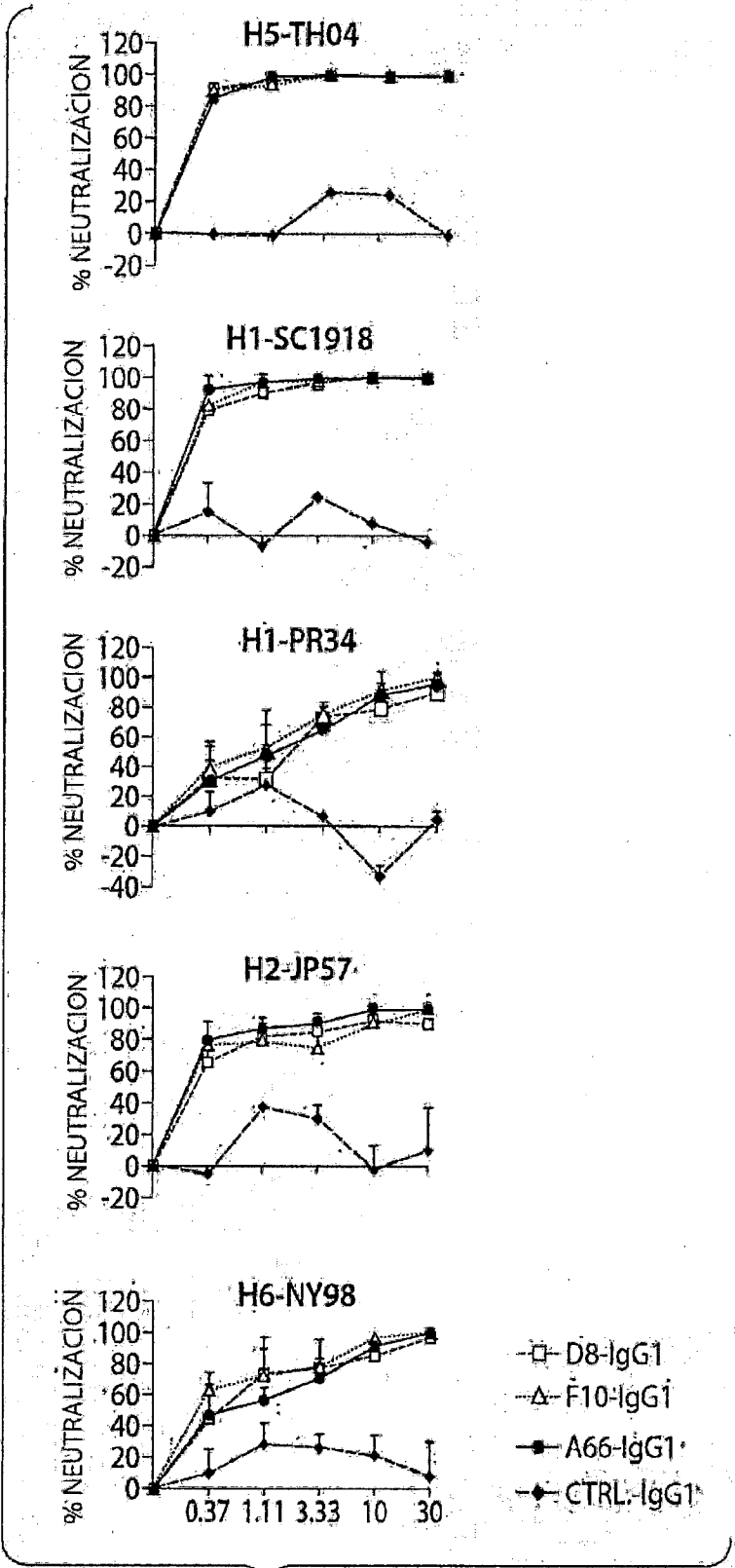


Fig. 4B

192

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

Fig. 4C

193

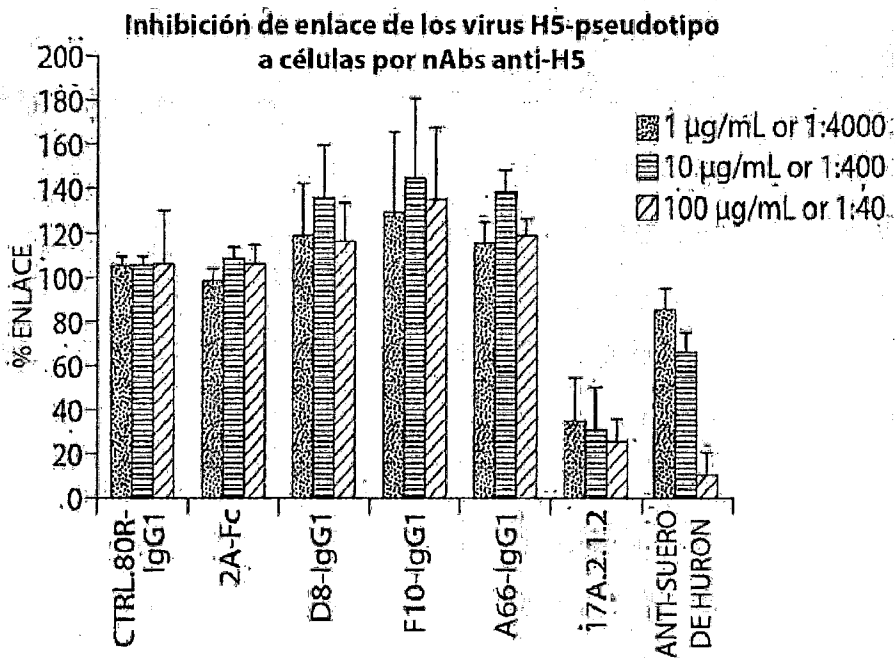


Fig. 5A

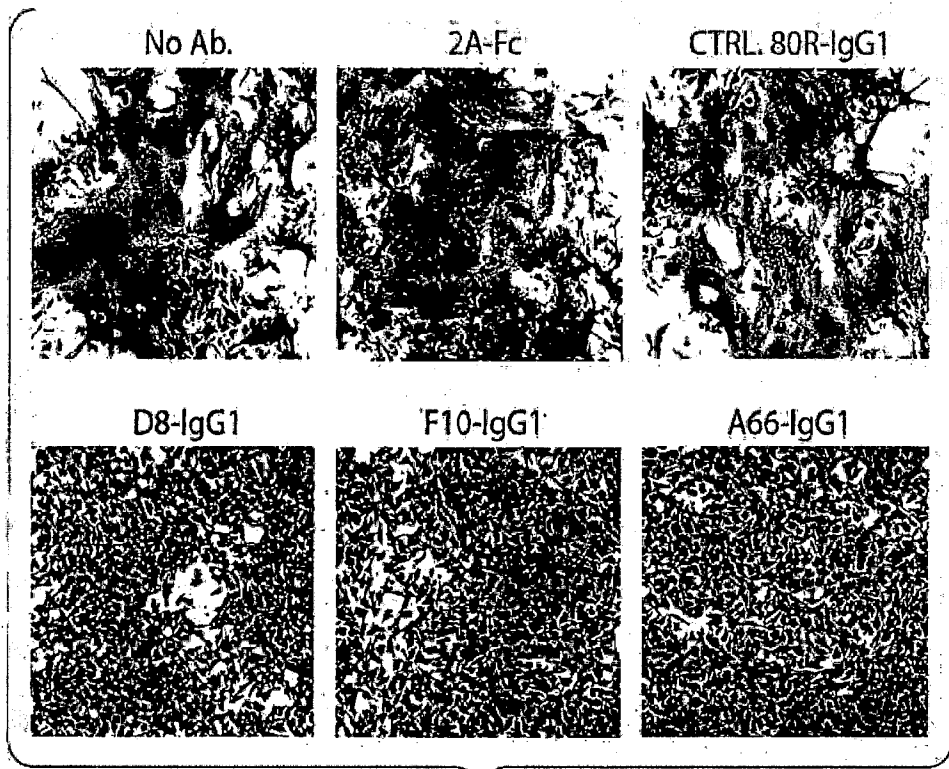
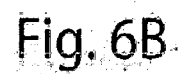
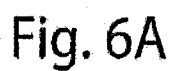


