



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 314 179**

(51) Int. Cl.:

**C07K 16/10** (2006.01)

**G01N 33/576** (2006.01)

**C07K 16/42** (2006.01)

(12)

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **03705004 .4**

(96) Fecha de presentación : **29.01.2003**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1476468**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **17.11.2004**

(54) Título: **Fragmentos Fab de anticuerpo monoclonal humano dirigidos contra la glucoproteína E2 del VHC y que están dotados de actividad neutralizante *in vitro*.**

(30) Prioridad: **30.01.2002 IT RM02A0049**

(73) Titular/es: **Roberto Burioni**  
**Piazza Ferrari, 22**  
**47900 Rimini, IT**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.03.2009**

(72) Inventor/es: **Burioni, Roberto**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.03.2009**

(74) Agente: **Durán Moya, Luis Alfonso**

**ES 2 314 179 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Fragmentos Fab de anticuerpo monoclonal humano dirigidos contra la glucoproteína E2 del VHC y que están dotados de actividad neutralizante *in vitro*.

La presente invención se refiere a fragmentos Fab de anticuerpo monoclonal humano dirigidos contra la glucoproteína E2 del VHC y que están dotados de actividad neutralizante *in vitro*. El virus de la hepatitis C (VHC) infecta a aproximadamente el 4% de la población mundial (Organización Mundial de la Salud, 1999). Aproximadamente el 80% de los sujetos que entran en contacto con este patógeno desarrollan una infección crónica ya que la respuesta inmunitaria del huésped es incapaz de erradicar la infección, con el riesgo de contraer enfermedades hepáticas graves tales como hepatitis crónica, cirrosis y carcinoma de células hepáticas [1, 2].

El tratamiento de la infección crónica se basa en la terapia combinada con interferón y ribavirina, que es extremadamente costosa, causa reacciones adversas muy importantes y es moderadamente eficaz (solo 1 paciente de cada 4 obtiene resultados a largo plazo) [3, 4]. La infección viral no proporciona protección inmunitaria. Este hecho, junto con la alta variabilidad del virus en la estructura antigenética reconocida por el sistema inmunitario, ha impedido el desarrollo de una seroterapia y de vacunas eficaces en la protección de los individuos frente a la infección por el VHC. Por consiguiente, es evidente que se necesitan encarecidamente nuevas estrategias antivirales.

El autor ha clonado los genes que codifican una gran cantidad de fragmentos de anticuerpos Fabs humanos dirigidos contra una de las proteínas del VHC, la glucoproteína E2 externa, que se considera la diana más importante para una respuesta inmunitaria protectora [5]. No obstante, la evaluación de la actividad biológica de estos fragmentos de anticuerpo no es sencilla, ya que no se encuentran disponibles sistemas *in vitro* fiables para la determinación de la actividad neutralizante frente al VHC. Por lo tanto, el autor solo ha evaluado y descrito la capacidad variable de distintos Fabs para inhibir la unión de la proteína E2 a la célula diana, sin demostrar una correlación entre esta actividad y la actividad neutralizante de los sueros [5].

En un trabajo anterior, Burioni y otros (2001) [6], mostraron que algunos anticuerpos anti-E2 producidos por pacientes infectados con el VHC tenían un efecto negativo, que dejaba al virus menos sensible a la respuesta inmunitaria del huésped, probablemente debido a su unión al antígeno E2 y a modificaciones de su conformación [6]. Esto podría explicar por qué títulos elevados de anticuerpos anti-E2 no se encuentran correlacionados directamente con la protección frente a la infección con el VHC.

La solicitud de patente internacional WO 00/05266 y Allander y otros (J. of General Virol., (2000) 81:2451-2459) dan a conocer anticuerpos recombinantes humanos capaces de neutralizar la unión de la glucoproteína E2 del VHC sobre células susceptibles o sobre CD81, respectivamente. El documento WO 02/055560 da a conocer un anticuerpo monoclonal humano, que muestra afinidad de unión inmunológica con el antígeno E2 del VHC, que tiene secuencias específicas de aminoácidos. Finalmente, Rosa y otros, (PNAS (1996) 93:1759-1763) describe un procedimiento para estimar los anticuerpos de neutralización para el VHC mediante la evaluación citofluorimétrica de la unión de E2 a células diana.

Bugli y otros 2001 [7] generaron un mapa de los epítopos de la proteína E2 que se pueden unir *in vitro* al panel de Fabs humanos anti-E2, que muestran cuatro regiones discretas frente a las que se dirige la respuesta inmunitaria (figura 2) [7]. La presencia de anticuerpos dirigidos contra una o más de estas regiones en el suero de pacientes infectados de forma crónica podría estar asociada con complicaciones, eficacia reducida del tratamiento y con un pronóstico distinto. Por consiguiente, es evidente que hay una necesidad de disponer de un procedimiento para la determinación de anticuerpos en un fluido biológico dirigido contra distintos epítopos de la proteína E2 del VHC. Una realización de la presente invención da a conocer este procedimiento.

Los autores de la presente invención también han evaluado la actividad neutralizante de distintos anticuerpos anti-E2 en un sistema de pseudotipos virales, es decir virus que son extamente idénticos al VHC pero que, después de la introducción de las células diana, son capaces de producir una proteína que produce fluorescencia [8]. Revelando la presencia o ausencia de fluorescencia en las células, el procedimiento da a conocer una medida directa de la actividad neutralizante *in vivo* de los anticuerpos anti-E2 dirigidos contra distintos epítopos.

De forma inesperada, los autores descubrieron que dos de los anticuerpos ensayados, e137 y e301, pueden neutralizar el virus en concentraciones que se pueden obtener con una administración única por vía parenteral de un preparado de anticuerpos; otros dos anticuerpos no tenían actividad neutralizante y uno fue incluso capaz de fomentar la infección viral.

El desarrollo del procedimiento de titulación de diferentes poblaciones de anticuerpos en un paciente representa un valioso instrumento de diagnóstico y de pronóstico con el potencial de distinguir entre los sujetos afectados con riesgo de desarrollar complicaciones graves y aquellos con un pronóstico más favorable. En este último grupo, este procedimiento eliminaría la necesidad de administrar un tratamiento en gran medida ineficaz que también se encuentra asociado con reacciones adversas graves, al tiempo que se proporciona una reducción considerable en los costes.

Como los epítopes de E2, así identificados, no se pueden reproducir mediante la síntesis de péptidos sintéticos [5], el procedimiento representa la única vía para la determinación de la cantidad de anticuerpos frente a las distintas partes de la proteína E2, con datos clínicos y epidemiológicos que se correlacionan.

5 La identificación de anticuerpos anti-E2 en el formato Fabs humano con una buena capacidad de neutralización permite su producción a gran escala y su utilización como medicación en el tratamiento anti-VHC, o como agente preventivo de forma tópica para inhibir la transmisión viral a pacientes en riesgo (parejas con estado de VHC discordante, individuos sometidos a exposición profesional, etc.).

10 Los anticuerpos de la invención se pueden utilizar de forma ventajosa para evaluar *in vitro* moléculas candidatas para vacunas anti-VHC, es decir, moléculas capaces de estimular a los anticuerpos neutralizantes pero no a los anticuerpos ineficaces o negativos.

15 La disponibilidad de anticuerpos humanos neutralizantes capaces de reconocer un amplio espectro de virus podría ser crucial en la producción de vacunas artificiales. Los anticuerpos neutralizantes descritos en este documento se pueden utilizar como una cadena de ADN molde para el desarrollo de vacunas (preparadas a partir de péptidos o de anticuerpos anti-idiotípico) capaces de estimular una respuesta de reacción cruzada neutralizante.

20 El objetivo de esta invención es la utilización de un anticuerpo humano, o de sus fragmentos funcionales, caracterizado porque tiene las siguientes secuencias de aminoácidos de las partes variables de las cadenas pesadas (HC, en inglés "heavy chains") y de las cadenas ligeras (LC, en inglés "light chains"):

Cadena pesada (HC) e 137

25 **LLEQSGSEVKPGSSLKVSKTSGGTFSTYTFSWVRQAPGQGLEWMG  
GITPIIGIANYARNFQDRVTITADESTSTVYMEVRRRLRSEDTAVYYCAKTS  
EVTATRGRTFFYSAMDVWGQGT**

30

Cadena ligera (LC) e 137

35 **MAELTQSPLSASVGDRVITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYA  
ASTLQSGVPSRFSGSGSWTEFTLTISRLQPEDFATYYCQHLNTYPWTFG  
QGT**

40 para la preparación de:

- a) un medicamento para el tratamiento anti-VHC o
- b) como agente preventivo en forma tópica para inhibir la transmisión viral a un sujeto en situación de riesgo.

45 Preferentemente el anticuerpo humano, o sus fragmentos funcionales, es el fragmento Fab de anticuerpo monoclonal humano e137 o un anticuerpo monoclonal humano de tamaño completo que contenga al citado fragmento Fab.

50 Otro objetivo de la presente invención es la utilización de un anticuerpo humano o de su fragmento funcional, caracterizado porque tiene las siguientes secuencias de aminoácidos de las partes variables de las cadenas pesadas y de las cadenas ligeras:

Cadena pesada (HC) e 301

55 **LLEQSGSEVKKGSSVRVSCTSGGTLSDYGFNWLQRQAPGQGPEWMG  
GIIPLFRRRTTYGQKFQGRLTITADESTGATYMEISSLRSDDTAVYYCARE  
KVSVLGGKSLHYFEYWGKGT**

60

Cadena ligera (LC) e 301

65 **MAELTQSPLSVSPGERATLSCRASQSVSSRLAWYQQKRGQAPSLLIY  
DTSSRATGVPARFSASGSGTQFTLTSSLQSEDFALEYCQQYNDWPSTF  
GQGT**

para la preparación de:

- a) un medicamento para el tratamiento anti-VHC o
- 5 b) como agente preventivo en forma tópica para inhibir la transmisión viral a un sujeto en situación de riesgo.

Preferentemente el anticuerpo humano, o sus fragmentos funcionales, es el fragmento Fab de anticuerpo monoclonal humano e301 o un anticuerpo monoclonal humano de tamaño completo que contenga al citado fragmento Fab.

10 Preferentemente los anticuerpos humanos de la presente invención son una molécula de IgG1 de tamaño completo.

Un objetivo adicional de la presente invención es una composición para la terapia anti-VHC que comprende, en una cantidad terapéuticamente eficaz, como mínimo uno de los anticuerpos de la presente invención. Preferentemente, la composición se suministra de forma purificada para su utilización por vía parenteral o en otra formulación para su utilización por vía tópica como un gel, crema, pomada, óvulo, con excipientes conocidos por los expertos en la materia.

15 Un objetivo adicional de la presente invención es un procedimiento para la determinación de la presencia de anticuerpos que tienen actividad neutralizante del VHC en un fluido biológico que comprende las etapas de:

- 20 a) marcar los Fabs de anticuerpo monoclonal humano e137 o e301, o un anticuerpo monoclonal humano de tamaño completo que contenga como mínimo uno de dichos fragmentos Fab;
- b) determinar la presencia de anticuerpos en el citado fluido capaces de inhibir la unión del citado Fab de anticuerpo monoclonal humano marcado, o de dicho anticuerpo monoclonal humano de tamaño completo, a la proteína E2 del VHC.

25 La presente invención se describe a continuación en ejemplos experimentales, que no limitan a la propia invención, en referencia a las siguientes figuras:

30 - Figura 1 FIT: BASE TEÓRICA. El Panel A muestra la unión de un Fab-FLAG a sus epítopos sin competidores. Utilizando la misma concentración de Fab presente en (A), la preincubación del antígeno con el suero del paciente permite el análisis cuantitativo de los anticuerpos dirigidos contra el epítopo reconocido mediante el Fab presente en el suero. En los paneles B y C, los anticuerpos unidos, como compiten con Fab, disminuyen de forma proporcional la cantidad unida en comparación con el panel A. En los paneles D y E, la presencia de anticuerpos que no se dirigen contra el epítopo específico no influye en grado mínimo la unión de Fab.

