



19



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: **Fragments 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**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2009

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

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

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 antigénica 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 epítomos 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 epítomos 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 externamente 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 epítomos.

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.

ES 2 314 179 T3

Como los epítomos 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-idiotipo) 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 LLEQSGSEVKVPGSSSLKVSCKTSGGTFSTYTF SWVRQAPGQGLEWMG
GITPIIGIANYARNFQDRVITADESTSTVYMEVRRLRSED TAVYYCAKTS
30 EVTATRGRTFFYSAMDVWGQGT

Cadena ligera (LC) e 137

35 MAELTQSPSFLSASVGDRVITITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYA
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 LLEQSGSEVKKPGSSVRVSC TTS GGTLSDYGFNWLRQAPGQGPEWMG
GIIPLFRRTTYGQKFQGR LTITADESTGATY MELSSLRSDD TAVYYCARE
KVS VLTGGKSLHYFEYWGKGT

Cadena ligera (LC) e 301

60 MAELTQSPATLSVSPGERATL SCRASQSVSSRLAWYQQKRGQAPSLLIY
65 DTSSRATGVPARFSASGSGTQFTLTIS SLQSEDFALYYCQQYNDWPSTF
QQGT

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.

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.

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.

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:

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.

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

- Figura 1 FIT: BASE TEÓRICA. El Panel A muestra la unión de un Fab-FLAG a sus epítomos 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 epítipo 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 epítipo específico no influye en grado mínimo la unión de Fab.

- 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 epítomos 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.

- 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.

- Figura 4: Mapa bidimensional similar a la superficie de los epítomos 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.

Ejemplo 1

Materiales y procedimientos

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

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 epítipo 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

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 inmunoafinidad 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.

Sueros y especímenes

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 epítipo 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.

Diseño de un ensayo para la determinación del título de inhibición de Fab (FIT (en inglés, “Fab Inhibition Titer”))

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

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 antirratón de cabra conjugada con peroxidasa de rábano (Pierce; 1:8.000 en PBS). Se añadió el sustrato y en las placas se leyó la OD₄₅₀ (“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.

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 OD₄₅₀ 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: $\text{porcentaje de inhibición} = 100 \times (\text{OD}_{450} \text{ de la sonda FLAG-Fab sola} - \text{OD}_{450} \text{ de la sonda FLAG-Fab con suero competidor}) / \text{OD}_{450} \text{ de la sonda FLAG-Fab sola}$.

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 epítipo y para ese suero.

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:

e8 HC

LLEQSGAEVKMPGATVKVSCQSSRYTFTSYGIGWVRQAPGQGLEWMG
WISGYTHETKYAQSFQGRVTMTAETSTGTAYMELRSLRSDDTATYYCA
RDGGGRVVPPTHLEAFDVWGQGT

e8 LC

MAELTQSPGTLSLSPGERATLSCRASHRVNNNFLAWYQQKPGQAPRLLI
SGASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPDDFAVYYCQQYGDSPLY
SFGQGT

e10 HC

LLESGPGLVKPSQTLSTCTVSGVSISYGGRGVSYWGWVRQSPGKGLE
WIGHIYYFGDTFYNPSSLNNRATISIDSSKNQFSLKLKSVTASDTALYFCAR
STLQYFDWLLTREAAYSIDFWGQGI

e10 LC

MAELTQSPSFLSASVGDRVITICRASQGVITILLAWYQQKPGKPPKALIYA
ASSLQSGVPSRFSGSGSDTDFTLTISLQPEDSATYYCQQLNTYPWTFG
QGT

e20 HC

LLEQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGDHYGINWVRQAPGQGLEWMGGIIP
VFGTTTYAQKFQGRATITADDSTGTAFLELTRLTFDDTAVYFCATPHQLH
VLRGGKALSPWDYWGQGT

e20 LC

MAELTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKRGQAPSLLIY
GTSTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQYNDWPSTF
GQGT

e137 HC

LLEQSGSEVKVPGSSLKVSCKTSGGTFFSTYTFSWVRQAPGQGLEWMG
GITPIIGIANYARNFQDRVITADESTSTVYMEVRRLRSED TAVYYCAKTS
EVTATRGRTFFYSAMDVWGQGT

e137 LC

MAELTQSPSFLSASVGDRVITICRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYA
ASTLQSGVPSRFSGSGSWTEFTLTISR LQPEDFATYYCQHLNTYPWTFG
QGT

e301 HC

LLEQSGSEVKKPGSSVRVSC TTSGGT LSDYGFNWLRQAPGQGPEWMG
GIIPLFRRTTYGQKFQGR L TITADESTGATYME LSSLRSDDTAVYYCARE
KVS VLTGGKSLHYFEYWGKGT

e301 LC

MAELTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSRLAWYQQKRGQAPSL LIY
DTSSRATGV PARFSASGSGTQFTLTIS SLQSEDFALYYCQQYN DWPSTF
GQGT

e509 HC

LLEESGAEVKKPGSSVKVSCKTSGD TFRYGITWVRQAPGQGLEWMGQI
MPTFATATYAQR FQGRVTISADESTSTAYLEVRSLRSED TAVYYCATPR
QVTILRGPKALSPWDYWGQGT

e509 LC

MAELTQSPATLSASPGERASLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIS
GASTRATGV PARFSGSGSGTEFTLTIS SLQSEDFAVYYCQQYNNWPPH
FGQGT