Fig. 5B



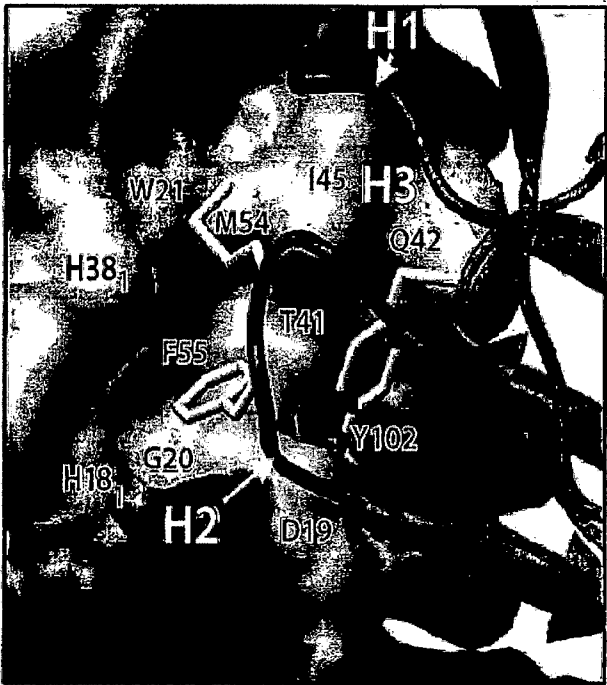


Fig. 6C

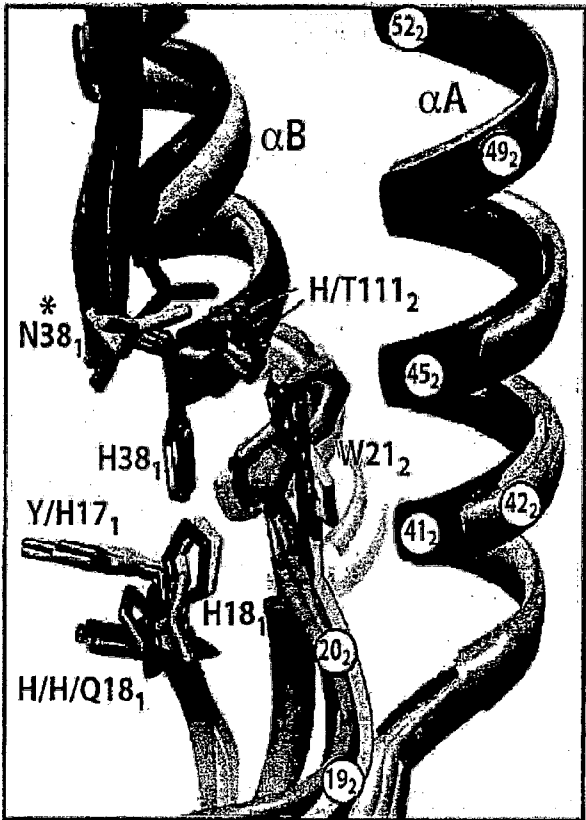


Fig. 6D

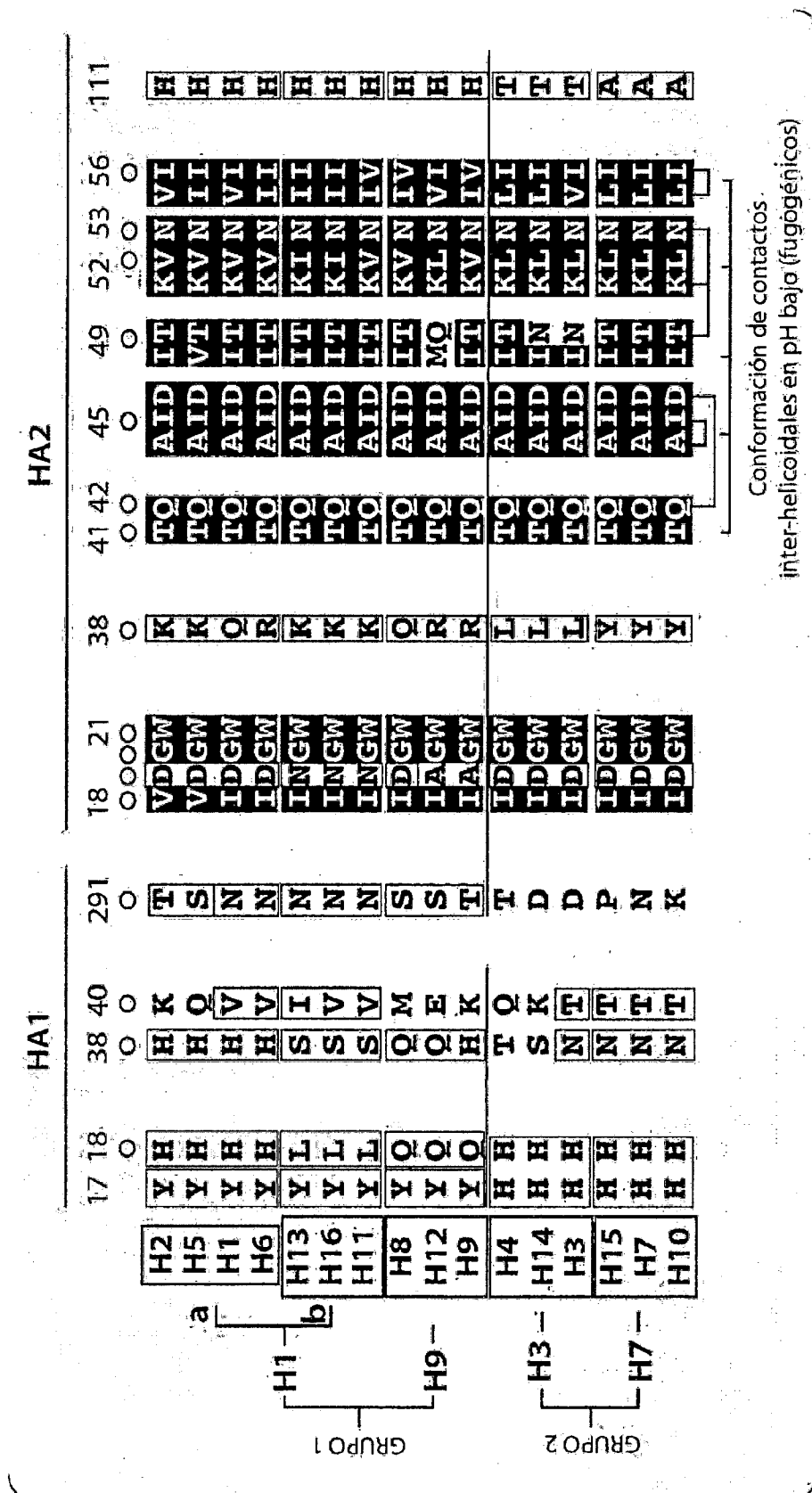


Fig. 6E