35 - Figura 2 A y B: Inhibición de la unión entre e8-FLAG (A) y e509-FLAG (B) a VHC/E2 mediante sueros que contienen concentraciones conocidas de e8-IgG1 y de e509-IgG1 (anticuerpos completos dirigidos contra los epítopos reconocidos mediante el Fab). Es evidente que la inhibición de la unión de Fab se puede observar solo en presencia del anticuerpo completo que tiene la misma especificidad y que eso depende de la concentración de anticuerpo.

40 - Figuras 3A, B y C: Inhibición de la infección de pseudotipos VSV/VHC y VSV/G por medio de Fabs recombinantes humanos purificados de anti-VHC/E2 a diferentes concentraciones. Las células HepG2 infectadas con pseudotipos tratados con Fab se incubaron durante 16 h y mediante microscopía de fluorescencia se determinó el número de células que expresan la proteína fluorescente de color verde. Los datos se presentan como % de la infección detectada en los pocillos de control (sin adición de Fabs). Los resultados mostrados son el promedio de tres ensayos independientes llevados a cabo por duplicado.

45 - Figura 4: Mapa bidimensional similar a la superficie de los epítopos de células B humanas presentes en la superficie de VHC/E2 tal como se reconocen por los anticuerpos monoclonales utilizados en este estudio. El solapamiento de los círculos indica inhibición recíproca. Los Fabs dotados con el pseudotipo VSV/VHC con actividad neutralizante se encuentran subrayados. La región supuesta que media en la interacción de VHC/E2 con la diana celular se indica mediante la línea de puntos. La región supuesta reconocida por los anticuerpos neutralizantes se indica mediante un círculo sólido de color negro. Debido a las modificaciones que se pueden inducir mediante las interacciones antígeno-anticuerpo, este diagrama no se corresponde con el mapa físico real.

50 Ejemplo 1

60 *Materiales y procedimientos*

#### *Producción de Fabs anti-VHC y de IgG1 de tamaño completo*

65 La generación, purificación y caracterización de los Fabs anti-VHC/E2 se ha descrito en otro documento [5]. Los FLAG-Fabs (Fabs marcados con un epítopo FLAG fusionado en el grupo carboxi terminal del fragmento de cadena pesada con un puente pentapeptídico) se construyeron y se purificaron tal como se describió en otro documento [6]. La validación y estandarización del ensayo se llevaron a cabo mediante la utilización de genes que codifican Fab para

# ES 2 314 179 T3

construir anticuerpos monoclonales humanos de tamaño completo (HuMabs, por sus siglas en inglés), que se insertaron en un vector eucariótico adecuado para la producción posterior en células transfectadas [9]. Los HuMabs presentes en el sobrenadante del cultivo se purificaron mediante inmunoafluoración según se describe en [10] y su pureza se controló mediante PAGE. La cantidad de anticuerpo humano se evaluó mediante un inmunoensayo de tipo sándwich. Todos los anticuerpos y Fabs se almacenaron a -70°C hasta su utilización.

## 5 *Sueros y especímenes*

10 Los sueros obtenidos a partir de donantes sanos y de pacientes positivos para el VHC se analizaron utilizando kits comerciales de diagnóstico (Ortho, Raritan, NJ) siguiendo procedimientos estándar. Para la preparación de especímenes simulados con cantidades conocidas de anticuerpos dirigidos contra un epítopo dado, a los sueros negativos para el VHC se les añadieron HuMabs purificados concentrados en PBS y se les trató exactamente igual que a los sueros positivos y negativos.

15

## *Diseño de un ensayo para la determinación del título de inhibición de Fab (FIT (en inglés, "Fab Inhibition Titer"))*

20 El propósito de este ensayo es evaluar la capacidad de los sueros para inhibir la unión de un Fab marcado a su epítopo, obteniendo de este modo una medida indirecta de la cantidad de unión al epítopo de los anticuerpos en los sueros (figura 1).

25 Los FLAG-Fabs se purificaron [10] y se ensayaron por medio de un procedimiento ELISA específico para FLAG-Fab para determinar la concentración correcta que se debe utilizar en los experimentos de inhibición. En síntesis, a los preparados de FLAG-Fab de concentración conocida se les determinó el título mediante el procedimiento ELISA [11], en el que placas recubiertas de antígeno se bloquearon durante 1 h a 37°C con PBS/1% BSA. Después de retirar la disolución de bloqueo, se añadieron a los pocillos 50 µl de diluciones progresivas de FLAG-Fab preparadas en PBS/BSA 1% y se incubaron durante 2 h a 37°C. Las placas se lavaron 10 veces con PBS/0,05% Tween-20 en un lavador de placas automático (DiaSorin, Saluggia, Italia) antes de añadir 50 µl de una disolución de 10 µg/ml de anticuerpo monoclonal de ratón anti-FLAG M2 (Sigma, St. Louis, MO; 10 µg/ml en PBS) en PBS/BSA 1%. Después de 1 h de incubación a 37°C, los pocillos se lavaron 10 veces con PBS/Tween-20 tal como se indicó anteriormente y la unión de anticuerpos monoclonales de ratón se reveló con IgG antiratón de cabra conjugada con peroxidasa de rábano (Pierce; 1:8.000 en PBS). Se añadió el sustrato y en las placas se leyó la OD<sub>450</sub> ("densidad óptica a 450 nm") en un lector de placas automático después de 30 min de incubación a temperatura ambiente en la oscuridad. Todos los ensayos se llevaron a cabo, como mínimo, por duplicado. Siempre se incluyó un control negativo de antígeno (BSA) y la lectura de OD se restó como fondo.

30 Para la determinación del título de inhibición de Fab (FIT) de los sueros, para los experimentos adicionales de inhibición de Fab mediante el procedimiento ELISA se utilizó una concentración de FLAG-Fabs purificados que producía, en condiciones estándar, una lectura de OD<sub>450</sub> igual al 50% de la lectura máxima. Para estos experimentos, las placas se recubrieron y se bloquearon tal como se describió anteriormente. Se añadieron diluciones de suero 1:4 progresivas en PBS/BSA 1% en la cantidad de 50 µl por pocillo ELISA. Después de 2 h de incubación a 37°C, se añadió FLAG-Fab purificado directamente a las diluciones de suero hasta alcanzar la concentración final deseada. Las placas se incubaron durante 30 min adicionales y a continuación se procesaron tal como se describió anteriormente para FLAG-Fab según el procedimiento ELISA. Se incluye una muestra de control positivo, que contiene un exceso de 20:1 de Fab purificado sin marcar, que se corresponde con el 100% de inhibición. También se incluye una muestra de control negativa, que contiene un exceso de un control de Fab sin correlacionar [12] y que se corresponde con el 0% de inhibición. Los resultados finales se determinan como % de inhibición con la fórmula: proporción porcentual de inhibición = 100 x (OD<sub>450</sub> de la sonda FLAG-Fab sola - OD<sub>450</sub> de la sonda FLAG-Fab con suero competidor)/OD<sub>450</sub> de la sonda FLAG-Fab sola.

35 50 La dilución de suero más alta que proporciona más de un 70% de inhibición de la unión de FLAG-Fab se considera como el título de inhibición de Fab (FIT) para ese epítopo y para ese suero.

55

## *Resultados*

La concentración de FLAG-Fab adecuada para utilizarse en el ensayo se determina para cada FLAG-Fab y varía entre 10 µg/ml (e8, e20, e137, e301, e509) y 0,1 µg/ml (e10-B). Las secuencias de aminoácidos de las cadenas ligeras y pesadas de los distintos anticuerpos se indican a continuación:

65

ES 2 314 179 T3

e8 HC

5 LLEQSGAEVKMPGATVKVSCQSSRYTFTSYGIGWVRQAPGQGLEWMG  
WISGYTHETKYAQSFQGRVTMTAETSTGTAYMELRSLRSDDTATYYCA  
RDGGGRVWVPPTHLRAFDWGQGT

10

e8 LC

15 MAELTQSPGTLSLSPGERATLSCRASHRVNNNFLAWYQQKPGQAPRLLI  
SGASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPDDFAVYYCQQYGDSPLY  
SFGQGT

20

e10 HC

25 LLESGPLVKPSQTLSLTCTVSGVISYGGRGVSYWGWRQSPGKGLE  
WIGHIYYFGDTFYNPSLNNRATISIDSSKNQFSKLKSVTASDTALYFCAR  
STLQYFDWLLTREAAYSIDFWGQGI

30

e10 LC

35 MAELTQSPSFLSASVGDRVITCRASQGVILLAWYQQKPGKPPKALIYA  
ASSLQSGVPSRFSGSGSDTDFLTISLQPEDSATYYCQLNTYPWTFG  
QGT

40

e20 HC

45 LLEQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGDHYGINWVRQAPGQGLEWMGGIIP  
VFGTTTYAQKFQGRATITADDSTGTAFELTRLTFDDTAVYFCATPHQLH  
VLRGGKALSPWDYWGQGT

50

e20 LC

55 MAELTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKRGQAPSLLIY  
GTSTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQYNDWPSTF  
GQGT

60

65

e137 HC

LLEQSGSEVKVPGSSLKVSCKTSGGTSTYTFSWVRQAPGQGLEWMG  
GITPIIGIANYARNFQDRVTITADESTSTVYMEVRRRLRSEDTAVYYCAKTS  
EVTATRGRTFFYSAMDWWGQGT

10

e137 LC

15

MAELTQSPSFLSASVGDRVITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYA  
ASTLQSGVPSRFSGSGSWTEFTLTISRLQPEDFATYYCQHLNTYPWTFG  
QGT

25

e301 HC

LLEQSGSEVKKPGSSVRVSCTTSGTLSYGFNWLQRQAPGQGPEWMG  
GIIPPLFRRTTYGQKFQGRLTITADESTGATYMELOSSLRSDDTAVYYCARE  
KVSVLGGKSLHYFEYWGKGT

35

e301 LC

MAELTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSRLAWYQQKRGQAPSLLIY  
DTSSRATGVPARFSASGSGTQFTLTISSLQSEDFALEYCQQYNDWPSTF  
GQGT

45

e509 HC

LLEESGAEVKKPGSSVKVSCKTSGDTFRYGITWVRQAPGQGLEWMGQI  
MPTFATATYAQRFQGRVTISADESTSTAYLEVRSLRSEDTAVYYCATPR  
QVTILRGPKALSPWDYWGQGT

55

e509 LC

MAELTQSPATLSASPGERASLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIS  
GASTRATGVPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWPPH  
FGQGT

65

# ES 2 314 179 T3

Las secuencias de nucleótidos que codifican los fragmentos Fab enumerados anteriormente se indican del modo siguiente:

5           e8 HC  
CTGCTCGAGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGATGCCTGGGCCACAG  
10          TGAAGGTCTCCTGCCAGTCTTCCCGTTACACCTTCACCAGTTACGGT  
ATCGGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAGGGGCTTGAGTGGATG  
15          GGATGGATCAGCGGATACACCCATGAGACAAAATATGCACAGAGTT  
CCAGGGCAGAGTCACCATGACCGCAGAGACATCCACGGGCACAGCG  
20          TATATGGAGTTGAGGAGCCTGCGGTCTGACGACACGGCCACATATTA  
CTGCGCGAGAGATGGAGGAGGGAGGGTGGTAGTGCCGCCTACTCAT  
CTACGTGCTTTGATGTCTGGGTCAAGGGACG  
  
