



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 320 051**

51 Int. Cl.:

C12N 15/62 (2006.01)	C07K 16/10 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)	C12N 15/70 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)	C12N 1/21 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)	A61K 39/42 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)	G01N 33/569 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **97920721 .4**

96 Fecha de presentación : **18.04.1997**

97 Número de publicación de la solicitud: **0937153**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.08.1999**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales humanos específicos del antígeno E2 del virus de la hepatitis C (HCV).**

30 Prioridad: **19.04.1996 US 635109**
17.04.1997 US 844215

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.05.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.05.2009

73 Titular/es: **Molecules of Man AB.**
Mossvägen 12
167 56 Bromma, SE

72 Inventor/es: **Persson, Mats Axel Atterdag y**
Allander, Tobias Erik

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

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

Anticuerpos monoclonales humanos específicos del antígeno E2 del virus de la hepatitis C (HCV).

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a composiciones derivadas de moléculas de inmunoglobulina específicas para el virus de la hepatitis C (HCV). Más particularmente, la invención se refiere a anticuerpos monoclonales recombinantes humanos que son capaces de unirse específicamente al antígeno E2 de HCV.

10 **Antecedentes**

La infección por el virus de la hepatitis (C) se produce en todo el mundo y es la causa principal de hepatitis asociada a transfusiones. Se estima que aparecen 150.000 nuevos casos de infección por HCV cada año en los Estados Unidos. La seroprevalencia de los anticuerpos anti-HCV en los donantes de sangre en todo el mundo se ha demostrado que varía entre 0,02% y 1,23%, con tasas en algunos países de incluso aproximadamente 19%. Además de ser una causa predominante de hepatitis inducida por transfusión, el HCV también es una causa común de hepatitis en individuos expuestos a sangre o a productos hemáticos. De esta manera, los receptores de sangre o de productos hemáticos, usuarios de fármacos intravenosos, pacientes de diálisis renal y víctimas de lesión por punción de aguja representan grupos de alto riesgo de infección por HCV (Alter *et al.*, Infect. Agents Dis. 2:155-166, 1993). Además, la transmisión heterosexual de HCV a través del tracto urogenital, y la transmisión de madre a hijo, ha sido bien documentada (Ohto *et al.*, N. Engl. J. Med. 330:744-750, 1994). Entre otros factores de riesgo asociados a la infección por HCV se incluyen el contacto familiar o en casa con un individuo infectado por HCV y el trabajo sanitario con exposición ocupacional a sangre y a hemodiálisis (Alter *et al.*, JAMA 264:2231-2235). La hepatitis crónica se desarrolla en aproximadamente 25 62% de las infecciones (Alter *et al.*, N. Engl. J. Med. 327:1899-1905, 1992).

La mayoría de las enfermedades hepáticas graves asociadas al HCV resultan de la elevada propensión del agente a causar infección persistente crónica. La cirrosis se produce en aproximadamente 20% de los casos crónicos, de los que 20% a 25% resulta en insuficiencia hepática. Otras secuelas graves asociadas a la infección por HCV es el carcinoma hepatocelular primario.

La secuencia genómica vírica del HCV es conocida, al igual que los procedimientos para obtener la secuencia. Ver, por ejemplo, las publicaciones de patente internacional WO n° 89/04669, n° 90/11089 y n° 90/14436. El virus HCV presenta un genoma de ARN monocatenario de sentido positivo de 9,5 kb y es un miembro de la familia *Flaviridae* de virus. En la actualidad existen 6 genotipos diferentes aunque relacionados de HCV que han sido identificados basándose en análisis filogenéticos (Simmonds *et al.*, J. Gen. Virol. 74:2391-2399, 1993). El virus codifica un único polipéptido que presenta más de 3.000 residuos aminoácidos (Choo *et al.*, Science 244:359-362, 1989; Choo *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2451-2455, 1991; Han *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1711-1715, 1991). El polipéptido se procesa cotraduccionalmente y post-traduccionalmente en proteínas estructurales y no estructurales (NS).