ES 2 314 179 T3

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

e8 HC

CTGCTCGAGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGATGCCTGGGGCCACAG
TGAAGGTCTCCTGCCAGTCTTCCCGTTACACCTTCACCAGTTACGGT
ATCGGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAGGGGCTTGAGTGGATG
GGATGGATCAGCGGATACACCCATGAGACAAAATATGCACAGAGTTT
CCAGGGCAGAGTCACCATGACCGCAGAGACATCCACGGGGCACAGCG
TATATGGAGTTGAGGAGCCTGCGGTCTGACGACACGGCCACATATTA
CTGCGCGAGAGATGGAGGAGGGAGGGTGGTAGTGCCGCCTACTCAT
CTACGTGCTTTTGATGTCTGGGGTCAAGGGACG

e8 LC

ATGGCCGAGCTCACCCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGG
GGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCACAGAGTCAATAACA
ACTTCTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTC
CTCATCTCTGGTGCATCTACCAGGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTT
CAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGAC
TGGAGCCTGATGATTTTGCAGTTTATTATTGTCAGCAGTATGGTGACT
CACCTCTTTATTCTTTTGGCCAGGGGACC

e10 HC

CTGCTCGAGTCTGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGT
CCCTCACCTGCACCGTCTCCGGTGTCTCCATCAGTTACGGTGGTCGT
GGCGTTTCCTACTGGGGTTGGGTCCGCCAGTCCCCAGGGAAGGGCC
TGGAGTGGATTGGCCACATCTACTACTTTGGAGACACCTTCTACAAC
CCGTCCCTCAACAATCGAGCTACCATATCAATAGACTCATCCAAAAC
CAGTTCTCCCTCAAGCTCAAGTCTGTGACTGCCTCAGACACGGCCCT
GTATTTCTGTGCCAGGAGCACCCCTACAGTATTTTGAAGTGGTTATTGAC
ACGGGAGGCTGCCTACTCCATTGACTTCTGGGGCCAGGGAATA

e10 LC

ATGGCCGAGCTCACCCAGTCTCCATCCTTCCTGTCTGCATCTGTTGG
AGACCGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGGGCGTCACCATT
CTTTTAGCCTGGTATCAGCAAAAGCCAGGGAAACCCCTAAGGCCCT
GATTTATGCTGCATCGTCTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCA
GCGGCAGTGGTTCTGACACAGATTTCACTCTCACAATCAGCAGCCTA
CAGCCTGAAGATTCTGCAACTTATTACTGTCAACAACCTTAACACTTAC
CCGTGGACGTTCGGCCAGGGGACC

e20 HC

CTGCTCGAGCAGTCAGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCGG
TGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGACCACTATGGTATCAACTGG
GTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTGGAGTGGATGGGCGGTATCA
TCCCTGTCTTTGGCACAACCTACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGA
GCCACCATTACCGCGGACGACTCCACGGGGACGGCCTTTTTGGAGC
TGACCAGACTGACATTTGACGACACGGCCGTCTATTTCTGTGCGACA

CCTCACCAACTGCATGTCCTCCGGGGCGGTAAAGCCCTCTCCCCCT
GGGACTACTGGGGCCAGGGAACC

e20 LC

ATGGCCGAGCTCACCCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGG
GGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGT
AACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACGTGGCCAGGCTCCCAGTCTCCT
CATCTACGGAACATCTACCAGGGCCACTGGTATCCCAGCCAGGTTCA
GTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCCTCTCACCATCAGCAGCCT
GCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATAATGATTG
GCCCTCCACCTTCGGCCAAGGGACA

e137 HC

CTGCTCGAGCAGTCTGGGTCTGAAGTAAAAGTGCCCGGGTCCTCGTT
GAAGGTCTCCTGCAAGACTTCTGGAGGCACCTTCAGCACCTATACTT
TCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAGGGACTTGAGTGGATGGG
GGGGATCACCCCTATCATTGGCATCGCAAACCTACGCACGGAACCTCC
AGGACAGAGTCACCATCACCGCGGACGAATCCACGAGCACGGTCTA
CATGGAGGTGAGGAGGCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTATATTATT
GTGCGAAAACCTTCGGAAGTAACAGCCACTAGAGGGCGGACTTTCTTC
TACTCCGCTATGGACGTCTGGGGTCAAGGGACC

e137 LC

ATGGCCGAGCTCACCCAGTCTCCATCCTTCCTGTCTGCATCTGTAGG
AGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGGCCAGTCAGGGCATAAGCAATT
ATTTAGCCTGGTATCAGCAAAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTG
ATCTATGCTGCATCCACTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCGAGGTTTCAG
CGGCAGTGGATCTTGACAGAAATCACTCTCACAATCAGCCGCCTCC
AGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACACCTTAATACTTACCC
GTGGACGTTTCGGCCAAGGGACC

e301 HC

CTGCTCGAGCAGTCTGGGTCTGAGGTGAAGAAACCTGGGTCCCTCGG
TGAGGGTCTCGTGACGACTTCTGGAGGCACCTTGAGCGACTATGGT
TTCAACTGGTTACGACAGGCCCTGGACAAGGGCCTGAGTGGATGG
GAGGGATCATCCCTTTGTTTCGAAGAACAACCTACGGACAGAAGTTC