25          e8 LC  
ATGGCCGAGCTACCCAGTCTCCAGGCACCCCTGTCTTGTCTCCAGG  
30          GGAAAGAGCCACCCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCACAGAGTCAATAACA  
ACTTCTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTC  
35          CTCATCTCTGGTGCATCTACCAGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTT  
CAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGAC  
TGGAGCCTGATGATTTCAGTTATTATTGTCAGCAGTATGGTACT  
40          CACCTCTTATTCTTGGCCAGGGGACC  
  
45          e10 HC  
CTGCTCGAGTCTGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCGT  
CCCTCACCTGCACCGTCTCCGGTGTCTCCATCAGTTACGGTGGTCGT  
50          GGCGTTCTACTGGGTTGGGTCCGCCAGTCCCCAGGGAAAGGGCC  
TGGAGTGGATTGGCCACATCTACTACTTGGAGACACCTTCTACAAC  
CCGTCCCTCAACAATCGAGCTACCATATCAATAGACTCATCCAAAAAC  
55          CAGTTCTCCCTCAAGCTCAAGTCTGTGACTGCCTCAGACACGGCCCT  
GTATTCTGTGCCAGGAGCACCCCTACAGTATTGACTGGTTATTGAC  
60          ACGGGAGGCTGCCTACTCCATTGACTTCTGGGCCAGGGAAATA

ES 2 314 179 T3

e10 LC

ATGGCCGAGCTCACCCAGTCTCCATCCTCCTGTCTGCATCTGTTGG  
5 AGACCGAGTCACCACATCACTGCCGGGCCAGTCAGGGCGTCACCATT  
CTTTAGCCTGGTATCAGCAAAGCCAGGGAAACCCCCCTAAGGCCCT  
10 GATTATGCTGCATCGTCTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCA  
GCGGCAGTGGTTCTGACACAGATTCACTCTCACAATCAGCAGCCTA  
15 CAGCCTGAAGATTCTGCAACTTATTACTGTCAACAACTTAACACTTAC  
CCGTGGACGTTCGGCCAGGGGACC

e20 HC

CTGCTCGAGCAGTCAGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGTCCTCGG  
TGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGACCACATGGTATCAACTGG  
25 GTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTGGAGTGGATGGCGGTATCA  
TCCCTGTCTTGGACAACACTACCTACGCACAGAACAGTCCAGGGCAGA  
30 GCCACCATTACCGCGACGACTCCACGGGACGGCCTTTGGAGC  
TGACCAGACTGACATTGACGACACGGCGTCTATTCTGTGCGACA

35 CCTCACCAACTGCATGTCCTCCGGGCGGTAAAGCCCTCTCCCCCT  
40 GGGACTACTGGGCCAGGGAAC

e20 LC

45 ATGGCCGAGCTCACCCAGTCTCCAGCCACCCCTGTCTGTCTCCAGG  
GGAAAGAGCCACCCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCAGT  
50 AACTTAGCCTGGTACCAGCAGAACGTGGCCAGGCTCCAGTCTCCT  
CATCTACGGAACATCTACCAGGGCCACTGGTATCCCAGCCAGGTTCA  
GTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCACAGCAGCCT  
55 GCAGTCTGAAGATTTCAGTTATTACTGTCAAGCAGTATAATGATTG  
GCCCTCCACCTCGGCCAAGGGACA

60

65

e137 HC

5 CTGCTCGAGCAGTCTGGTCTGAAGTAAAAGTGCCCGGGCCTCGTT  
 GAAGGTCTCCTGCAAGACTTCTGGAGGCACCTCAGCACCTATACTT  
 10 TCAGCTGGTGCACAGGCCCCTGGACAGGGACTTGAGTGGATGGG  
 GGGGATCACCCCTATCATTGGCATCGCAAACATACGCACGGAACCTCC  
 AGGACAGAGTCACCATCACCGCGAACGAAATCCACGAGCACGGTCTA  
 15 CATGGAGGTGAGGAGGCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTATATTATT  
 GTGCGAAAACCTCGGAAGTAACAGCCACTAGAGGGCGGACTTCTTC  
 TACTCCGCTATGGACGTCTGGGTCAAGGGACC

20

e137 LC

25 ATGGCCGAGCTACCCAGTCTCCATCCTCCTGTCATCTGTAGG  
 AGACAGAGTCACCATCACTGCCGGGCCAGTCAGGGCATAAGCAATT  
 30 ATTTAGCCTGGTATCAGAAAAACCAAGGGAAAGCCCCTAACGCTCCTG  
 ATCTATGCTGCATCCACTTGCAAAGTGGGTCCCATCGAGGTTAG  
 CGGCAGTGGATCTGGACAGAATTCACTCTCACAAATCAGCCGCCTCC  
 35 AGCCTGAAGATTTGCAACTTATTACTGTCAACACCTTAATACTTACCC  
 GTGGACGTTGGCCAAGGGACC

40

e301 HC

45 CTGCTCGAGCAGTCTGGTCTGAGGTGAAGAAACCTGGGTCTCGG  
 TGAGGGTCTCGTGCACGACTTCTGGAGGCACCTTGAGCGACTATGGT  
 TTCAACTGGTTACGACAGGCCCCTGGACAAGGGCCTGAGTGGATGG  
 GAGGGATCATCCCTTGTTCGAAGAACACCTACGGACAGAAGTTC

50

55 CAGGGCAGACTCACCATTACCGCGGACGAGTCCACGGGCGAACCT  
 ACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTCTATTAC  
 TGTGCGAGAGAGAAAGTTCGGTCTCACAGGCGGAAAGTCACTCCA  
 60 TTACTTTGAATATTGGGGCAAGGGAAC

65

e301 LC

ATGGCCGAGCTCACGCAGTCTCCAGCCACCCCTGTCTGTGTCTCCAG  
 5 GGGAAAGAGCCACCCCTCTCCTGCAGGCCAGTCAGAGTGTAGCAG  
 CAGGTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACGTGCCAGGCTCCCAGTCTC  
 10 CTCATCTATGACACATCTCCAGGGCCACTGGTGTCCCAGCCAGGTT  
 CAGTGCCAGTGGGTCTGGGACGCAGTTCACTCTCACCATCAGCAGC  
 CTGCAGTCTGAAGATTTGCACTTATTACTGTCAAGCAGTATAATGATT  
 15 GGCCCTCCACCTCGGCCAAGGGACA

e509 HC

20 CTGCTCGAGGAGTCTGGGCTGAGGTGAAGAACGCCAGGGTCCTCGG  
 TGAAGGTCTCCTGCAAGACTTCTGGAGACACCTCAGATATGGTATC  
 25 ACGTGGGTGCGACAGGCCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAC  
 AGATCATGCCTACGTTGCGACAGCAACCTACGCACAGAGGTTCCAG  
 30 GGCAGAGTCACGATTCCCGCGAACGAATCCACCGAGCACAGCCTACTT  
 GGAGGTGCGCAGCCTGAGATCTGAAGACACGGCCGTCTATTACTGT  
 GCGACACCTCGCCAAGTTACTATACTTCGGGACCTAAAGCCCTCTC  
 35 CCCTTGGGACTACTGGGCCAGGGAAACC

e509 LC

40 ATGGCCGAGCTACCCAGTCTCCAGCCACCCCTGTCTGCGTCTCCAG  
 GGGAAAGAGCCTCCCTCTCCTGCAGGCCAGTCAGAGTGTAGTAG  
 45 CAACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTC  
 CTCATCTCTGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGTGTCCCAGGCTCAGGT  
 50 TCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAGTAGC  
 CTGCAGTCTGAAGATTTGCACTTATTACTGTCAAGCAGTATAATAAC  
 TGGCCTCCCCACTTGGCCAGGGGACC

55 Mediante el procedimiento ELISA, el FLAG-Fab en moléculas de Fab purificadas marcadas produce resultados muy específicos y reproducibles. La determinación del FIT se lleva a cabo en 10 sueros negativos para VHC; el título es > 1:20 de forma consistente, límite superior de detección de nuestro ensayo, lo que indica que no tiene lugar inhibición en ausencia de anticuerpos específicos anti-VHC.

60 Para demostrar que el FIT mide de forma eficaz los anticuerpos dirigidos contra los epítopos reconocidos por nuestros FLAG-Fabs, se lleva a cabo el mismo análisis en especímenes simulados preparados mediante la mezcla de sueros negativos con anticuerpos monoclonales humanos de especificidad dada, con lo que se obtenían muestras falsas que contenían cantidades conocidas de IgG dirigida contra los epítopos de E2 del VHC definidos por nuestros Fabs. Los resultados (figuras 2A y B) muestran una buena correlación entre el FIT y la cantidad de anticuerpo, lo que indica que el FIT puede proporcionar información fiable sobre la cantidad de anticuerpos específicos de epítopo en el suero de un paciente.

# ES 2 314 179 T3

Finalmente, el FIT siempre es positivo en los sueros positivos para el VHC, con valores que abarcan un amplio intervalo de diluciones. El FIT es muy diverso para los diferentes Fabs presentes en la misma muestra de suero, con una considerable heterogeneidad entre pacientes.

## 5 Ejemplo 2

### *Materiales y procedimientos*

#### *Fragmentos de anticuerpos humanos*

10 Los fragmentos de anticuerpo recombinante humano de este ejemplo se encuentran completamente descritos en Bugli y otros (2001) [7] y se corresponden con los utilizados en el ejemplo 1. En síntesis, los genes que codifican los Fabs se obtuvieron a partir de una biblioteca combinatoria de expresión en fago que contiene el repertorio IgG1/kappa de una mujer de 58 años de edad con hepatitis crónica con presencia persistente en la sangre del ARN del VHC de 15 genotipo 1 b. Los genes seleccionados se insertan en un vector de expresión bacteriano apropiado [13] y las células transformadas se utilizan a continuación como fuente de Fabs recombinantes, que se producen y se purifican tal como se describe en [14]. La neutralización de la unión de E2 (NOB (“Neutralization of E2 binding”)) a la actividad de la célula [5, 15] y las interacciones recíprocas [7] de estas moléculas se han descrito. La presencia de anticuerpos similares en el suero de pacientes infectados con el VHC se determina mediante el procedimiento de ELISA por 20 inhibición [7].

#### *Ensayos de pseudotipos y de neutralización*

25 Los pseudotipos que se han utilizado aquí han sido cuidadosamente caracterizados y descritos en Matsuura y otros, 2001 [8]. En síntesis, el pseudotipo VSVΔG\*/VHCE1-E2 (VSV/VHC) se compone del Virus de la Estomatitis Vesicular, en el que la proteína G de la envoltura se sustituye con glucoproteínas químéricas de envoltura de VHC E1 y E2 constituidas por los ectodominios de las proteínas E1 y E2 de tipo 1 b del clon de ADNc del VHC (NIH-J1) combinado con las secuencias de señal con N-terminal, con dominios transmembranales y citoplasmáticos de proteína G de VSV [8]. La construcción de plásmidos [16] y de vectores de expresión eucariota se ha descrito [8, 17]. El 30 VSV/VHC se prepara mediante la infección de células de CHO que expresan de forma constitutiva ADNc químérico de E1 y E2 con un VSV recombinante en el que la región que codifica la proteína G se ha sustituido por el gen de la proteína fluorescente de color verde (GFP) [18]. El pseudotipo VSVΔG\*/VHCE1-E2 (VSV/G) utilizado como control (y para producir el pseudotipo VSV/VHC), se produce mediante la infección con VSVΔG\* de una línea celular que expresa de forma temporal la proteína G. El ensayo de neutralización se lleva a cabo tal como se describe en [8]. Las 35 diluciones de Fabs recombinantes humanos purificados se incuban con  $2,4 \times 10^3$  Unidades Infectivas (UI (IU, por sus siglas en inglés)) del pseudotipo VSV/VHC o del VSV/G durante 30 min a 37°C y se inoculan en células HepG2 ( $4 \times 10^4$  células) preparadas en una placa de 96 pocillos. Después de la adsorción durante 60 min a 37°C, las células se lavan 3 veces con DMEM que contiene 10% FBS y se incuban a 37°C durante 16 h.