En particular, existen tres proteínas estructurales putativas de HCV, consistentes de la proteína de nucleocápside N-terminal (denominada "núcleo") y dos glucoproteínas de cubierta, "E1" (también denominada E) y "E2" (también denominada E2/NS1) (ver Houghton *et al.*, Hepatology 14:381-388, 1991, para un comentario de proteínas HCV, incluyendo E1 y E2). E1 se detecta en forma de una especie de 32 a 35 kDa y se convierte en una única banda H-sensible de aproximadamente 18 kDa. En contraste, E2 muestra un patrón complejo después de la inmunoprecipitación que es consistente con la generación de múltiples especies (Grakoui *et al.*, J. Virol. 67:1385-13895, 1992; Tomei *et al.*, J. Virol. 67:4017-4026, 1993). Las glucoproteínas E1 y E2 de cubierta de HCV forman un complejo estable que es coinmunoprecipitable (Grakoui *et al.*, J. Virol. 67:1385-1395, 1993; Lanford *et al.*, virology 197:225-235, 1993; Ralston *et al.*, J. Virol. 67:6753-6761, 1993).

El único tratamiento disponible actualmente para la infección crónica por virus de la hepatitis C consiste de terapia de interferón α (IFN- α). Sin embargo, la respuesta de largo plazo a la terapia de interferón únicamente se produce en 10% a 30% de los individuos tratados, y existe evidencia de que diferentes cepas de HCV varían mucho en la sensibilidad de las mismas a la terapia de interferón, siendo los virus de tipo 1 los más refractarios. Además, en la terapia de interferón comúnmente se producen efectos secundarios similares a los de la gripe, tales como náusea, depresión, fatiga y trombocitopenia. Además, la terapia de interferón no está indicada en individuos inmunocomprometidos. Por consiguiente, existe una necesidad de enfoques terapéuticos más eficaces en el tratamiento de la infección crónica por HCV. A este respecto, se ha observado cierto efecto con la utilización de la ribivirina o las terapias de combinación con urosidol e IFN- α .

En particular, las proteínas E1 y E2 de HCV son de interés considerable debido a que las vacunas recombinantes basadas en estas moléculas se ha demostrado que protegen frente al reto experimental con HCV en estudios con primates (Choo *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:1294-1298, 1994). Las composiciones de hiperinmunoglobulina de moléculas de anticuerpo anti-HCV obtenidas de muestras de donante se han descrito para el tratamiento de HCV en individuos infectados y en la prevención de la infección por HCV en los grupos de alto riesgo (publicación de solicitud de patente europea n° 447.984, publicada el 25 de septiembre de 1991). Debido a que estas composiciones se preparan a partir de productos hemáticos del donante, se encuentra asociado con su utilización un riesgo inherente debido a

la posible presencia de agentes infecciosos contra, por ejemplo, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y el HCV. Por consiguiente, las preparaciones de hiperinmunoglobulina deben cribarse cuidadosamente e inactivarse todos los agentes infecciosos previamente a la administración a sujetos humanos.

5 Es conocido que la respuesta inmunológica a HCV en individuos normales incluye componentes humorales y mediados por células (Koziel *et al.*, J. Virol. 67:7522-7532, 1993; Alter *et al.*, N. Engl. J. Med. 321:1494-1500, 1989). Además, varios informes han indicado que los anticuerpos inducidos contra HCV podrían neutralizar la infectividad de los virus (Shimizu *et al.*, J. Virol. 68:1494-1500, 1994; Farci *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:7792-7796, 1994). Estos resultados ofrecen la expectativa de que pueda desarrollarse una terapia eficaz basada en anticuerpos.
10 A este respecto, la administración de una preparación de anticuerpos anti-HCV neutralizadores altamente reactivos a un individuo con riesgo de infección o que ha sido expuesto recientemente al agente, proporcionará inmunidad pasiva inmediata al individuo. Este tipo de inmunizaciones de manera similar se esperaría que presentase éxito en sujetos tanto normales como inmunocomprometidos. Preferentemente los anticuerpos neutralizadores presentarían una amplia reactividad cruzada contra diferentes cepas de HCV, y serían monoclonales con el fin de controlar los
15 efectos de la utilización de los anticuerpos *in vivo*.