CAGGGCAGACTCACCATACCGCGGACGAGTCCACGGGCGCAACCT
ACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTCTATTAC
TGTGCGAGAGAGAAAGTTTCGGTCCCTCACAGGCGGAAAGTCACTCCA
TTACTTTGAATATTGGGGCAAGGGAACC

e301 LC

ATGGCCGAGCTCACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAG
 5 GGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAG
 CAGGTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACGTGGCCAGGCTCCCAGTCTC
 CTCATCTATGACACATCTTCCAGGGCCACTGGTGTCCCAGCCAGGTT
 10 CAGTGCCAGTGGGTCTGGGACGCAGTTCCTCTCACCATCAGCAGC
 CTGCAGTCTGAAGATTTTGCACCTTATTACTGTCAGCAGTATAATGATT
 15 GGCCCTCCACCTTCGGCCAAGGGACA

e509 HC

CTGCTCGAGGAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCAGGGTCCTCGG
 TGAAGGTCTCCTGCAAGACTTCTGGAGACACCTTCAGATATGGTATC
 25 ACGTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAC
 AGATCATGCCTACGTTTGGCAGAGCAACCTACGCACAGAGGTTCCAG
 GGCAGAGTCACGATTTCCGCGGACGAATCCACGAGCACAGCCTACTT
 30 GGAGGTGCGCAGCCTGAGATCTGAAGACACGGCCGTCTATTACTGT
 GCGACACCTCGCCAAGTTACTATACTTCGGGGACCTAAAGCCCTCTC
 35 CCCTTGGGACTACTGGGGCCAGGGAACC

e509 LC

ATGGCCGAGCTCACCCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGCGTCTCCAG
 GGGAAAGAGCCTCCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGTAG
 45 CAACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTC
 CTCATCTCTGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGTGTCCCGGCCAGGT
 TCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCCTCTCACCATCAGTAGC
 50 CTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATAATAAC
 TGGCCTCCCCACTTTGGCCAGGGGACC

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 epítomos 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 epítomos 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
 65 que el FIT puede proporcionar información fiable sobre la cantidad de anticuerpos específicos de epítomo en el suero de un paciente.

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

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 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 inhibición [7].

Ensayos de pseudotipos y de neutralización

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 quiméricas 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 VSV/VHC se prepara mediante la infección de células de CHO que expresan de forma constitutiva ADNc quimérico 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 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 (4×10^4 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.

Las UI del virus se determinan mediante el recuento del número de células que expresan GFP por medio de microscopia 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

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 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 epítipo 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.

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

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 epítomos 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 epítomos 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

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.

Clon Fab	Concentración que causa el 50% de NOB (µg/ml)	Efecto en la infección VSV/VHC
e8	> 40 (ninguno)	ninguno
e20	3 (alto)	ninguno
e137	40 (bajo)	inhibición
e301	3 (alto)	fuerte inhibición
e509	< 0,035 (el más alto)	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 policlonales 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.

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.

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.

13. **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.

14. **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.

15. **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.

16. **Takikawa, et al.**, Cell fusion activity of hepatitis C virus envelope proteins. *J Virol*, 2000. 74 (11): p. 5066-74.

17. **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.

18. **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.

19. **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.

20. **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.

21. **Lefranc, et al.**, IMGT, the international ImMunoGeneTics database. *Nucleic Acids Res*, 1999. 27 (1): p. 209-12.

22. **Kabat**, Sequences of Proteins of Immunological Interest. 5th ed. 1991, Bethesda, MD: U. S. Department of Health and Human Services.

23. **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.

24. **Pileri, et al.**, Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science*, 1998. 282 (5390): p. 938-41.

REIVINDICACIONES

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

e 137 cadena pesada (HC)

10 LLEQSGSEVKVPGSSSLKVSCKTSGGTSTYTFSWVRQAPGQGLEWMG
GITPIIGIANYARNFQDRVITITADESTSTVYMEVRRRLRSEDTAVYYCAKTS
EVTATRGRTFFYSAMDVWGQGT

e 137 cadena ligera (LC)

15 MAELTQSPSFLSASVGDRVITITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYA
20 ASTLQSGVPSRFSGSGSWTEFTLTISRLQPEDFATYYCQHLNTPWTFG
QGT,

25 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.

30 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.

35 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)

40 LLEQSGSEVKKPGSSVRVSCCTTSGGTLSYGFNWLRQAPGQGPEWMG
GIIPLFRRTTYGQKFQGRLTITADESTGATYMESSLRSDDTAVYYCARE
45 KVSVLTTGGKSLHYFEYWGKGT

e 301 cadena ligera (LC)

50 MAELTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSRLAWYQQKRGQAPSLLIY
DTSSRATGVPARFSASGSGTQFTLTISLQSEDFALYYCQQYNDWPSTF
55 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.

60 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.

65 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.

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:

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;

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.