40 Las UI del virus se determinan mediante el recuento del número de células que expresan GFP por medio de microscopía de fluorescencia. Los datos se presentan como proporción porcentual de inhibición en comparación con los pocillos de control en los que no se añadió anticuerpo. Los datos son el promedio de tres experimentos llevados a cabo por duplicado.

## 45 Resultados

### *Generación del panel del anticuerpo monoclonal humano anti-VHC/E2 y caracterización de la secuencia*

50 El panel de los fragmentos Fab de anticuerpo monoclonal humano representa el repertorio inmunológico de anti-VHC/E2 de un paciente con una infección persistente con VHC de genotipo 1b [5, 19]. Los fragmentos de anticuerpo, seleccionados con VHC/E2 recombinante purificado de genotipo 1a (cepa H) [20] expresados en células de CHO, se han caracterizado por completo y se corresponden a clones presentes en el suero de pacientes infectados de forma crónica [7] con una afinidad equivalente compartida por el VHC/E2. Cada uno de los cinco anticuerpos representa una de las cinco familias en las que se agrupa el repertorio del anticuerpo anti-E2 completo de este paciente. Los Fabs que pertenecen a la misma familia comparten una actividad biológica similar y tienen fuertes homologías en las secuencias de ADN [5]. Cada uno de los cinco Fabs reconoce un epítopo distinto en la superficie de E2 [7]. Las diferencias de las secuencias de la estirpe bacteriana relativa son típicas de maduración de afinidad conducida por antígenos (Tablas 1a y 1 b), lo que sugiere una exposición prolongada al antígeno.

60 Tablas 1 A, B. Estirpes bacterianas y mutaciones de los genes V en regiones variables de anticuerpos monoclonales humanos anti-VHCE2.

65 Las secuencias se determinan tal como se describe en Burioni y otros, 1998 [5] y se alinean con secuencias de la estirpe en la base de datos de IMGT [21]. El porcentaje de mutaciones de nucleótidos y aminoácidos se calcula de acuerdo con el procedimiento de alineamiento de Kabat y Wu [22], que tiene en cuenta la región estructural (FR, en inglés “framework region”) 1, FR 2 y FR 3 para las cadenas pesadas y ligeras, la región determinante de la complementariedad (CDR, en inglés “complementarity determining region”) 1 y CDR 2 para las cadenas pesadas, CDR 1, CDR 2 y CDR 3 para las cadenas ligeras.

# ES 2 314 179 T3

TABLA 1a  
*Cadenas pesadas*

| Anticuerpo | Gen V  | % de nucleótidos mutados |      | % de aminoácidos mutados |      |
|------------|--------|--------------------------|------|--------------------------|------|
|            |        | FRs                      | CDRs | FRs                      | CDRs |
| e8         | VH1-18 | 9,5                      | 22,2 | 14,9                     | 33,3 |
| e20        | VH1-69 | 9,4                      | 16,9 | 19                       | 38   |
| e137       | VH1-69 | 11,5                     | 15,3 | 14                       | 41,7 |
| e301       | VH1-69 | 8,9                      | 19,4 | 15,6                     | 45,8 |
| e 509      | VH1-69 | 5,2                      | 15,9 | 10,9                     | 33,3 |

TABLA 1b  
*Cadenas ligeras*

| Anticuerpo | Gen V   | % de nucleótidos mutados |      | % de aminoácidos mutados |      |
|------------|---------|--------------------------|------|--------------------------|------|
|            |         | FRs                      | CDRs | FRs                      | CDRs |
| e 8        | KV 3-20 | 2,7                      | 16   | 2,6                      | 33,3 |
| e 20       | KV 1- 9 | 4,3                      | 7,7  | 9,7                      | 22,2 |
| e 137      | KV 1- 8 | 2,2                      | 9    | 3,2                      | 15,4 |
| e 301      | KV 3-15 | 3,8                      | 14,3 | 9,7                      | 23   |
| e 509      | KV 3-15 | 3,2                      | 1,3  | 6,5                      | 0    |

La actividad de neutralización de la unión (NOB, en inglés "neutralizing of binding") de cada Fab también se determinó [5], encontrándose que algunos clones (e137 y e8) no eran capaces de inhibir la unión de VHC/E2 a las células y otros inhibían la unión de VHC/E2 incluso con concentraciones muy bajas (véase a continuación).

#### *Neutralización del virus pseudotipo bv mediante Fabs recombinantes humanos*

Dos de los Fabs, e8 y e20, que reconocen distintos epítopos en la superficie de VHC/E2 [7] no neutralizan la infección del pseudotipo del VSV/VHC incluso con concentraciones elevadas (80 µg/ml). Uno de estos dos Fabs, e20, tiene una fuerte actividad NOB [5], lo que confirma que incluso los anticuerpos que inhiben la unión de E2 pueden fracasar en la prevención de la infección viral.

Otros dos Fabs, e137 y e301, neutralizan de forma eficaz el VSV/VHC a una concentración de 10 µg/ml, mientras que los pseudotipos VSV que llevan la proteína G de envoltura de VSV (pseudotipos VSV/G) no se ven afectados (figuras 3a y 3b). Estos datos son congruentes con resultados anteriores que indicaban que estos dos clones compiten por la misma región E2, probablemente son reconocidos por los anticuerpos humanos dotados con actividad neutralizante, tal como se indica en un mapa bidimensional de la superficie de los epítopos humanos en el VHC/E2 (figura 4).

En la actualidad el Fab 509 es el anticuerpo disponible más fuerte en términos de actividad NOB y es capaz de inhibir la unión entre E2 y la diana celular a concentraciones muy bajas (Tabla 2). La incubación de los pseudotipos VSV/VHC con este Fab aumenta la entrada del virus en el interior de las células de hepatoma hasta una concentración de 1 µg/ml. No se demuestra un aumento en la infectividad cuando se utilizan los pseudotipos VSV/G, excluyendo así la posibilidad de que una interacción no específica de este Fab con la membrana celular promueva la entrada viral hacia el interior de la célula (figura 3C).

TABLA 2  
*Características de los anticuerpos anti-VHC/E2*

|    |   |   |                                |
|----|---|---|--------------------------------|
| 5  | La actividad NOB se calcula como la concentración (en µg/ml) que consigue el 50% de neutralización de la unión de un preparado purificado de VHC/E2 a dianas celulares. |   |                                |
| 10 | Clon Fab  | Concentración que causa el 50% de NOB (µg/ml) | Efecto en la infección VSV/VHC |
| 15 |   | e8  | > 40 (ninguno)                 |
| 20 |   | e20   | 3 (alto)                       |
| 25 |   | e137  | 40 (bajo)                      |
| 30 |   | e301  | 3 (alto)                       |
| 35 |   | e509  | < 0,035 (el más alto)          |
| 40 | mejora  |   |                                |

Un anticuerpo de control [23] no ejerce ninguna influencia en el sistema de pseudotipo, ya que fracasa en la neutralización de ambos pseudotipos VSV/VHC y VSV/G. El pseudotipo VSV/G se neutraliza correctamente mediante diluciones de hasta 1:1000 de un antisero anti-VSV utilizado como control neutralizante en estos experimentos [8], lo que no tiene ninguna influencia en el VSV/VHC. La existencia de una concentración aumentada de los anticuerpos políclonales y monoclonales anti-E1 y anti-E2 en varios huéspedes no muestra un efecto neutralizante en los pseudotipos VSV/VHC.

La actividad neutralizante de Fabs monovalentes muestra que se puede inhibir la entrada del VHC sin necesidad de agregación o de reticulación del virión; además, parece poco probable que el bloqueo de la interacción entre el virus y sus dianas celulares sea un factor clave en la neutralización del VHC. Estos datos pueden explicar a nivel molecular la falta de correlación entre la actividad NOB en el suero y la protección de la enfermedad.

Mediante anticuerpos anti-VHC se proporciona algún grado de protección cruzada, ya que los anticuerpos anti-E2 seleccionados con E2 de genotipo 1a son capaces de neutralizar un pseudotipo que lleva E2 de genotipo 1b.

Los resultados muestran que el Fab 509 es capaz de potenciar la infectividad del virus de pseudotipo VSV/VHC, aunque no se evidenció ningún efecto en la construcción VSV/G. Una posible explicación de la capacidad del e509 para promover la entrada viral se puede encontrar en la observación de que este anticuerpo se une de forma específica y muy eficiente a la región de E2 que se une a la CD81, una estructura celular implicada en la unión viral a la célula [24]. La unión del e509 a E2 podría imitar la unión de E2 a una de sus dianas celulares y promover una modificación de la conformación de E2 similar a la que se induce por medio de CD81. E2 está presente en, como mínimo, dos estados conformacionales y la unión del anticuerpo a esta proteína puede modificar el estado estérico de la proteína mediante la modulación de la actividad NOB de Fabs humanos sin competición por la unión [6]. Por lo tanto, el Fab 509 parece ser una herramienta clave para el estudio de las interacciones entre el VHC y la superficie celular y se podría utilizar en modelos *in vitro* para la evaluación de moléculas para vacunas.

50

## Bibliografía

1. **Hoofnagle**, Hepatitis C: the clinical spectrum of disease. *Hepatology*, 1997. 26 (3 Suppl 1): p. 15S-20S.
2. **Cerny and Chisari**, Pathogenesis of chronic hepatitis C: immunological features of hepatic injury and viral persistence. *Hepatology*, 1999. 30 (3): p. 595-601.
3. **Fried and Hoofnagle**, Therapy of hepatitis C. *Semin Liver Dis*, 1995. 15 (1): p. 82-91.
4. **Hoofnagle and di Bisceglie**, The treatment of chronic viral hepatitis. *N Engl J Med*, 1997. 336 (5): p. 347-56.
5. **Burioni, et al.**, Dissection of human humoral immune response against hepatitis C virus E2 glycoprotein by repertoire cloning and generation of recombinant Fab fragments. *Hepatology*, 1998. 28 (3): p. 810-4.
6. **Burioni, et al.**, Non-neutralizing human antibody fragments against Hepatitis C Virus E2 Glycoprotein Modulate Neutralization of Binding Activity of Human Recombinant Fabs. *Virology*, 2001. 288: p. 29-35.