Por varias razones prácticas y económicos, los anticuerpos monoclonales murinos han sido utilizados generalmente en investigación y en medicina. Pueden cultivarse anticuerpos murinos contra una amplia diversidad de moléculas, tales como antígenos de HCV y fusionarse con una célula de mieloma para producir hibridomas que pueden cultivarse para producir anticuerpos monoclonales contra los antígenos de HCV (Kohler *et al.*, Nature 256:495-497, 1975). Aunque estos anticuerpos monoclonales podrían presentar especificidades de unión de antígeno de valor terapéutico significativo, la utilización de dichos anticuerpos murinos en el tratamiento de la enfermedad humana ha sido limitada debido a que dichas moléculas son inmunogénicas en el sistema inmunológico humano. De esta manera, los anticuerpos monoclonales murinos han sido utilizados más comúnmente en inmunodiagnósticos. A este respecto, los
25 anticuerpos monoclonales murinos contra polipéptidos E2 de cubierta de HCV putativos han sido descritos para la utilización en la detección del HCV en las muestras biológicas (patente US nº 5.308.750, de Mehta *et al.*).

Por consiguiente, sigue existiendo una necesidad en la técnica de proporcionar anticuerpos monoclonales humanos contra el antígeno E2 de HCV, en los que los anticuerpos monoclonales presentan una amplia reactividad cruzada con
30 aislados heterólogos de HCV.

Descripción resumida de la invención

La presente invención se basa en el descubrimiento de moléculas de anticuerpo monoclonal humano que muestran
35 afinidad de unión inmunológica para el antígeno polipéptido E2 de HCV, y que presenta reactividad cruzada contra diferentes cepas de HCV. Las moléculas de anticuerpo monoclonal se obtuvieron de una biblioteca combinatorial que se construyó a partir de una fuente no inmunizada infectada por HCV. Las presentes moléculas generalmente comprenden una molécula de anticuerpo Fab humano que muestra afinidad de unión inmunológica para el antígeno E2 de HCV.

40 Por consiguiente, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal humano recombinante que muestra afinidad de unión inmunológica para un antígeno E2 de virus de la hepatitis C (HCV), en el que el anticuerpo comprende una molécula Fab que comprende una parte ligante de unión del antígeno E2 de HCV de una región variable de cadena pesada $\gamma 1$ humana (V_H) y una parte ligante de antígeno E2 de HCV de una región variable de cadena ligera
45 κ (V_L), en el que:

- la región V_H es:

(i) la secuencia de aminoácidos contigua ilustrada en cualquiera de las figuras 1A a 1G, o
50 (ii) una secuencia de aminoácidos contigua con una identidad de secuencia de por lo menos 90% con cualquiera de (i), y

- la región V_L es:

(a) la secuencia de aminoácidos contigua ilustrada en cualquiera de entre las figuras 2A a 2G, o
55 (b) una secuencia de aminoácidos contigua con una identidad de secuencia de por lo menos 90% con cualquiera de (a),
60

en el que el anticuerpo monoclonal presenta reactividad cruzada con antígenos E2 de los genotipos 1a y 1b del HCV.

La invención también proporciona una composición de vacuna que comprende un anticuerpo monoclonal de la
65 invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La invención también proporciona un complejo de unión que comprende un anticuerpo monoclonal de la invención y un grupo detectable unido al mismo.

La invención también proporciona un procedimiento para detectar la presencia de partículas de HCV en una muestra que se sospecha que contiene HCV, que comprende: (a) incubar la muestra con el complejo de unión de la invención, en el que la incubación se lleva a cabo bajo condiciones que permiten la formación de un complejo de anticuerpo-antígeno, y (b) detectar la presencia o la ausencia del complejo de anticuerpo-antígeno.