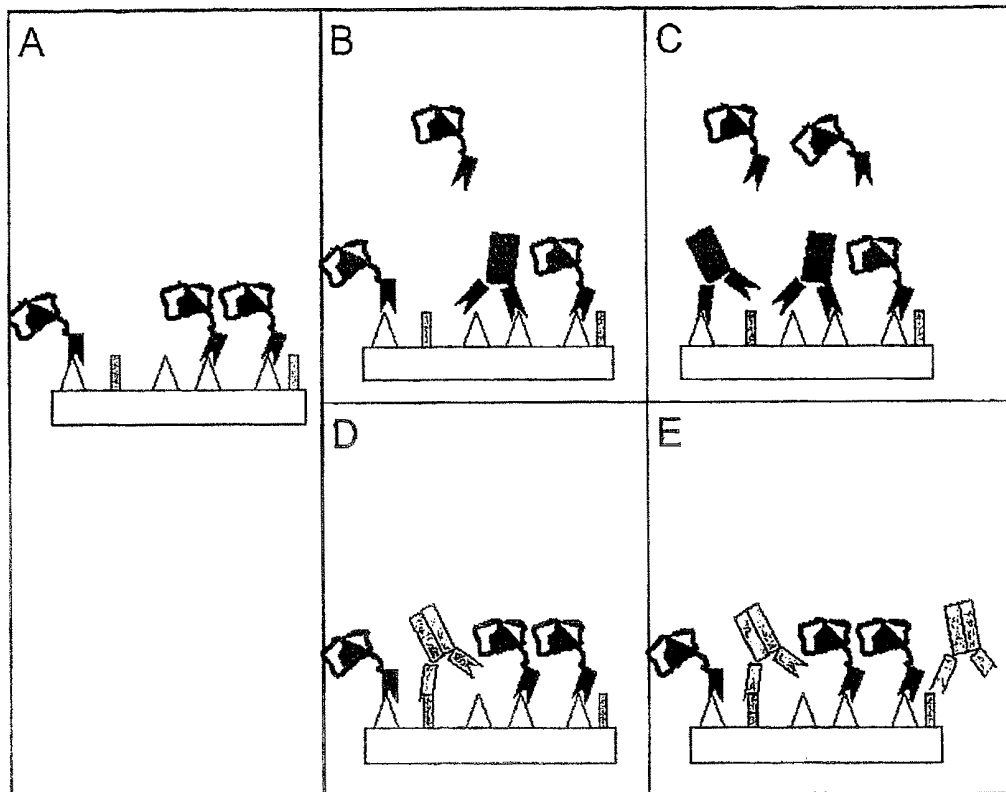


FIGURA 1

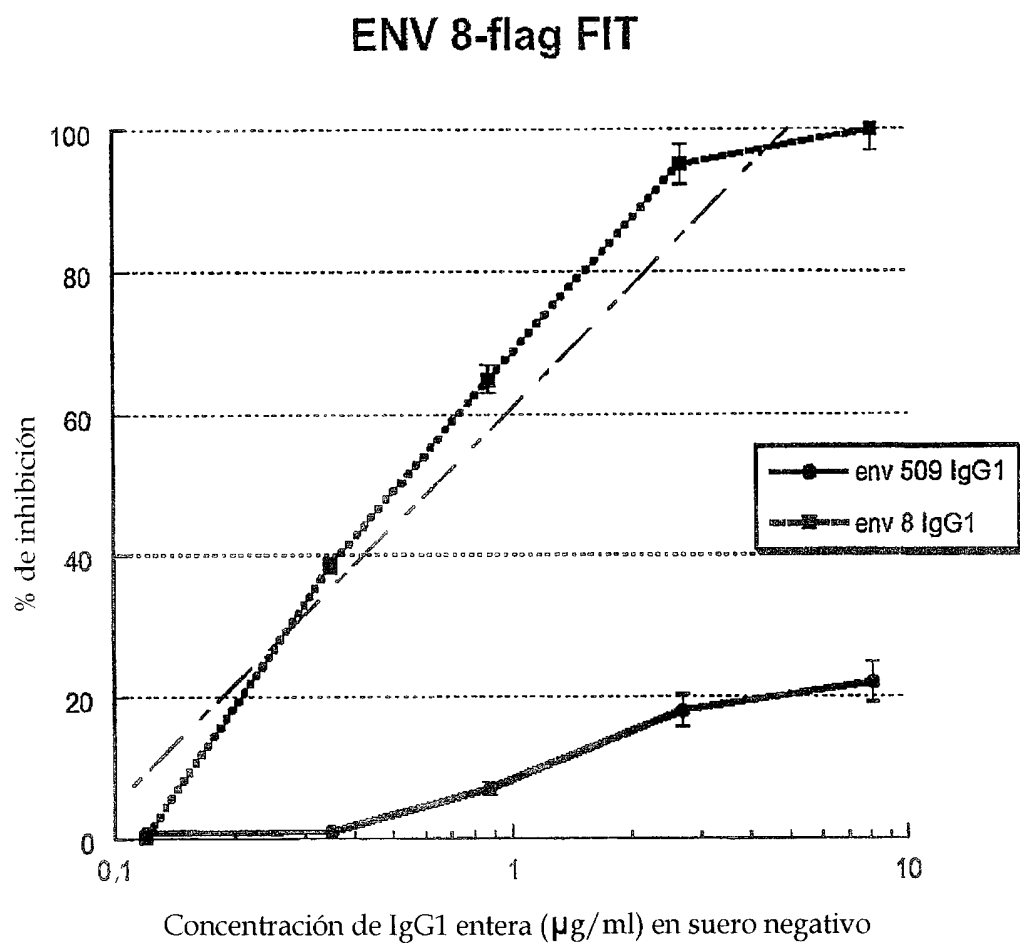


FIGURA 2A

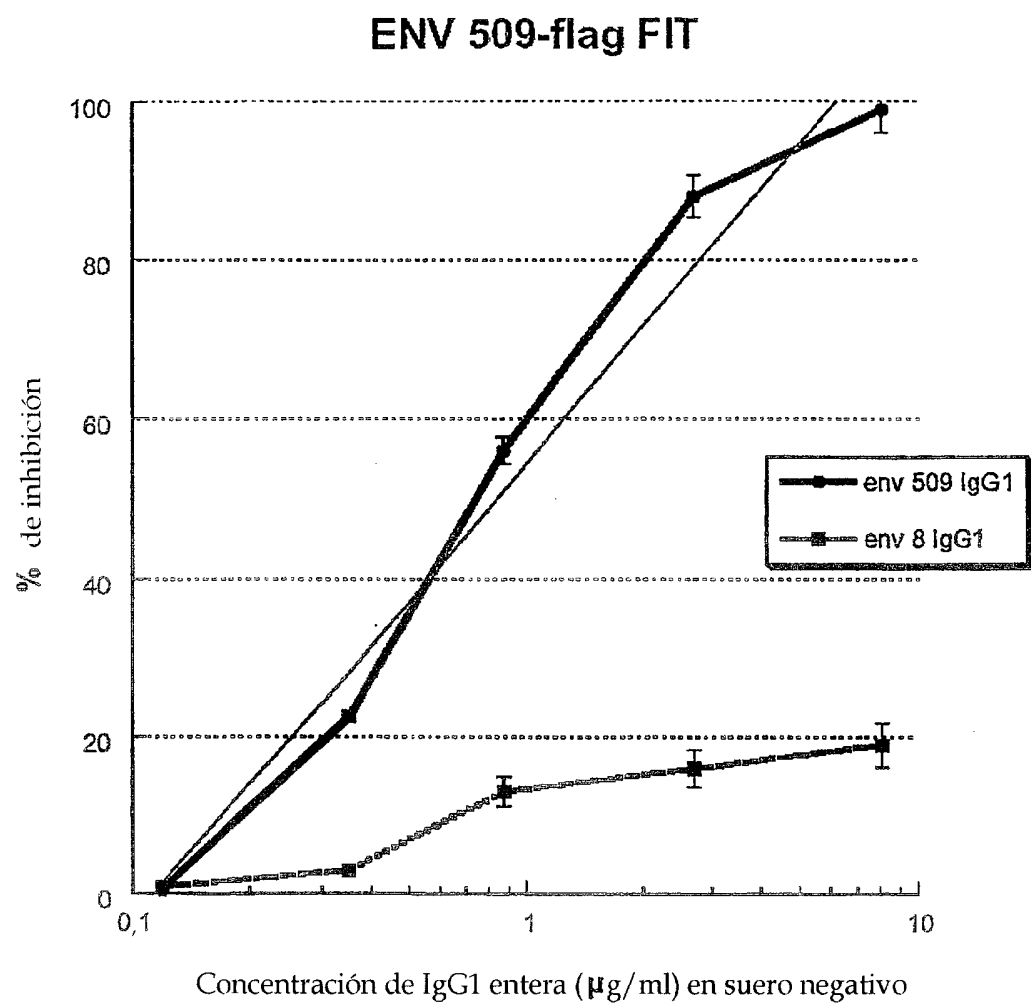


FIGURA 2B

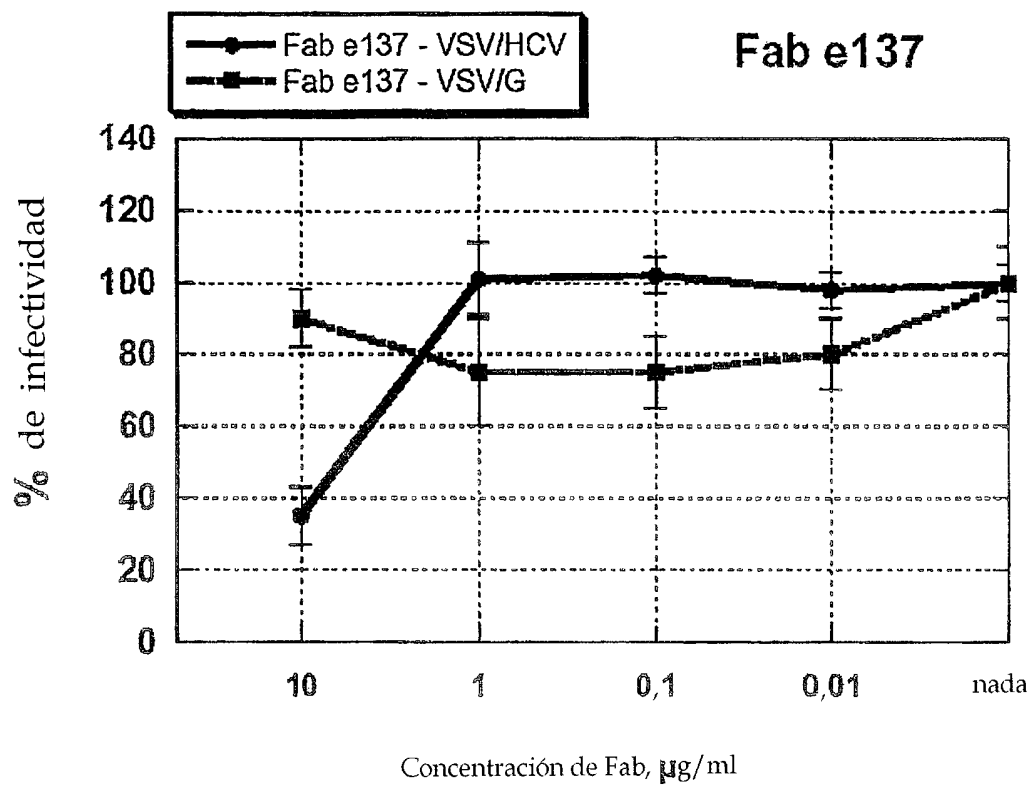


FIGURA 3A

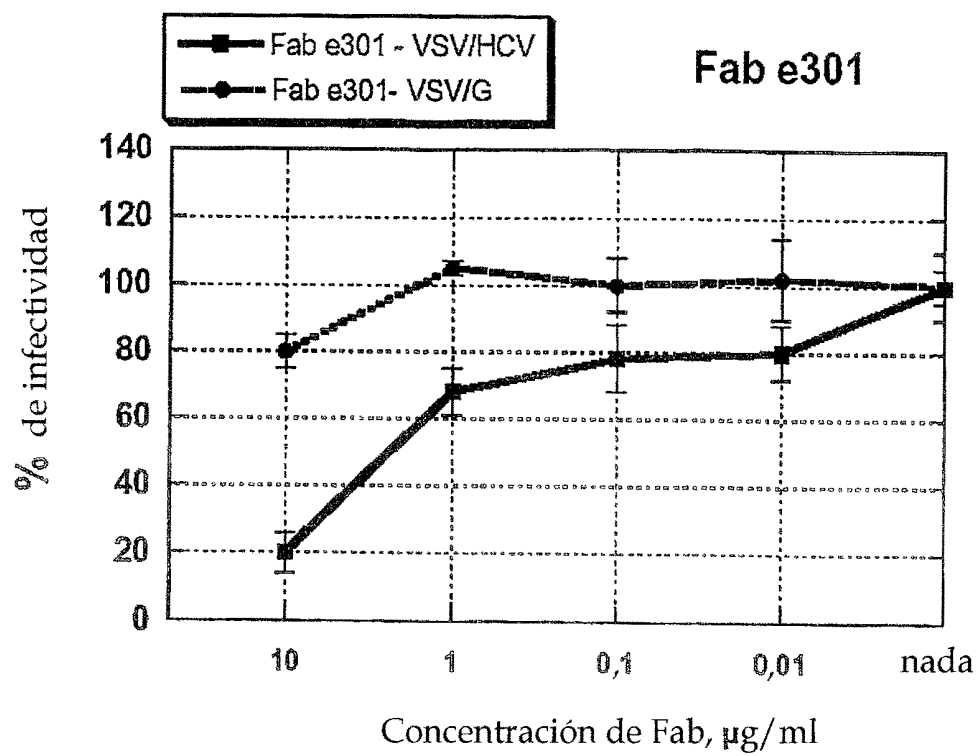


FIGURA 3B

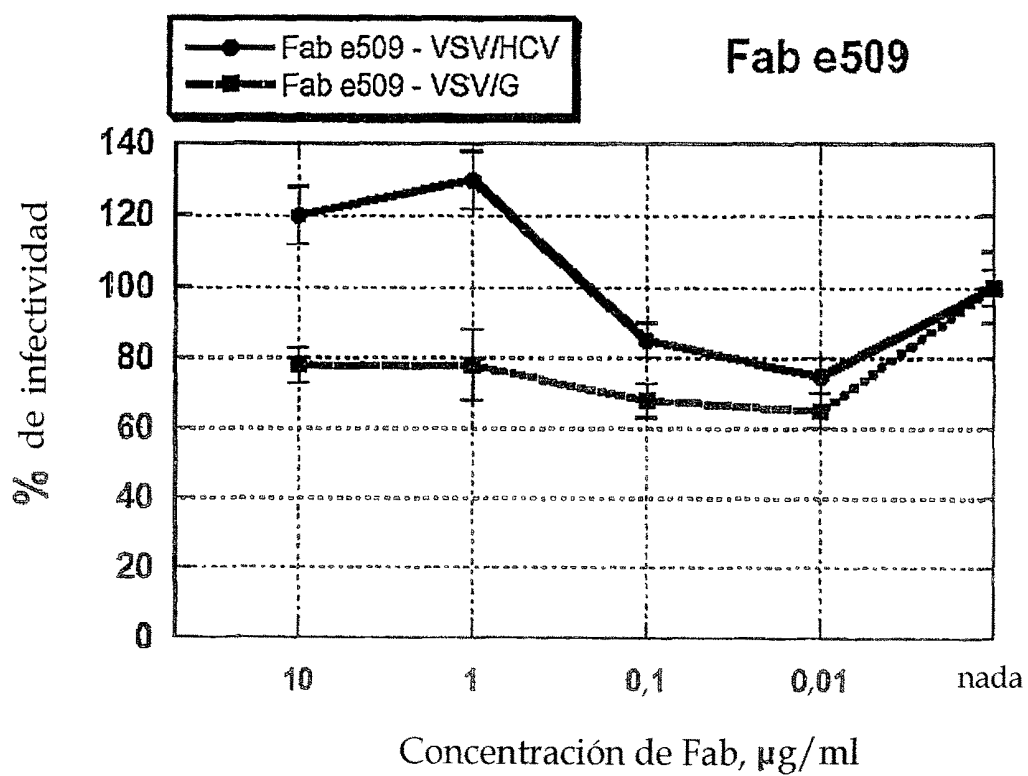


FIGURA 3C

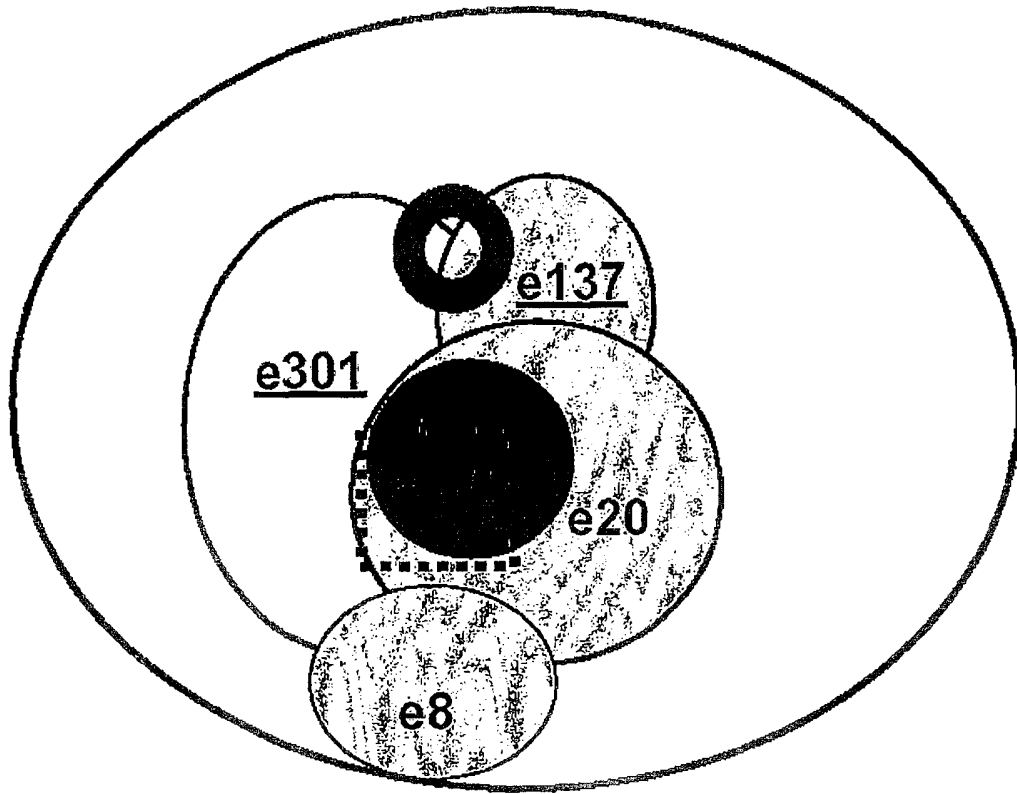


FIGURA 4

ES 2 314 179 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Burioni, Roberto

<120> FRAGMENTOS FAB DE ANTICUERPO MONOCLONAL HUMANO DIRIGIDOS CONTRA LA GLUCOPROTEÍNA E2 DEL VHC Y QUE ESTÁN DOTADOS DE ACTIVIDAD NEUTRALIZANTE *IN VITRO*

<130> 30068

<150> IT RM2002A/000049

<151> 2002-01-30

<160> 24

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 119

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

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

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

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

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

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