# ES 2 314 179 T3

7. **Bugli**, et al., Mapping B cell epitopes of Hepatitis C Virus E2 glycoprotein using human monoclonal antibodies from phage display libraries. *J Virol*, 2001. 75 (20): p. 9986-9990.
8. **Matsuura**, et al., Characterization of Pseudotype VSV possessing HCV envelope proteins. *Virology*, 2001. 286 (2): p. 263-75.
9. **Bender**, et al., Recombinant human antibodies: linkage of an Fab fragment from a combinatorial library to an Fc fragment for expression in mammalian cell culture. *Hum Antibodies Hybridomas*, 1993. 4 (2): p. 74-9.
10. **Barbas**, et al., Human monoclonal Fab fragments derived from a combinatorial library bind to respiratory syncytial virus F glycoprotein and neutralize infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. 89 (21): p. 10164-8.
11. **Williamson**, et al., Human monoclonal antibodies against a plethora of viral pathogens from single combinatorial libraries [published erratum appears in Proc Natl Acad Sci U S A 1994 Feb 1; 91 (3): 1193]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. 90 (9): p. 4141-5.
12. **Burioni**, et al., Recombinant human Fab to glycoprotein D neutralizes infectivity and prevents cell-to-cell transmission of herpes simplex viruses 1 and 2 *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91 (1): p. 355-9.
20. **Burioni**, et al., A vector for the expression of recombinant monoclonal Fab fragments in bacteria. *J Immunol Methods*, 1998. 217 (1-2): p. 195-9.
25. **Barbas**, et al., Recombinant human Fab fragments neutralize human type 1 immunodeficiency virus *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. 89 (19): p. 9339-43.
25. **Rosa**, et al., A quantitative test to estimate neutralizing antibodies to the hepatitis C virus: cytofluorimetric assessment of envelope glycoprotein 2 binding to target cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. 93 (5): p. 1759-63.
30. **Takikawa**, et al., Cell fusion activity of hepatitis C virus envelope proteins. *J Virol*, 2000. 74 (11): p. 5066-74.
30. **Ohashi**, et al., Ligand-induced activation of chimeric receptors between the erythropoietin receptor and receptor tyrosine kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91 (1): p. 158-62.
35. **Takada**, et al., A system for functional analysis of Ebola virus glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94 (26): p. 14764-9.
35. **Plaisant**, et al., Human monoclonal recombinant Fabs specific for HCV antigens obtained by repertoire cloning in phage display combinatorial vectors. *Res Virol*, 1997. 148 (2): p. 165-9.
40. **Lesniewski**, et al., Antibody to hepatitis C virus second envelope (HCV-E2) glycoprotein: a new marker of HCV infection closely associated with viremia. *J Med Virol*, 1995. 45 (4): p. 415-22.
40. **Lefranc**, et al., IMGT, the international ImMunoGeneTics database. *Nucleic Acids Res*, 1999. 27 (1): p. 209-12.
45. **Kabat**, Sequences of Proteins of Immunological Interest. 5th ed. 1991, Bethesda, MD: U. S. Department of Health and Human Services.
50. **Burioni**, et al., A new subtraction technique for molecular cloning of rare antiviral antibody specificities from phage display libraries *Res Virol*, 1998. 149 (5): p. 327-30.
50. **Pileri**, et al., Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science*, 1998. 282 (5390): p. 938-41.

55

60

65

**REIVINDICACIONES**

1. Utilización de un anticuerpo humano o de su fragmento funcional, **caracterizado** porque tiene las siguientes secuencias de partes variables de la cadena pesada y de la cadena ligera:

e 137 cadena pesada (HC)

LLEQSGSEVKVPGSSLKVSCCKTSGGTFSYTFSWVRQAPGQGLEWMG  
GITPIIGIANYARNFQDRVTITADESTSTVYMEVRRRLRSEDТАVYYCAKTS  
EVTATRGRTFFYSAMDVWGQGT

e 137 cadena ligera (LC)

MAELTQSPLSASVGDRVITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYA  
ASTLQSGVPSRFSGSGSWTEFTLTISRLQPEDFATYYCQHLNTYPWTFG  
QGT,

para la preparación de:

- a) un medicamento para el tratamiento anti-VHC; o
- b) como agente preventivo en forma tópica para inhibir la transmisión viral a un sujeto en situación de riesgo.

2. Utilización, según la reivindicación 1, en la que el citado anticuerpo o su fragmento es el fragmento Fab e137 de anticuerpo monoclonal humano o un anticuerpo monoclonal humano de tamaño completo que contiene al citado fragmento Fab.

3. Utilización de un anticuerpo humano o de su fragmento funcional, **caracterizado** porque tiene las siguientes secuencias de partes variables de la cadena pesada y de la cadena ligera:

e 301 cadena pesada (HC)

LLEQSGSEVKKPGSSVRVSCTTSGGTLSDYGFNWLRQAPGQGPEWMG  
GIIPFLRRRTYGQKFQGRLTITADESTGATYMELOSSLRSDDTAVYYCARE  
KVSVLTGGKSLHYFEYWGKGT

e 301 cadena ligera (LC)

MAELTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSRLAWYQQKRGQAPSLLIY  
DTSSRATGVPARFSASGSGTQFTLTISLQSEDFALYYCQQYNDWPSTF  
GQGT,

para la preparación de:

- a) un medicamento para el tratamiento anti-VHC o
- b) como agente preventivo en forma tópica para inhibir la transmisión viral a un sujeto en situación de riesgo.

4. Utilización, según la reivindicación 3, en la que el citado anticuerpo o su fragmento es el fragmento Fab de anticuerpo monoclonal humano e301 o un anticuerpo monoclonal humano de tamaño completo que contiene al citado fragmento Fab.

5. Utilización, según las reivindicaciones 1-4, en la que el anticuerpo humano es una molécula de IgG1 de tamaño completo.

## ES 2 314 179 T3

6. Composición para terapia anti-VHC, que comprende en una cantidad terapéuticamente eficaz, como mínimo, un anticuerpo humano, o sus fragmentos funcionales, siendo el citado anticuerpo o su fragmento los fragmentos Fab de anticuerpo monoclonal humano e301 o e137, según las reivindicaciones 1 ó 3 o un anticuerpo monoclonal humano de tamaño completo que contiene cualquiera de los citados fragmentos Fab.

5

7. Composición, según la reivindicación 6, para utilización por vía parenteral o tópica.

8. Procedimiento para la determinación de la presencia de anticuerpos que tienen actividad neutralizante del VHC en un fluido biológico, que comprende las etapas de:

10

a) marcar los Fabs de anticuerpo monoclonal humano e137 o e301, según las reivindicaciones 1 ó 3, o un anticuerpo monoclonal humano de tamaño completo que contenga, como mínimo, uno de dichos fragmentos Fab;

15

b) determinar la presencia de anticuerpos en el citado fluido capaces de inhibir la unión del citado Fab de anticuerpo monoclonal humano marcado, o de dicho anticuerpo monoclonal humano de tamaño completo, a la proteína E2 del VHC.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