La invención también proporciona un procedimiento para realizar el seguimiento del progreso de un tratamiento terapéutico anti-HCV de un sujeto mamífero infectado por HCV, que comprende: (a) obtener una muestra biológica de dicho sujeto, (b) incubar la muestra con el complejo de unión de cualquiera de la invención, en la que la incubación se lleva a cabo bajo condiciones que permiten la formación de un complejo de anticuerpo-antígeno, y (c) detectar la presencia o la ausencia del complejo de anticuerpo-antígeno.

La invención también proporciona una molécula de ácido nucleico aislada codificante de un anticuerpo recombinante de la invención, en la que una primera secuencia de nucleótidos codifica la parte ligante del antígeno E2 de HCV de una región variable de cadena pesada $\gamma 1$ humana (V_H) y una segunda secuencia de nucleótidos codifica la parte ligante de antígeno E2 de HCV de una región variable de cadena ligera κ humana (V_L).

La invención también proporciona una molécula de ácidos nucleicos aislada, que comprende una primera secuencia de nucleótidos codificante de una región variable de cadena pesada $\gamma 1$ (V_H) de una molécula Fab humana obtenida a partir de una biblioteca combinatorial, en la que dicha molécula Fab muestra afinidad de unión inmunológica para un antígeno E2 del virus de la hepatitis C (HCV), en el que la primera secuencia de nucleótidos es:

(i) la secuencia contigua ilustrada en cualquiera de las figuras 4A a 4G, o

(ii) una secuencia contigua de nucleótidos con una identidad de secuencia de por lo menos 90% respecto a cualquiera de (i),

en la que la molécula Fab presenta reactividad cruzada con los antígenos E2 de los genotipos 1a y 1b de HCV.

La invención también proporciona una molécula de ácidos nucleicos aislada, que comprende una primera secuencia de nucleótidos codificante de una parte ligante de una región variable de cadena ligera κ (V_L) de una molécula Fab humana obtenida de una biblioteca combinatorial, en la que dicha molécula Fab muestra afinidad de unión inmunológica para un antígeno E2 de virus de la hepatitis C (HCV), en la que la primera secuencia de nucleótidos es:

(i) la secuencia contigua de cualquiera de entre aquellas ilustradas en las figuras 3A a 3G, o

(ii) una secuencia de nucleótidos contigua con una identidad de secuencia de por lo menos 90% respecto a cualquiera de (i),

en la que la molécula Fab presenta reactividad cruzada con los antígenos E2 de los genotipos 1a y 1b del HCV.

La invención también proporciona una molécula de ácidos nucleicos de la invención, que además comprende una tercera secuencia de nucleótidos codificante de un primer péptido secuencia líder, en el que dicha tercera secuencia de nucleótidos se encuentra operablemente ligada al extremo 5' terminal de la primera secuencia de nucleótidos y es capaz de causar la secreción de la región variable de cadena pesada codificada al expresarse la región variable de cadena pesada codificada y el primer péptido secuencia líder, y una cuarta secuencia de nucleótidos codificante de un segundo péptido de secuencia líder, en el que dicha cuarta secuencia de nucleótidos se encuentra operablemente ligada al extremo 5' terminal de la segunda secuencia de nucleótidos y es capaz de causar la secreción de la región variable de cadena ligera codificada al expresarse la región variable de cadena ligera codificada y el segundo péptido de secuencia líder.

La invención también proporciona un vector de expresión, que comprende la molécula de ácidos nucleicos de la invención operablemente ligada a secuencias de control que dirigen la transcripción de la primera y segunda secuencias de nucleótidos, en la que dichas primera y segunda secuencia de nucleótidos pueden transcribirse y traducirse en una célula huésped.

La invención también proporciona una célula procariótica transformada con un vector de expresión de la invención, en la que las secuencias de control son capaces de dirigir la transcripción de la primera y segunda secuencias de nucleótidos en una célula huésped procariótica.