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

Asp Gly 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

<210> 2

<211> 104

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

ES 2 314 179 T3

<400> 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
20
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80
25
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

<210> 3

30 <211> 124

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

35 <400> 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 Gly Arg Gly
20 25 30
45
Val Ser Tyr Trp Gly Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45
50
Trp Ile Gly His Ile Tyr Tyr Phe Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Pro Ser
50 55 60
55
Leu Asn Asn Arg Ala Thr Ile Ser Ile Asp Ser Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80
60
Ser Leu Lys Leu Lys Ser Val Thr Ala Ser Asp Thr Ala Leu Tyr Phe
85 90 95
65
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 <210> 4

<211> 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

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

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
20          50          55          60

Ser Gly Ser Asp Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
25          65          70          75          80

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr
          100

```

30 <210> 5

<211> 116

<212> PRT

35 <213> *Homo sapiens*

<400> 5

```

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

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

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

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

Ile Thr Ala Asp Asp Ser Thr Gly Thr Ala Phe Leu Glu Leu Thr Arg
55 65          70          75          80

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

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

Gly Gln Gly Thr
          115

```

65 <210> 6

<211> 102

ES 2 314 179 T3

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

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

```

30 <210> 7

<211> 120

<212> PRT

35 <213> *Homo sapiens*

<400> 7

```

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

```

65 <210> 8

<211> 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          10          15

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

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

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

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

30 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

```

<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

40 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

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

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

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
20  Tyr Asp Thr Ser Ser Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Ala
      50      55      60
25  Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
      65      70      75      80
30  Glu Asp Phe Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asp Trp Pro Ser
      85      90      95
    Thr Phe Gly Gln Gly Thr
      100