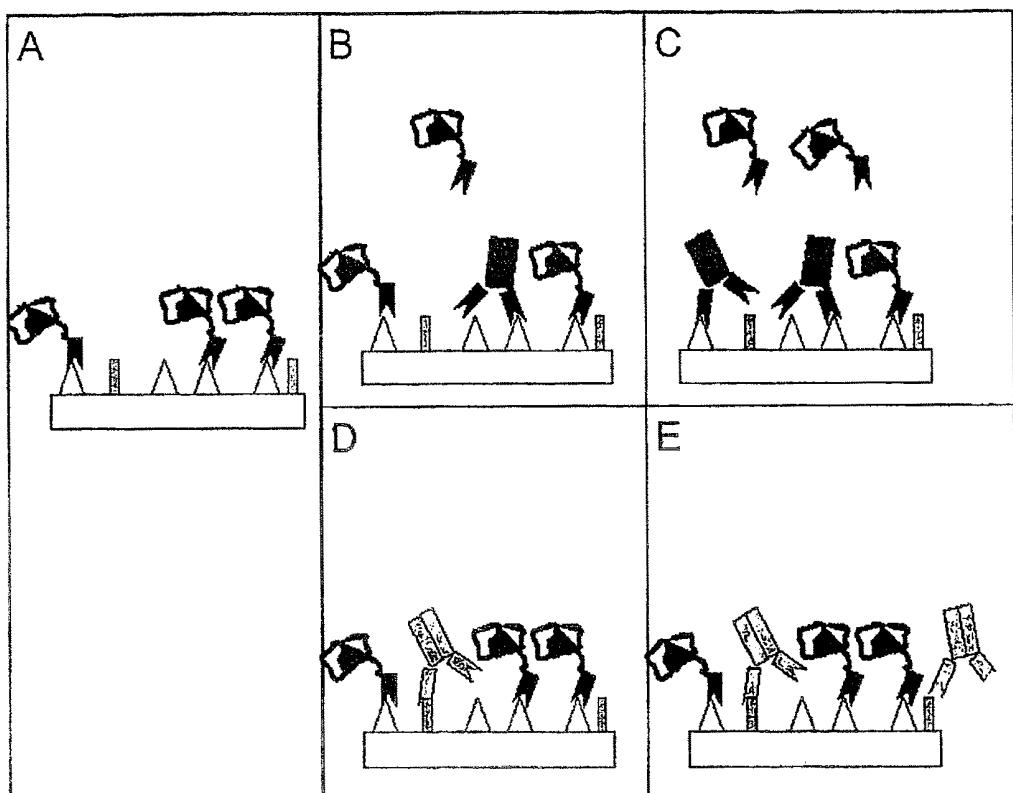


FIGURA 1

**ENV 8-flag FIT**

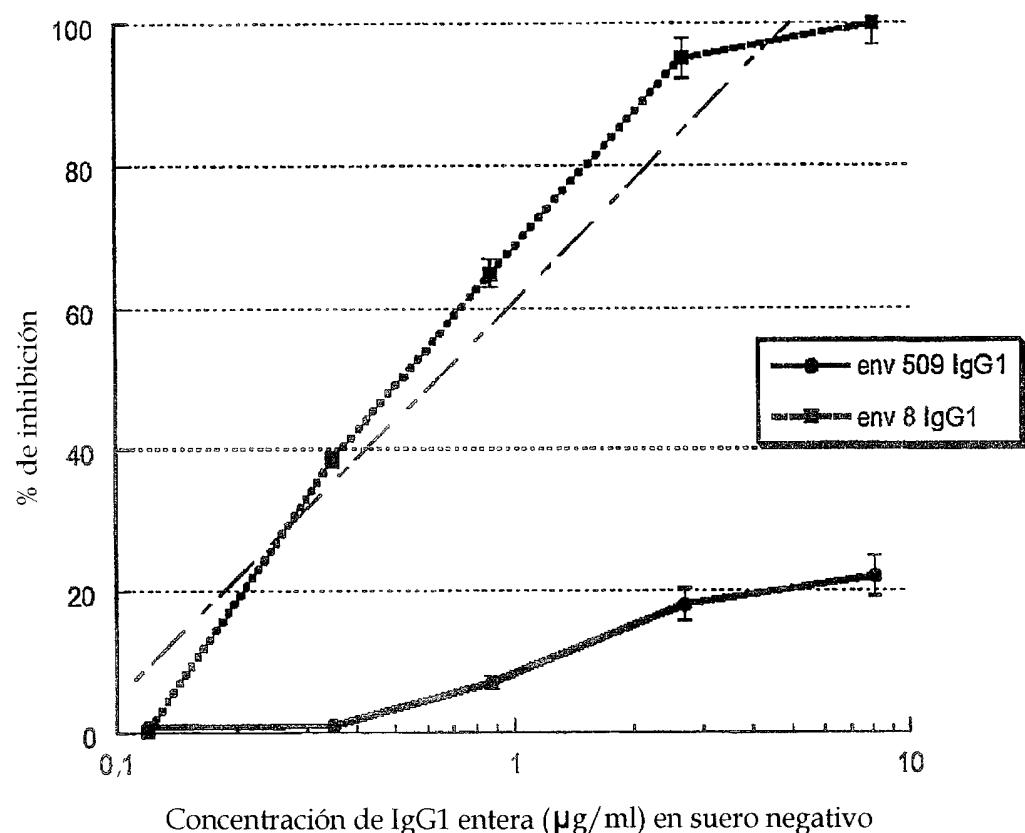


FIGURA 2A

**ENV 509-flag FIT**

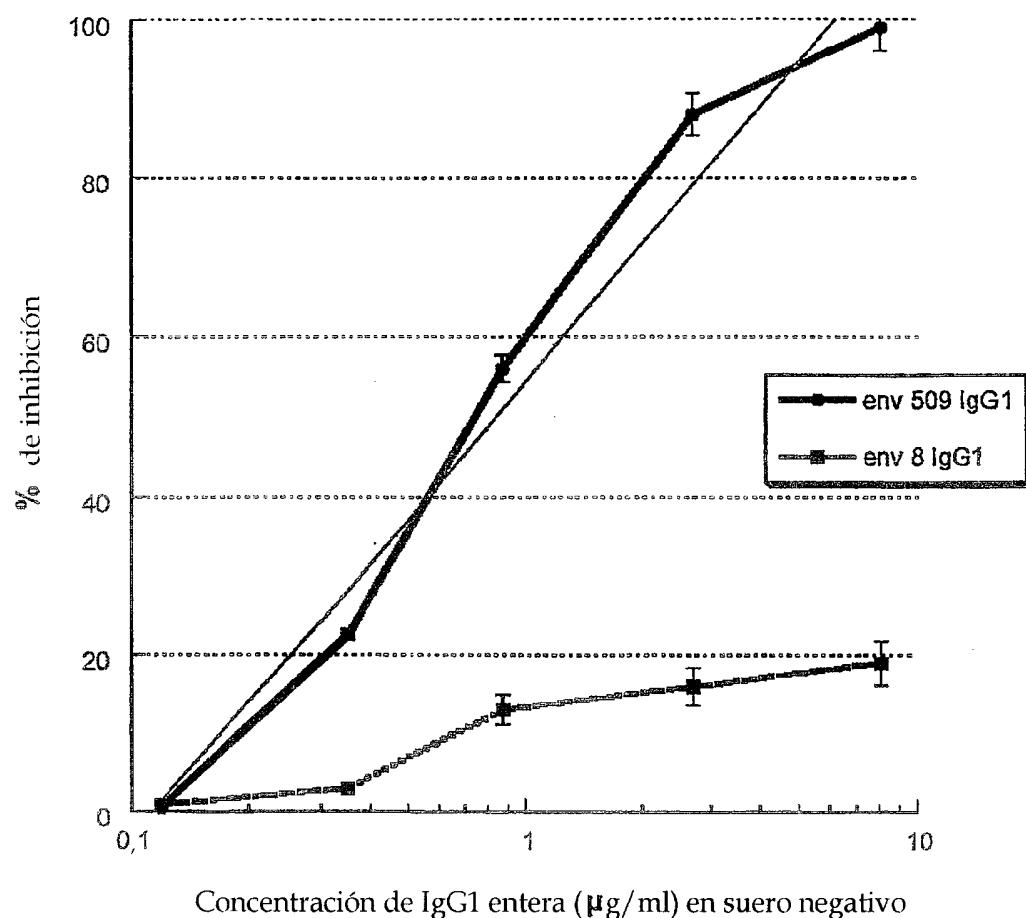


FIGURA 2B

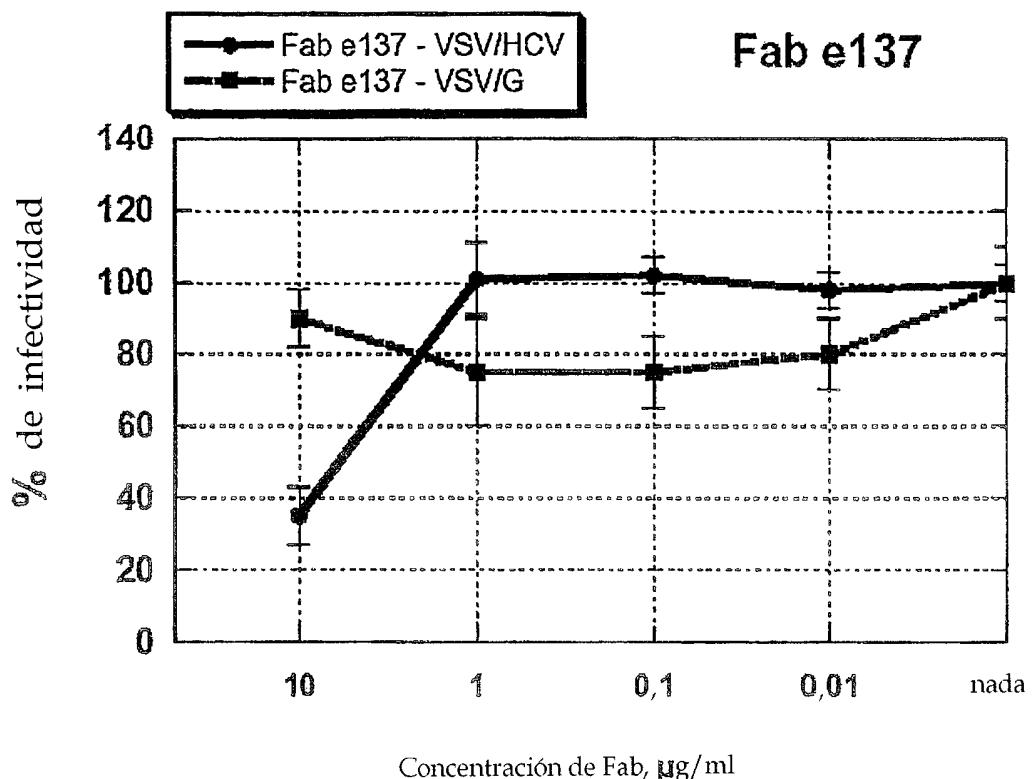


FIGURA 3A

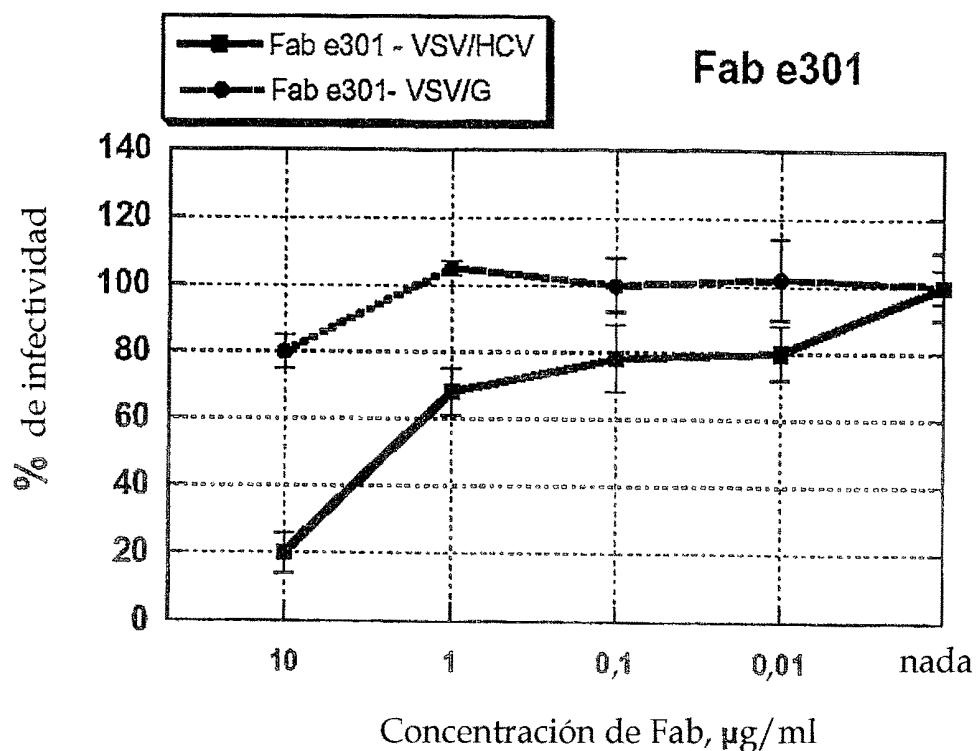


FIGURA 3B

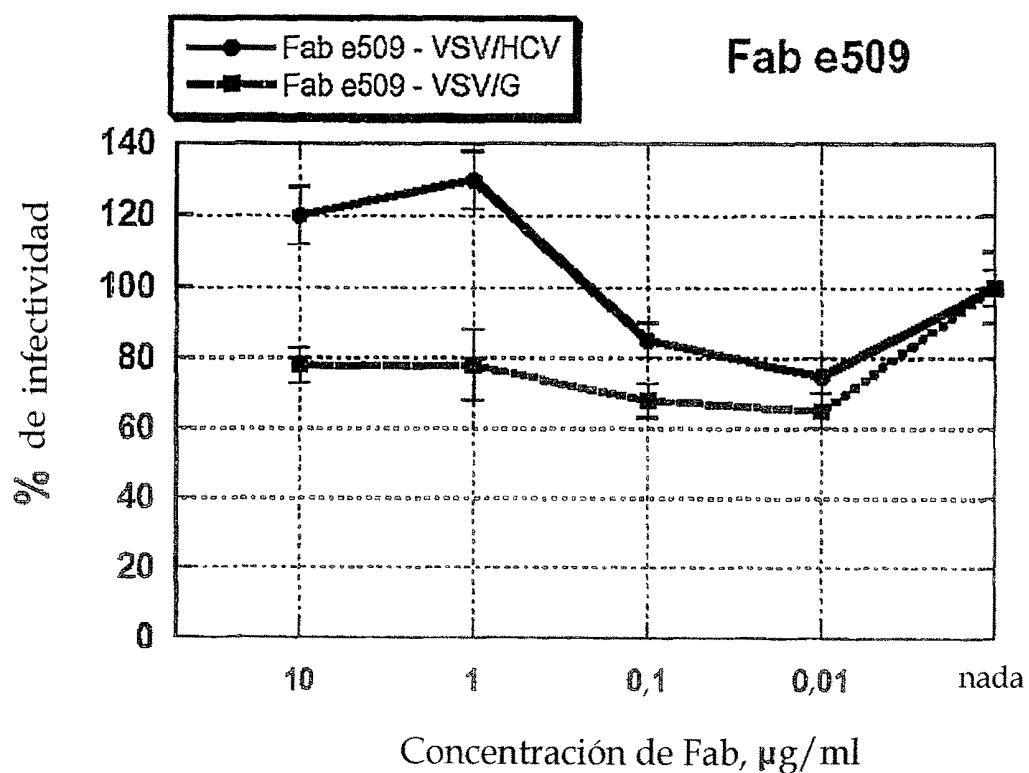


FIGURA 3C

ES 2 314 179 T3

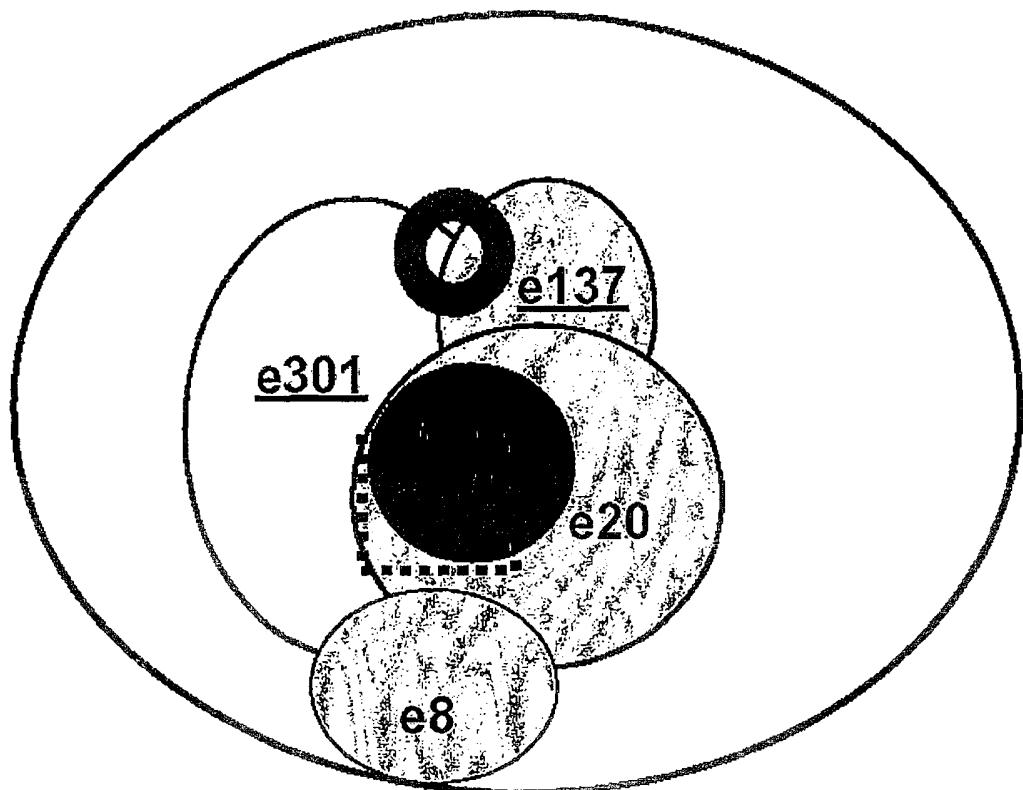


FIGURA 4

# ES 2 314 179 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Burioni, Roberto  
<120> FRAGMENTOS FAB DE ANTICUERPO MONOCLONAL HUMANO DIRIGIDOS CONTRA LA GLU-  
5 COPROTEÍNA E2 DEL VHC Y QUE ESTÁN DOTADOS DE ACTIVIDAD NEUTRALIZANTE *IN VITRO*  
<130> 30068  
<150> IT RM2002A/000049  
10 <151> 2002-01-30  
<160> 24  
<170> PatentIn versión 3.1  
15 <210> 1  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
20 <400> 1