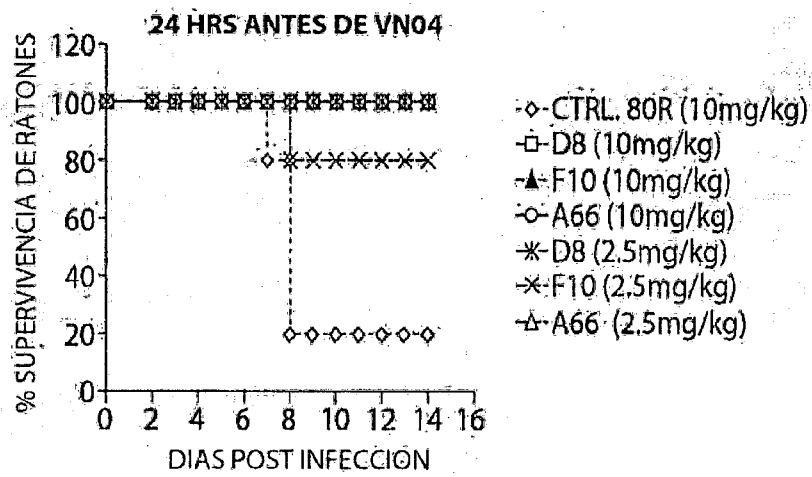


Fig. 7A

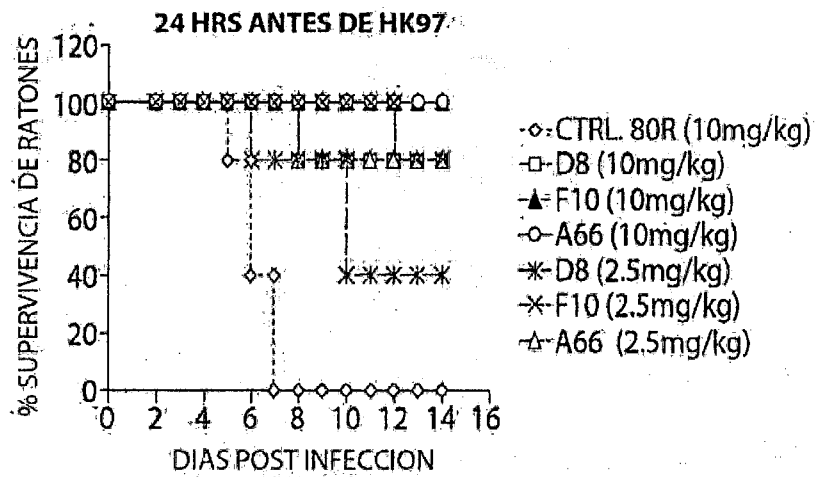


Fig. 7B

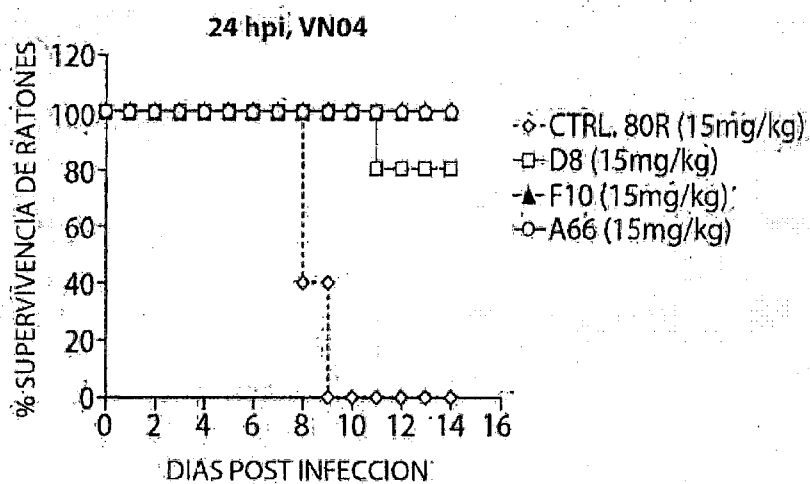


Fig. 7C

198