```

<210> 11

<211> 118

<212> PRT

35 <213> *Homo sapiens*

<400> 11

```

Leu Leu Glu Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val
1      5      10      15
40  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
    Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Pro
      85      90      95
65  Arg Gln Val Thr Ile Leu Arg Gly Pro Lys Ala Leu Ser Pro Trp Asp
      100      105      110
    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
40 His Phe Gly Gln Gly Thr
100

<210> 13

<211> 357

<212> ADN

40 <213> *Homo sapiens*

<400> 13

45 ctgctcgagc agtctggagc tgagggtgaag atgcctgggg ccacagtga ggtctcctgc 60
cagtcttccc gttacacctt caccagttac ggtatcggct ggggtgcgaca ggccccctgga 120
50 caggggcttg agtggatggg atggatcagc ggatacacc atgagacaaa atatgcacag 180
agtttccagg gcagagtcac catgaccgca gagacatcca cgggcacagc gtatatggag 240
ttgaggagcc tgcggtctga cgacacggcc acatattact gcgcgagaga tggaggaggg 300
55 aggggtggtag tgccgcctac tcatctacgt gcttttgatg tctgggggtca agggacg 357

<210> 14

60 <211> 312

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

65

ES 2 314 179 T3

<400> 14

	atggccgagc tcaccagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc	60
5	ctctcctgca gggccagtca cagagtcaat aacaacttct tagcctggta tcagcagaaa	120
	cctggccagg ctcccaggct cctcatctct ggtgcatcta ccagggccac tggcatccca	180
	gacaggttca gtggcagtgg gtctggaaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag	240
10	cctgatgatt ttgcagttta ttattgtcag cagtatggtg actcacctct ttattctttt	300
	ggccagggga cc	312

15 <210> 15
<211> 372
<212> ADN

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 15

25	ctgctcgagt ctggcccagg actggtgaag ccttcacaga cctgtccct cactgcacc	60
	gtctccggtg tctccatcag ttacggtggg cgtggcggtt cctactgggg ttgggtccgc	120
	cagtccccag ggaagggcct ggagtggatt ggccacatct actactttgg agacaccttc	180
30	tacaaccctg cctcaacaa tcgagctacc atatcaatag actcatccaa aaaccagttc	240
	tccctcaagc tcaagtctgt gactgcctca gacacggccc tgtatttctg tgccaggagc	300
35	accctacagt attttgactg gttattgaca cgggaggctg cctactccat tgacttctgg	360
	ggccagggaa ta	372

40 <210> 16
<211> 306
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

45 <400> 16

50	atggccgagc tcaccagtc tccatccttc ctgtctgcat ctgttggaga ccgagtcacc	60
	atcacttgcc gggccagtca gggcgtcacc attcttttag cctgggtatca gcaaaagcca	120
	gggaaacccc ctaaggccct gatttatgct gcatcgcttt tgcaaagtgg ggtcccatca	180
55	aggttcagcg gcagtggttc tgacacagat ttcactctca caatcagcag cctacagcct	240
	gaagattctg caacttatta ctgtcaacaa cttaacactt acccgtggac gttcggccag	300
	gggacc	306

60 <210> 17
<211> 348
<212> ADN
65 <213> *Homo sapiens*

ES 2 314 179 T3

<400> 17

	ctgctcgagc agtcaggggc tgaggtgaag aagcctgggt cctcggtgaa ggtctcctgc	60
5	aaggcttctg gagaccacta tggatcaac tgggtgcgac agggccctgg acaagggctg	120
	gagtggatgg gcggtatcat cctgtctttt ggcacaacta cctacgcaca gaagttccag	180
	ggcagagcca ccattaccgc ggacgactcc acggggacgg cctttttgga gctgaccaga	240
10	ctgacatttg acgacacggc cgtctatttc tgtgcgacac ctcaccaact gcatgtcctc	300
	cggggcggtg aagccctctc cccctgggac tactggggcc aggggaacc	348

15

<210> 18

<211> 306

<212> ADN

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 18

25	atggccgagc tcacccagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc	60
	ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agtaacttag cctggtacca gcagaaacgt	120
	ggccaggctc ccagtctcct catctacgga acatctacca gggccactgg tatcccagcc	180
30	aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttactctca ccatcagcag cctgcagtct	240
	gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag tataatgatt ggccctccac ctccggccaa	300
35	gggaca	306

<210> 19

<211> 360

40 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 19

45

	ctgctcgagc agtctgggac tgaagtaaaa gtgcccgggt cctcgttgaa ggtctcctgc	60
	aagacttctg gaggcacctt cagcaccat accttcagct ggggtgcgaca ggcccttggg	120
50	cagggacttg agtggatggg ggggatcacc cctatcattg gcatcgcaaa ctacgcacgg	180
	aacttccagg acagagtcac catcaccgcy gacgaatcca cgagcacggg ctacatggag	240
55	gtgaggaggc tgagatctga ggacacgggc gtatattatt gtgcgaaaac ttcggaagta	300
	acagccacta gagggcggac tttcttctac tccgctatgg acgtctgggg tcaagggacc	360

<210> 20

60 <211> 306

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

65

ES 2 314 179 T3

<400> 20

	atggccgagc tcacccagtc tccatccttc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc	60
5	atcacttgcc gggccagtc gggcataagc aattatttag cctggatca gcaaaaacca	120
	gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccactt tgcaaagtgg ggtcccatcg	180
	aggttcagcg gcagtggatc ttggacagaa ttcactctca caatcagccg cctccagcct	240
10	gaagattttg caacttatta ctgtcaacac cttaatactt acccgtggac gttcggccaa	300
	gggacc	306

15 <210> 21
<211> 354

<212> ADN
20 <213> *Homo sapiens*

<400> 21

25	ctgtctgagc agtctgggtc tgaggatgaag aaacctgggt cctcggtag ggtctcgtgc	60
	acgacttctg gaggcacctt gagcgactat ggtttcaact ggttacgaca ggccctgga	120
	caagggcctg agtggatggg agggatcatt cctttgtttc gaagaacaac ctacggacag	180
30	aagtccagg gcagactcac cattaccgag gacgagcca cgggcgcaac ctacatggag	240

35	ctgagcagcc tgagatctga cgacacggcc gtctattact gtgcgagaga gaaagtctcg	300
	gtcttcacag gcgaaaagtc actccatrac ttggaatatt ggggcaaggg aacc	354

40 <210> 22
<211> 306
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

45 <400> 22

50	atggccgagc tcacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc	60
	ctctcttgca gggccagtc gagtgtagc agcaggtag cctggtagca gcagaaacgt	120
	ggccaggctc ccagtctcct catctatgac acatcttcca gggccactgg tgtccagcc	180
55	aggttcagtg ccagtgggtc tgggacgcag ttcactctca ccacagcag cctgcagctt	240
	gaagattttg cactttatta ctgtcagcag tataatgatt ggccctccac cttcggccaa	300
	gggaca	306

60 <210> 23
<211> 354
<212> ADN
65 <213> *Homo sapiens*

ES 2 314 179 T3

<400> 23

5	ctgctcgagg agtctggggc tgaggtgaag aagccagggc cctcggtgaa ggtctcctgc	60
	aagactttctg gagacacctt cagatatggt atcacgtggg tgcgacaggc ccctggacaa	120
	gggcttgagt ggatgggaca gatcatgcct acgtttgcga cagcaacctt cgcacagagg	180
10	ttccagggca ggtcacgat ttccgcggac gaatccacga gcacagccta cttggagggtg	240
	cgcagcctga gatctgaaga cacggccgtc tattactgtg cgacacctcg ccaagttact	300
	atacttcggg gacctaaagc cctctccctt tgggactact ggggccaggg aacc	354

15

<210> 24

<211> 306

<212> ADN

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 24

25	atggccgagc tcaccagtc tccagccacc ctgtctgcgt ctccagggga aagagcctcc	60
	ctctcctgca gggccagtca gagtgttagt agcaacttag cctggtacca gcagaaacct	120

30

	ggccaggctc ccaggctcct catctctggt gcatccacca gggccactgg tgtcccggcc	180
	aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttactctca ccatcagtag cctgcagtct	240
35	gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag tataataact ggcctcccca ctttggccag	300
	gggacc	306

40

45

50

55

60

65