Leu Leu Glu Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Met Pro Gly Ala Thr Val  
1 5 10 15

25

Lys Val Ser Cys Gln Ser Ser Arg Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Gly Ile  
20 25 30

30

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

35

Ile Ser Gly Tyr Thr His Glu Thr Lys Tyr Ala Gln Ser Phe Gln Gly  
50 55 60

40

Arg Val Thr Met Thr Ala Glu Thr Ser Thr Gly Thr Ala Tyr Met Glu  
65 70 75 80

45

Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg  
85 90 95

50

Asp Gly Gly Arg Val Val Val Pro Pro Thr His Leu Arg Ala Phe

100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr  
115

55

<210> 2  
<211> 104  
<212> PRT  
60 <213> *Homo sapiens*

65

## ES 2 314 179 T3

&lt;400&gt; 2

Met Ala Glu Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15

5 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser His Arg Val Asn Asn Asn  
 20 25 30

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

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

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

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

25 Leu Tyr Ser Phe Gly Gln Gly Thr  
 100

&lt;210&gt; 3

30 &lt;211&gt; 124

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

35 &lt;400&gt; 3

Leu Leu Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser  
 1 5 10 15

40 Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Ile Ser Tyr Gly Arg Gly  
 20 25 30

45 Val Ser Tyr Trp Gly Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Leu Glu  
 35 40 45

Trp Ile Gly His Ile Tyr Tyr Phe Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Pro Ser  
 50 55 60

50 Leu Asn Asn Arg Ala Thr Ile Ser Ile Asp Ser Ser Lys Asn Gln Phe  
 65 70 75 80

55 Ser Leu Lys Leu Lys Ser Val Thr Ala Ser Asp Thr Ala Leu Tyr Phe  
 85 90 95

60 Cys Ala Arg Ser Thr Leu Gln Tyr Phe Asp Trp Leu Leu Thr Arg Glu  
 100 105 110

Ala Ala Tyr Ser Ile Asp Phe Trp Gly Gln Gly Ile  
 115 120

65 &lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 102

# ES 2 314 179 T3

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

5 <400> 4

Met Ala Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

10 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Val Thr Ile Leu  
20 25 30

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr  
100

30 <210> 5

<211> 116

<212> PRT

35 <213> *Homo sapiens*

<400> 5

40 Leu Leu Glu Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val  
1 5 10 15

Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Asp His Tyr Gly Ile Asn Trp Val  
20 25 30

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

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

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

55 Leu Thr Phe Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Thr Pro His Gln  
85 90 95

60 Leu His Val Leu Arg Gly Gly Lys Ala Leu Ser Pro Trp Asp Tyr Trp  
100 105 110

Gly Gln Gly Thr  
115

65 <210> 6

<211> 102

## ES 2 314 179 T3

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

5 &lt;400&gt; 6

|   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|   | Met | Ala | Glu | Leu | Thr | Gln | Ser | Pro | Ala | Thr | Leu | Ser | Val | Ser | Pro | Gly |
| 1 |     |     | 5   |     |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     |     | 15  |     |

|    |  |  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|----|--|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|    |  |  | Glu | Arg | Ala | Thr | Leu | Ser | Cys | Arg | Ala | Ser | Gln | Ser | Val | Ser | Ser | Asn |
| 10 |  |  |     |     |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |     |     |

|    |  |  |  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|----|--|--|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|    |  |  |  | Leu | Ala | Trp | Tyr | Gln | Gln | Lys | Arg | Gly | Gln | Ala | Pro | Ser | Leu | Leu | Ile |
| 15 |  |  |  |     |     |     |     | 35  |     |     | 40  |     |     | 45  |     |     |     |     |     |

|    |  |  |  |  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|----|--|--|--|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|    |  |  |  |  | Tyr | Gly | Thr | Ser | Thr | Arg | Ala | Thr | Gly | Ile | Pro | Ala | Arg | Phe | Ser | Gly |
| 20 |  |  |  |  |     | 50  |     |     |     | 55  |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |     |

|    |  |  |  |  |  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|----|--|--|--|--|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
|    |  |  |  |  |  | Ser | Gly | Ser | Gly | Thr | Glu | Phe | Thr | Leu | Thr | Ile | Ser | Ser | Leu | Gln | Ser |  |
| 25 |  |  |  |  |  |     |     |     |     | 65  |     |     |     | 70  |     |     | 75  |     |     | 80  |     |  |

|    |  |  |  |  |  |  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|----|--|--|--|--|--|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
|    |  |  |  |  |  |  | Glu | Asp | Phe | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys | Gln | Gln | Tyr | Asn | Asp | Trp | Pro | Ser |  |
| 30 |  |  |  |  |  |  |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     | 95  |     |     |     |     |  |

|    |  |  |  |  |  |  |  |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|----|--|--|--|--|--|--|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
|    |  |  |  |  |  |  |  | Thr | Phe | Gly | Gln | Gly | Thr |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 35 |  |  |  |  |  |  |  |     |     | 100 |     |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

30 &lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 120

&lt;212&gt; PRT

35 <213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 7

|    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|
|    | Leu | Leu | Glu | Gln | Ser | Gly | Ser | Glu | Val | Lys | Val | Pro | Gly | Ser | Ser | Leu |  |  |
| 40 |     |     |     |     | 1   |     |     | 5   |     | 10  |     |     |     | 15  |     |     |  |  |

|    |  |  |  |  |  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|----|--|--|--|--|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|    |  |  |  |  |  | Lys | Val | Ser | Cys | Lys | Thr | Ser | Gly | Thr | Phe | Ser | Thr | Tyr | Thr | Phe |
| 45 |  |  |  |  |  |     |     |     | 20  |     |     | 25  |     |     | 30  |     |     |     |     |     |

|    |  |  |  |  |  |  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|----|--|--|--|--|--|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|    |  |  |  |  |  |  | Ser | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Gln | Gly | Leu | Glu | Trp | Met | Gly | Gly |
| 50 |  |  |  |  |  |  |     |     | 35  |     |     |     | 40  |     |     | 45  |     |     |     |     |     |     |

|    |  |  |  |  |  |  |  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|----|--|--|--|--|--|--|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|    |  |  |  |  |  |  |  | Ile | Thr | Pro | Ile | Ile | Gly | Ile | Ala | Asn | Tyr | Ala | Arg | Asn | Phe | Gln | Asp |
| 55 |  |  |  |  |  |  |  |     | 50  |     |     |     | 55  |     |     | 60  |     |     |     |     |     |     |     |

|    |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|----|--|--|--|--|--|--|--|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|    |  |  |  |  |  |  |  |  | Arg | Val | Thr | Ile | Thr | Ala | Asp | Glu | Ser | Thr | Ser | Thr | Val | Tyr | Met | Glu |
| 60 |  |  |  |  |  |  |  |  | 65  |     |     |     |     | 70  |     |     | 75  |     |     | 80  |     |     |     |     |

|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|----|--|--|--|--|--|--|--|--|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  | Val | Arg | Arg | Leu | Arg | Ser | Glu | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys | Ala | Lys |
| 65 |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 85  |     |     |     | 90  |     |     | 95  |     |     |     |     |     |     |     |     |

|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|----|--|--|--|--|--|--|--|--|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  | Thr | Ser | Glu | Val | Thr | Ala | Thr | Arg | Gly | Arg | Thr | Phe | Phe | Tyr | Ser | Ala |
| 70 |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 100 |     |     |     | 105 |     |     | 110 |     |     |     |     |     |     |     |     |

|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |  |  |
|----|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|--|--|--|
|    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | Met | Asp | Val | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr |  |  |  |  |  |  |  |
| 75 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 115 |     |     |     | 120 |     |     |     |  |  |  |  |  |  |  |

65 &lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 102

# ES 2 314 179 T3

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

5 <400> 8

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Ala | Glu | Leu | Thr | Gln | Ser | Pro | Ser | Phe | Leu | Ser | Ala | Ser | Val | Gly |
| 1   | 5   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 15  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Arg | Val | Thr | Ile | Thr | Cys | Arg | Ala | Ser | Gln | Gly | Ile | Ser | Asn | Tyr |
|     |     | 20  |     |     |     |     |     |     |     | 25  |     |     | 30  |     |     |

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

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

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Gly | Ser | Trp | Thr | Glu | Phe | Thr | Leu | Thr | Ile | Ser | Arg | Leu | Gln | Pro |
|     |     |     |     | 65  | 70  |     |     |     | 75  |     |     | 80  |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Asp | Phe | Ala | Thr | Tyr | Tyr | Cys | Gln | His | Leu | Asn | Thr | Tyr | Pro | Trp |
|     |     |     |     |     | 85  |     |     | 90  |     |     |     | 95  |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Thr | Phe | Gly | Gln | Gly | Thr |
|     |     |     | 100 |     |     |

30

<210> 9

<211> 118

<212> PRT

35 <213> *Homo sapiens*

<400> 9

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Leu | Leu | Glu | Gln | Ser | Gly | Ser | Glu | Val | Lys | Lys | Pro | Gly | Ser | Ser | Val |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     | 15  |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Arg | Val | Ser | Cys | Thr | Thr | Ser | Gly | Gly | Thr | Leu | Ser | Asp | Tyr | Gly | Phe |
|     |     |     |     | 20  |     |     |     | 25  |     |     |     | 30  |     |     |     |

45

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asn | Trp | Leu | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Gln | Gly | Pro | Glu | Trp | Met | Gly | Gly |
|     |     |     | 35  |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |     |

50

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ile | Ile | Pro | Leu | Phe | Arg | Arg | Thr | Thr | Tyr | Gly | Gln | Lys | Phe | Gln | Gly |
|     |     |     | 50  |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |

55

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Arg | Leu | Thr | Ile | Thr | Ala | Asp | Glu | Ser | Thr | Gly | Ala | Thr | Tyr | Met | Glu |
|     |     |     | 65  |     |     | 70  |     |     |     | 75  |     |     | 80  |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Leu | Ser | Ser | Leu | Arg | Ser | Asp | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys | Ala | Arg |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     | 90  |     |     |     | 95  |     |     |     |

60

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Lys | Val | Ser | Val | Leu | Thr | Gly | Gly | Lys | Ser | Leu | His | Tyr | Phe | Glu |
|     |     |     | 100 |     |     | 105 |     |     |     |     |     | 110 |     |     |     |