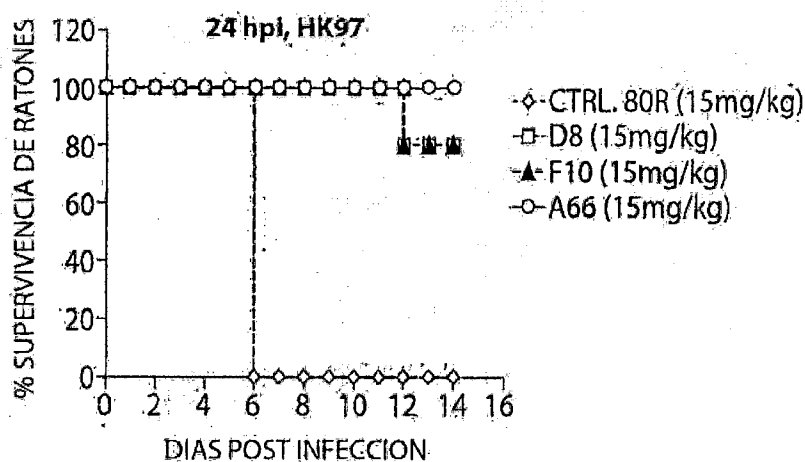


Fig. 7D

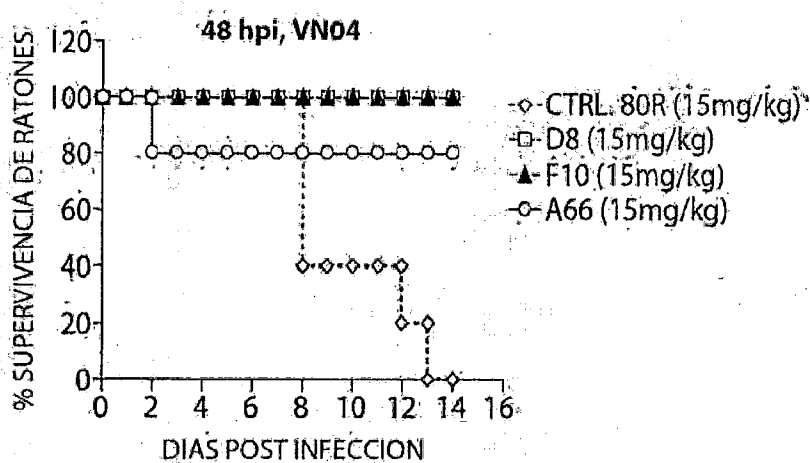


Fig. 7E

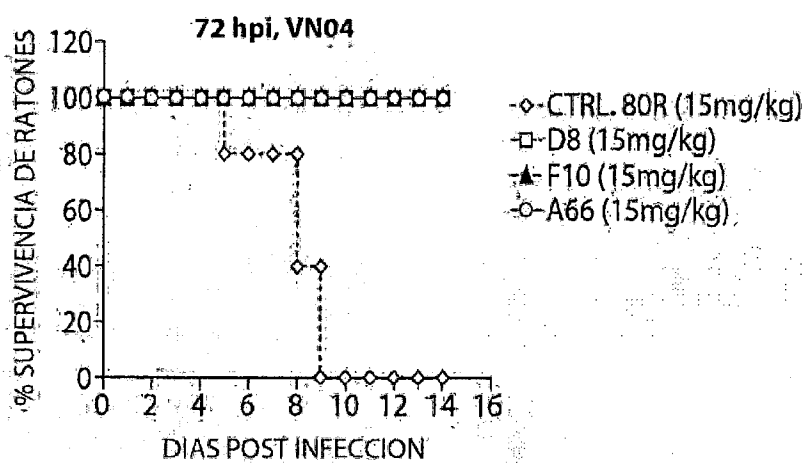


Fig. 7F

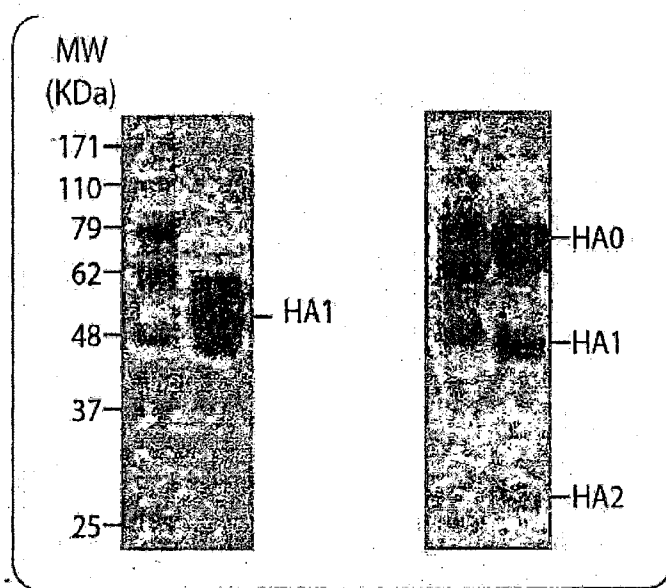


Fig. 8A

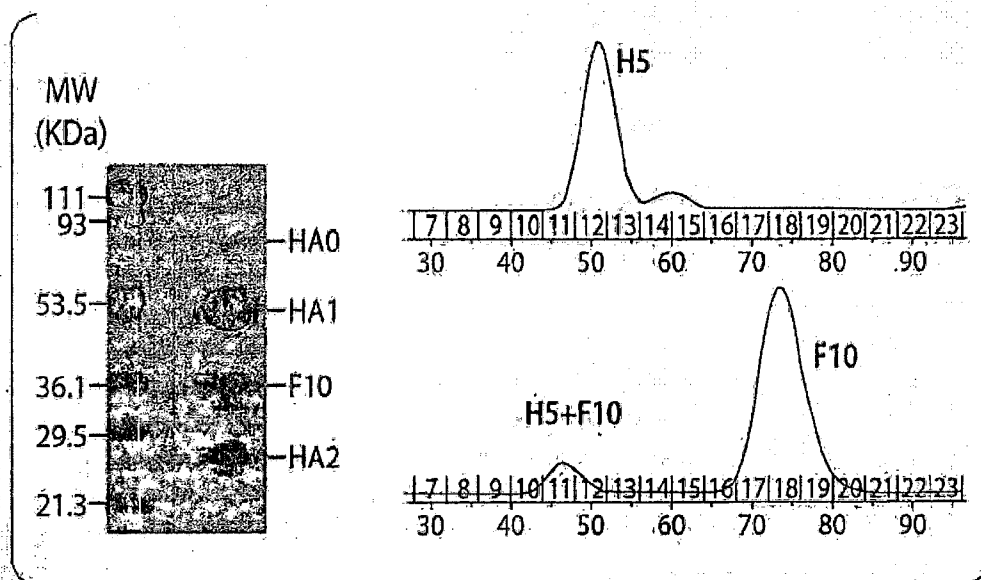


Fig. 8B

200

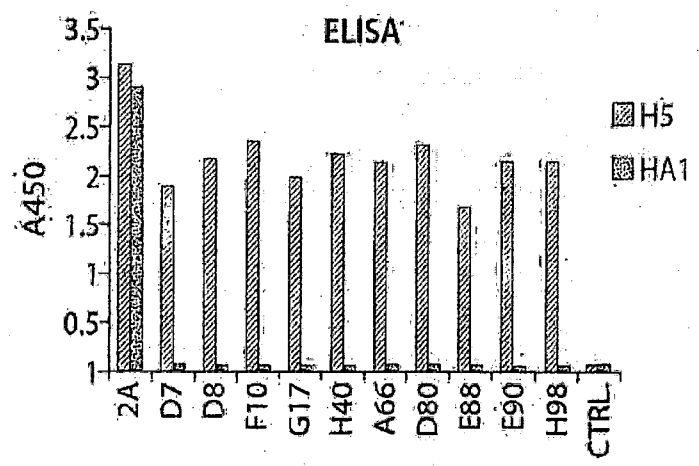


Fig. 9A

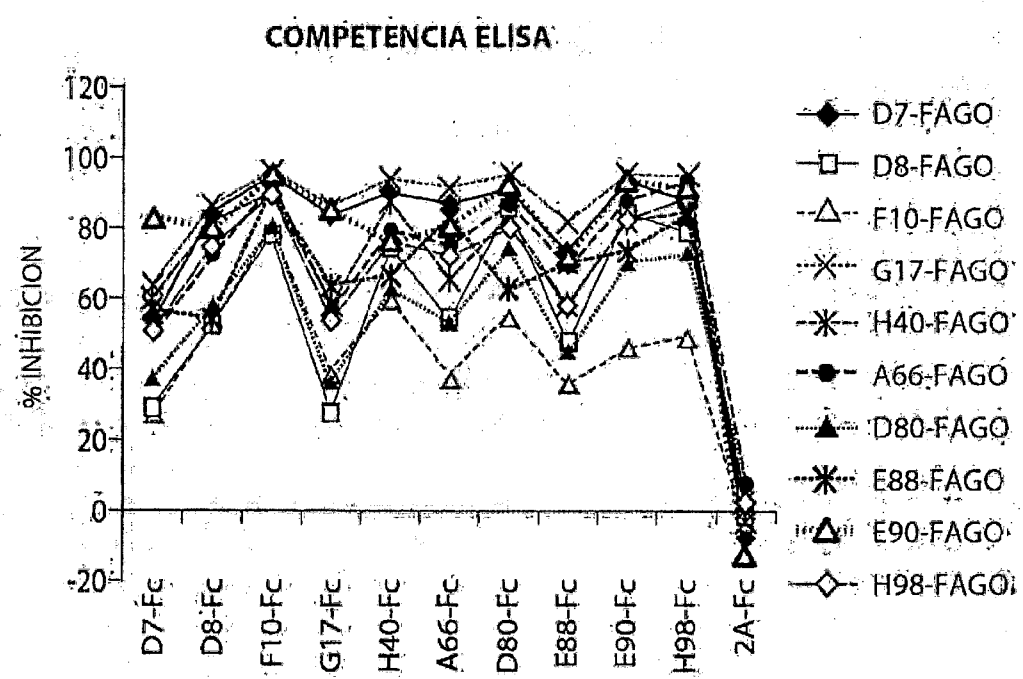