65

|     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Tyr | Trp | Gly | Lys | Gly | Thr |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|

<210> 10

<211> 102

ES 2 314 179 T3

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

5 <400> 10

Met Ala Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly  
1 5 10 15

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

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

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

20 Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser  
65 70 75 80

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

30 Thr Phe Gly Gln Gly Thr  
100

<210> 11

<211> 118

<212> PRT

35 <213> *Homo sapiens*

<400> 11

40 Leu Leu Glu Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val  
1 5 10 15

45 Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Asp Thr Phe Arg Tyr Gly Ile Thr  
20 25 30

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

55 Met Pro Thr Phe Ala Thr Ala Thr Tyr Ala Gln Arg Phe Gln Gly Arg  
50 55 60

60 Val Thr Ile Ser Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Leu Glu Val  
65 70 75 80

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

Arg Gln Val Thr Ile Leu Arg Gly Pro Lys Ala Leu Ser Pro Trp Asp  
100 105 110

65 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
115

# ES 2 314 179 T3

<210> 12

<211> 102

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 12

10 Met Ala Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Ala Ser Pro Gly  
 1 5 10 15

15 Glu Arg Ala Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn  
 20 25 30

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

25 Ser Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

30 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser  
 65 70 75 80

35 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Pro  
 85 90 95

His Phe Gly Gln Gly Thr  
 100

35

<210> 13

<211> 357

40 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 13

45

ctgctcgagc agtctggagc tgaggtgaag atgcctgggg ccacagtcaa ggtctccctgc 60

cagtcttccc gttacacctt caccagttac ggtatcggt gggtgcgaca ggccccctgga 120

50

caggggcttg agtggatggg atggatcagc ggatacaccc atgagacaaa atatgcacag 180

agtttccagg gcagagtcac catgaccgca gagacatcca cgggcacagc gtatatggag 240

ttgaggagcc tgcggctctga cgacacggcc acatattact ggcgcagaga tggaggaggg 300

55

agggtggtag tgccgcctac tcatctacgt gctttgatg tctggggta agggacg 357

<210> 14

60 <211> 312

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

65

# ES 2 314 179 T3

<400> 14

|    |   |     |
|----|---|-----|
| 5  | atggccgagc tcacccagtc tccaggcacc ctgtcttgc ctccagggga aagagccacc    | 60  |
|    | ctctcctgca gggccagtca cagagtcaat aacaacttct tagcctggta tcagcagaaa   | 120 |
|    | cctggccagg ctcccaggct cctcatctct ggtgcatacta ccagggccac tggcatccca  | 180 |
| 10 | gacaggttca gtggcagtgg gtctggaaaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag  | 240 |
|    | cctgatgatt ttgcagtttta ttattgtcag cagtatggtg actcacctct ttattctttt  | 300 |
|    | ggccagggga cc   | 312 |
| 15 | <210> 15  |     |
|    | <211> 372   |     |
|    | <212> ADN   |     |
| 20 | <213> <i>Homo sapiens</i>   |     |
|    | <400> 15  |     |
| 25 | ctgctcgagt ctggccagg actggtaag cttcacaga cccctgtccct cacctgcacc     | 60  |
|    | gtctccggtg tctccatcag ttacgggtgt cggtggcggtt cctactgggg ttgggtccgc  | 120 |
| 30 | cagtccccag ggaagggcct ggagtggatt ggcacatctt actactttgg agacacccctc  | 180 |
|    | tacaacccgt ccctcaacaa tcgagctacc atatcaatag actcatccaa aaaccaggcc   | 240 |
|    | tccctcaagc tcaagtctgt gactgcctca gacacggccc tgtatctgt tgccaggagc    | 300 |
| 35 | accctacagt attttgactg gttattgaca cgggaggctg cctactccat tgacttctgg   | 360 |
|    | ggccagggaa ta   | 372 |
| 40 | <210> 16  |     |
|    | <211> 306   |     |
|    | <212> ADN   |     |
|    | <213> <i>Homo sapiens</i>   |     |
| 45 | <400> 16  |     |
| 50 | atggccgagc tcacccagtc tccatcccttc ctgtctgcatt ctgttgaga ccgagtcacc  | 60  |
|    | atcacttgcc gggccagtca gggcgccacc attcttttag cctggatca gcaaaagcca    | 120 |
|    | gggaaacccc ctaaggccct gatttatgtt gcacgtgttt tgcaaagtgg ggtcccarca   | 180 |
| 55 | aggttcagcg gcagtggttc tgacacagat ttcaactctca caatcagcag cctacagccct | 240 |
|    | gaagattctg caacttatta ctgtcaacaa cttiacactt acccgtggac gttcggccag   | 300 |
|    | gggacc  | 306 |
| 60 | <210> 17  |     |
|    | <211> 348   |     |
|    | <212> ADN   |     |
| 65 | <213> <i>Homo sapiens</i>   |     |

# ES 2 314 179 T3

<400> 17

|   |  |                                       |
|---|--|---------------------------------------|
| 5 | <b>ctgctcgagc agtcaggggc tgaggtgaag aagcctgggt cctcggtgaa ggtctccgc<br/>aaggcttctg gagaccacta tggtatcaac tgggtgcgac aggccctgg acaagggctg<br/>gagtggatgg gcggtatcat ccctgtcttt ggcacaacta cctacgcaca gaagttccag<br/>10 ggcagagcca ccattaccgc ggacgactcc acggggacgg ctttttgg a gctgaccaga<br/>ctgacatttgc acgacacggc cgtctatttc tgtgcgacac ctcaccaact gcatgtcc<br/>cggggcggt aagccctctc cccctggac tactggggcc agggacc</b> | 60<br>120<br>180<br>240<br>300<br>348 |
|---|--|---------------------------------------|

15 <210> 18

<211> 306

<212> ADN

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 18

|    |   |                                       |
|----|---|---------------------------------------|
| 25 | <b>atggccgagc tcacccagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggg aagagccacc<br/>ctctcctgca gggccagtca gagtgtagc agtaacttag cctggtagca gcagaaaacgt<br/>30 ggcaggctc ccagtctccatctacgg a catctacca gggccactgg tatcccagcc<br/>agttcagtgc agtggggtc tgggacagag ttcaactctca ccatcagcag cctgcagtct<br/>gaagattttgc cagtttattatctgtcagcag tataatgatt ggccctccac cttcggccaa<br/>35 gggaca</b> | 60<br>120<br>180<br>240<br>300<br>306 |
|----|---|---------------------------------------|

<210> 19

<211> 360

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

45 <400> 19

|    |   |                                       |
|----|---|---------------------------------------|
| 50 | <b>ctgctcgagc agtctgggtc tqaagtaaaa gtgccccgggt cctcggtgaa ggtctccgc<br/>aagacttctg gaggcacctt cagcacctat actttcagct ggggtgcgaca ggccctgg<br/>cagggacttg agtggatggg ggggatcacc cctatcattt gcatcgaaaa ctacgcacgg<br/>aacttccagg acagagtca c atcaccygc gacgaatcca cgagcacggt ctacatggag<br/>55 gtgaggaggc tgagatctga ggacacggcc gtatattttt gtgcgaaaac ttccgaaagta<br/>acagccacta gaggggcggtac tttcttctac tccgctatgg acgtctgggg tcaagggacc</b> | 60<br>120<br>180<br>240<br>300<br>360 |
|----|---|---------------------------------------|

60 <210> 20

<211> 306

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

65

# ES 2 314 179 T3

<400> 20

|          |  |                                       |
|----------|--|---------------------------------------|
| 5        | atggccgagc tcacccagtc tccatccctc ctgtctgcat ctgttaggaga cagagtcacc<br>atcaacttgcc gggccagtca gggcataagc aattattttag cctggtatca gcaaaaacca<br>gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccactt tgcaaagtgg ggtcccatcg<br>aggttcagcg gcagtggatc ttggacagaa ttcaactctca caatcagccg cctccagcct<br>gaagatttg caacttatta ctgtcaacac cttaatactt acccgtggac gttcggccaa<br>gggacc | 60<br>120<br>180<br>240<br>300<br>306 |
| 15       | <210> 21   |                                       |
|          | <211> 354  |                                       |
|          | <212> ADN  |                                       |
| 20       | <213> <i>Homo sapiens</i>  |                                       |
| <400> 21 |  |                                       |
| 25       | ctgctcgagc agtctgggtc tgaggtgaag aaacctgggt cctcggtgag ggtctcggtgc<br>acgacttctg gaggcacctt gagcgactat ggtttcaact ggttacgaca ggcccttgaa<br>caagggcctg agtggatggg agggatcatc cctttgtttc gaagaacaac ctacggacag<br>aagttccagg gcagactcac cattaccygcg gacgagtcca cgggcgcac acatggag  | 60<br>120<br>180<br>240               |
| 30       |  |                                       |
| 35       | ctgagcagcc tgagatctga cgacarggcc gtcttattact gtgcgagaga gaaagtttcg<br>gtcctcacag gcgaaaagtc actccatrac tttgaatatt gggcaagg aacc  | 300<br>354                            |
| 40       | <210> 22   |                                       |
|          | <211> 306  |                                       |
|          | <212> ADN  |                                       |
| 45       | <213> <i>Homo sapiens</i>  |                                       |
| <400> 22 |  |                                       |
| 50       | atggccgagc tcacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccaggggaa aagagccacc<br>ctctcctgca gggccagtca gagtgtagc agcaggttag cctggtatca gcagaaacgt<br>ggccaggctc ccagtctcct catctatgac acatcttcca gggccactgg tgtcccatcg<br>55  | 60<br>120<br>180<br>240               |
|          | aggttcagtg ccagtgggtc tgggacgcag ttcaactctca ccatcagcag cctgcagtct<br>gaagatttg cacttatta ctgtcagcag tataatgatt ggccctccac cttcggccaa<br>gggaca  | 300<br>306                            |
| 60       | <210> 23   |                                       |
|          | <211> 354  |                                       |
|          | <212> ADN  |                                       |
| 65       | <213> <i>Homo sapiens</i>  |                                       |

# ES 2 314 179 T3

<400> 23

|    |   |                   |
|----|---|-------------------|
| 5  | <b>ctgctcgagg agtctggggc tgaggtgaag aagccagggt cctcggtgaa ggtctccctgc<br/>aagacttctg gagacacacctt cagatatggt atcacgtgg tgcgacaggc ccctggacaa<br/>gggcttgagt ggatgggaca gatcatgcct acgtttgcgta cagcaaccta cgcacagagg</b> | 60<br>120<br>180  |
| 10 | <b>ttccaggggca gagtcacgat ttccgcggac gaatccacga gcacagccta ctggaggtg<br/>cgccgcctga gatctgaaga cacggccgtc tattactgtg cgacacctcg ccaagttact<br/>atacttcggg gacctaaga cctctccccct tgggactact gggcccgagg aacc</b>          | 240<br>300<br>354 |

15 <210> 24

<211> 306

<212> ADN

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 24

|    |   |           |
|----|---|-----------|
| 25 | <b>atggccgagc tcacccagtc tccagccacc ctgtctgcgt ctccagggga aagagcctcc<br/>ctctcctgca gggccagtca gagtgttagt agcaacttag cctggtagcca gcagaaacct</b> | 60<br>120 |
|----|---|-----------|

30

|    |  |                          |
|----|--|--------------------------|
| 35 | <b>ggccaggctc ccaggctcct catctctggt gcatccacca gggccactgg tgtcccgcc<br/>agtttcagtgcagtg tgggacagag ttcactctca ccatcagtag cctgcagtct<br/>gaagattttgcagtttatta ctgtcagcag tataataact ggcctccccca ctttggccag<br/>gggacc</b> | 180<br>240<br>300<br>306 |
|----|--|--------------------------|

40

45

50

55

60

65