Fig. 9B

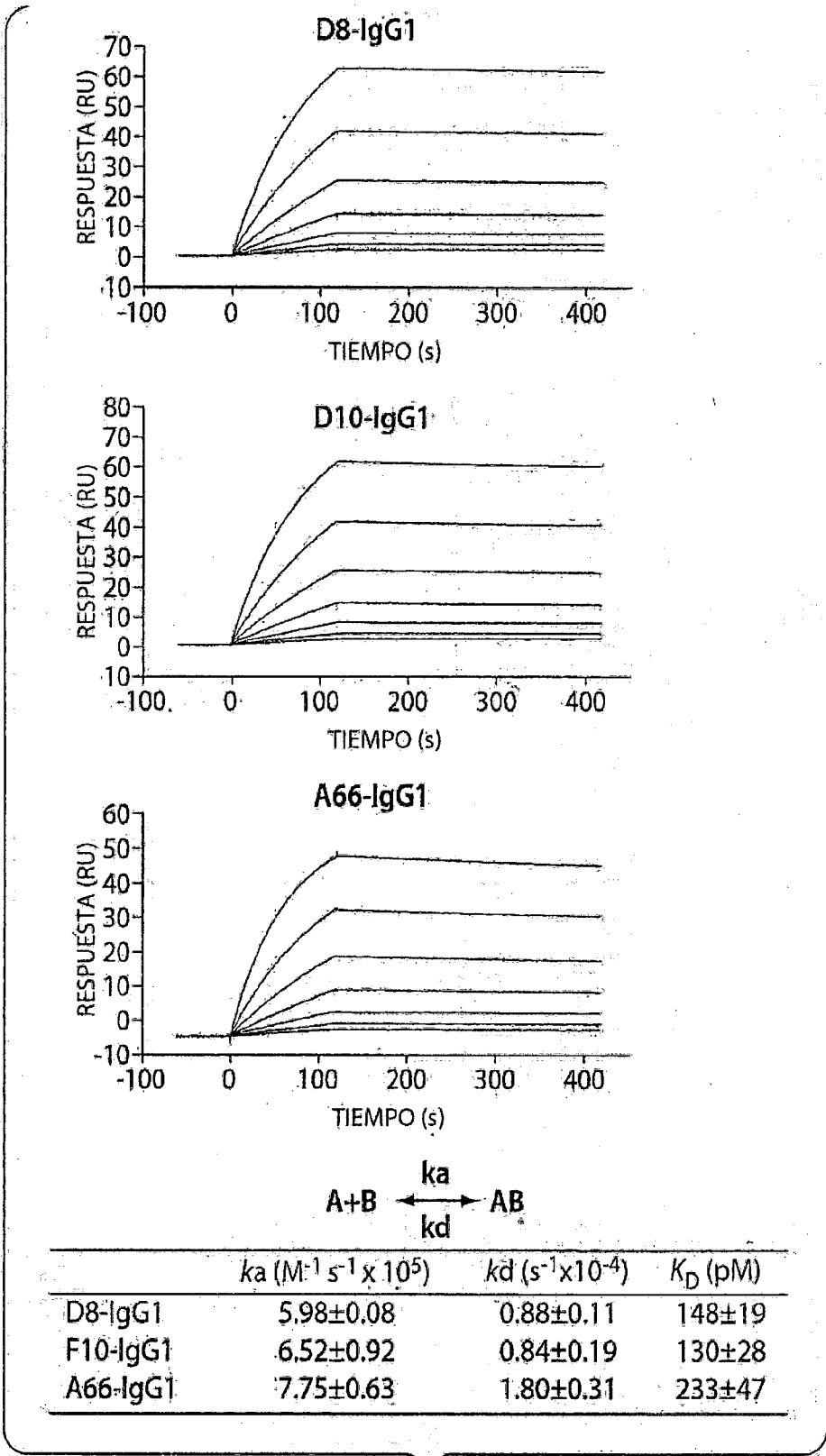


Fig. 10

202

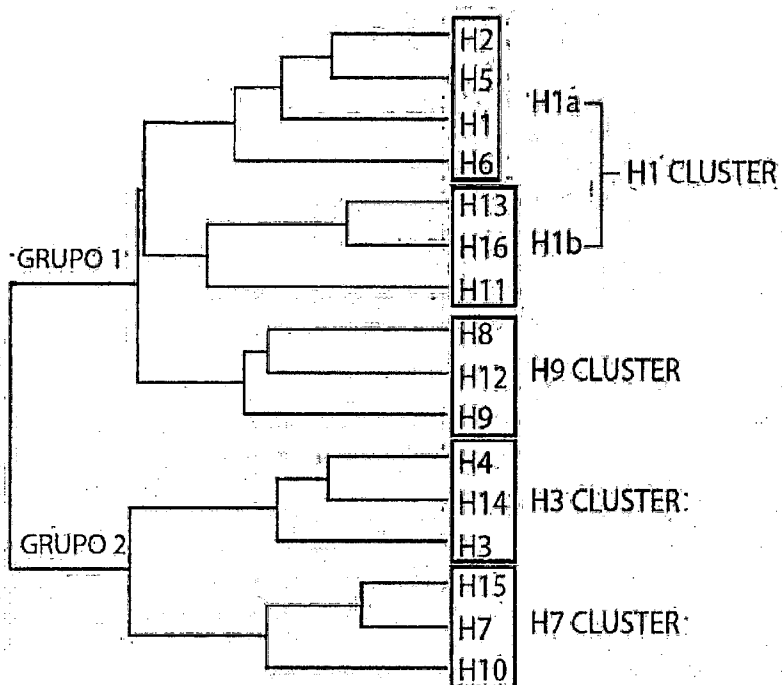
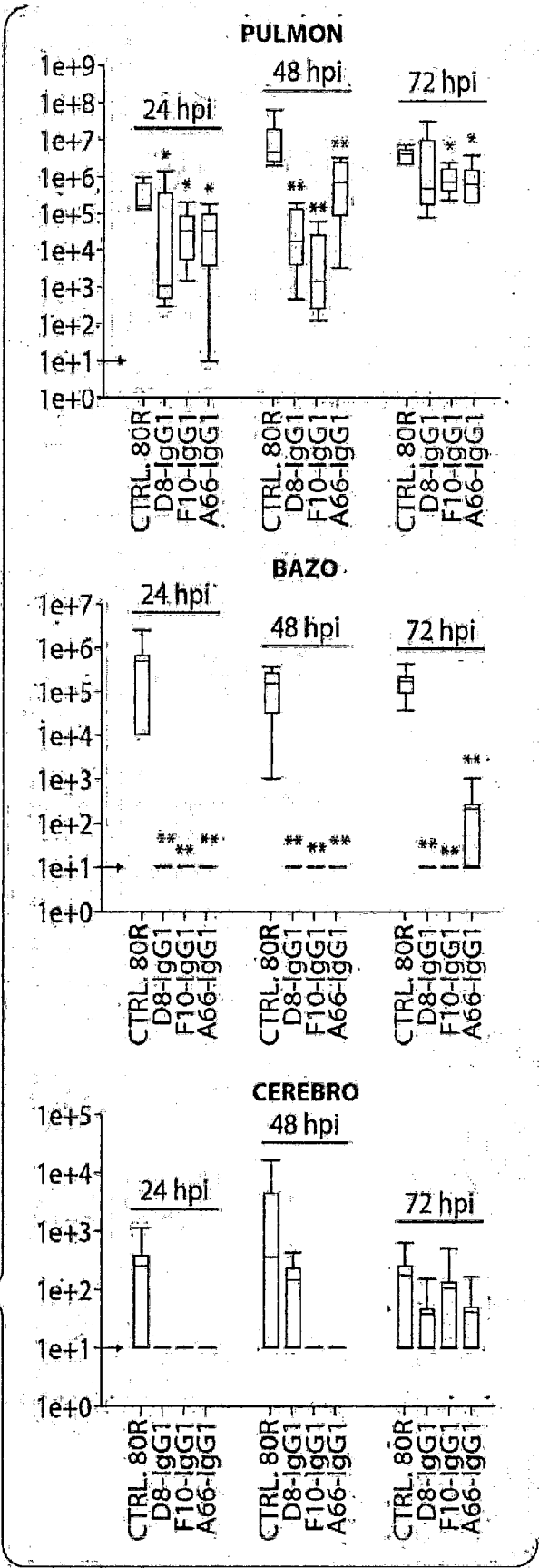


Fig. 11

Fig. 12



1204

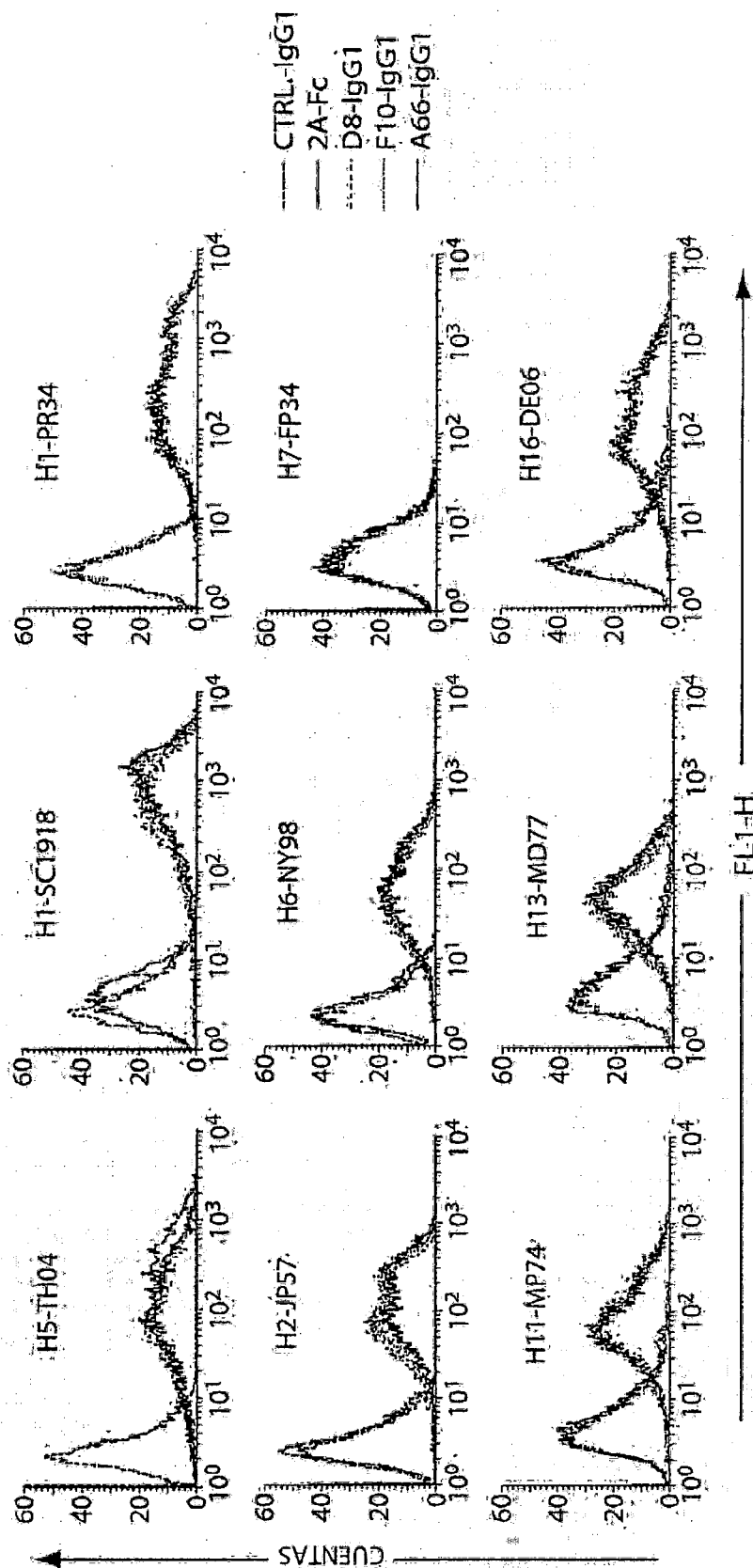


Fig. 13

205

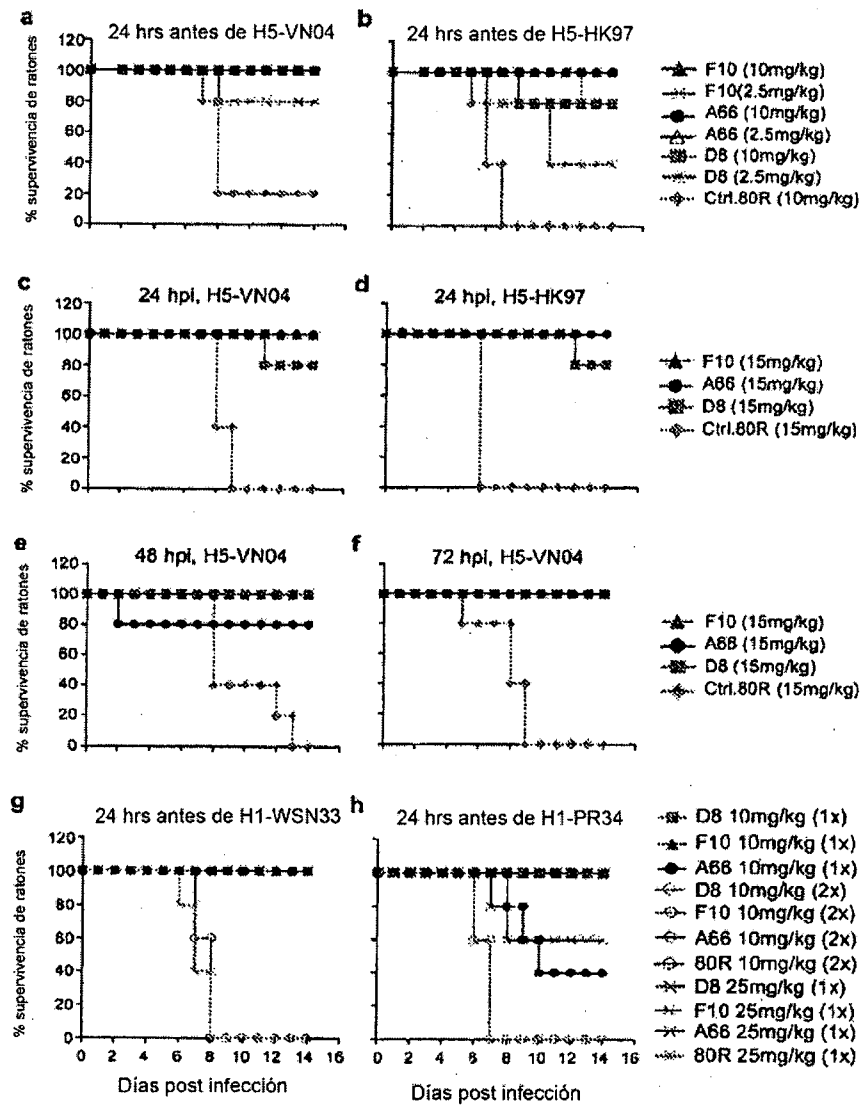


Figura 7

REIVINDICACIONES MODIFICADAS

● PARA REALIZAR EL EXAMEN DE

PATENTABILIDAD

201

REIVINDICACIONES

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

2. El anticuerpo monoclonal aislado de la reivindicación 1 en donde el epítopo comprende el amino ácido en la posición 18, 38, 40, y 291 del polipéptido HA1.
10

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

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

5. El anticuerpo monoclonal aislado de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho anticuerpo es un fragmento scFv.
20

6. Un anticuerpo monoclonal aislado, o un fragmento scFv del mismo, en donde el anticuerpo monoclonal o fragmento scFv del mismo, se enlaza a un epítopo en la región del tallo de la proteína hemaglutinina (HA) de un virus de influenza, en donde el epítopo comprende el amino ácido en la posición 18, 38, 40, y 291 del polipéptido HA1.
25

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

8. El anticuerpo monoclonal aislado, o fragmento scFv del mismo, de la reivindicación 6 o 7, en donde el epítopo además comprende el el amino ácido en la posición 41, 42, 45, 49, 52, 53, y 56 del polipéptido HA2.
30

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

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

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

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

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

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

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

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

25 11. El anticuerpo monoclonal aislado, o fragmento scFv del mismo, de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo monoclonal, o fragmento scFv del mismo, comprende una secuencia de amino ácido de dominio variable de cadena pesada seleccionada del grupo consistente de SEQ ID NOs: 6, 12, 18, 24, 28, 32, y 36.

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

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

variables de cadena liviana provistos en SEQ ID NOs: 8, 10, 14, 16, 20, 22, 26, 30, 34, y 38.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

15

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

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

30

35

40

213 212

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176080-7

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-081516- -00002-0000

Fecha: 2010-09-29 17:08:38 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 212

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 74,192
FECHA : SEPTIEMBRE 6 DE 2010

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	156798806	06/09/2010	26,469,000.00

***** CONCEPTO *****

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. _____

Colo: 17756-841-001-9

514.

2020
Bogotá D.C.,

Doctor(a)
SUAREZ DE PAEZ LUZ CLEMENCIA
Apoderado(a) y/o Representante de
DANA-FABER CANCER INSTITUTE, INC
BURNHAM INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH

REFERENCIA	Radicación No.	10 81516
	Solicitud internacional	PCT/US2008/085876
	Fecha inicio fase nacional	06/07/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	416
	Oficio No.	13216
	Folios	1

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), el Reglamento y la Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial.

Cúmplase
Dado en Bogotá DC,



JOSE LUIS SALAZAR LOPEZ
Director de Nuevas Creaciones (C)

jfernand