La invención también proporciona una célula huésped de mamífero transformada con un vector de expresión de la invención, en la que las secuencias de control son capaces de dirigir la transcripción de la primera y segunda secuencias de nucleótidos en una célula huésped de mamífero.

La invención también proporciona un procedimiento para producir una molécula recombinante, que comprende: (a) proporcionar una población de células huésped transformadas de la invención, y (b) expresar dicha molécula Fab recombinante a partir del vector de expresión.

La invención también proporciona la utilización de un anticuerpo monoclonal de la invención en la preparación de una vacuna para el tratamiento o la prevención de una infección por HCV de un sujeto mamífero.

Dichas realizaciones y otras realizaciones de la presente invención resultarán evidentes para los expertos ordinarios en la materia en vista de la exposición en la presente memoria.

Breve descripción de las figuras

Las figuras 1A a 1G ilustran las secuencias de aminoácidos de cadena pesada $\gamma 1$ deducidas de los clones de molécula Fab 1:5, 1:7, 1:11, L3, L1, A8 y A12, respectivamente. Las regiones CDR de cada cadena pesada se han identificado en las figuras como "CDR1", "CDR2" y "CDR3".

Las figuras 2A a 2G ilustran las secuencias de aminoácidos de cadena ligera κ deducidas de los clones moleculares de Fab 1:5, 1:7, 1:11, L3, L1, A8 y A12, respectivamente. Las regiones CDR (CDR1, CDR2 y CDR3) de cada cadena ligera también se han identificado tal como se indica con respecto a las figuras 1A a 1G, anteriormente.

Las figuras 3A a 3G ilustran las secuencias de ácidos nucleicos de la cadena ligera κ de los clones moleculares de Fab 1:5, 1:7, 1:11, L3, L1, A8 y A12, respectivamente.

Las figuras 4A a 4G ilustran las secuencias de ácidos nucleicos de cadena pesada $\gamma 1$ de los clones moleculares de Fab 1:1, 1:7, 1:11, L3, L1, A8 y A12, respectivamente.

La figura 5 ilustra los resultados de un ensayo de neutralización llevado a cabo tal como se describe en el Ejemplo 12, en el que se evaluó la capacidad de las moléculas Fab expresadas a partir de los clones moleculares de Fab 1:5, 1:7, 1:11 y L3 bloquean la unión del polipéptido E2 de HCV a las células diana.

Descripción detallada de la invención

La práctica de la presente invención utiliza, a menos que se indique lo contrario, procedimientos convencionales de virología, microbiología, biología molecular y técnicas de ADN recombinante comprendidos dentro de los conocimientos de la técnica. Estas técnicas se encuentran completamente explicadas en la literatura (ver, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2a edición, 1989); DNA Cloning: A Practical Approach, vols. I y II (D. Glover, editor); Oligonucleotide Synthesis (N. Gait, editor, 1984); Nucleic Acid Hybridization (B. Hames y S. Higgins, editores, 1985); Transcription and Translation (B. Hames y S. Higgins, editores, 1984); Animal Cell Culture (R. Freshney, editor, 1986); Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, Fundamental Virology, 2a edición, vols. I y II (B.N. Fields y D.M. Knipe, editores), 1984).

Tal como se utiliza en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", "uno", "el" y "la" incluyen las referencias plurales a menos que el contenido indique claramente lo contrario.

A. Definiciones

Durante la descripción de la presente invención se utilizarán los términos siguientes, y pretenden presentar la definición indicada posteriormente.

Tal como se utilizan en la presente invención, las expresiones "virus de la hepatitis C" o "HCV" indican el virus de una manera genérica y de esta manera las expresiones no se encuentran limitadas a ninguna secuencia o aislado víricos particulares de HCV. En este aspecto, existen 6 genotipos diferentes de HCV con 11 subtipos diferentes que han sido identificados basándose en análisis filogenéticos (Houghton, M., "Hepatitis C Viruses", Fields Virology, 3a edición, 1996; Fields *et al.*, editores, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA; Simmonds *et al.*, J. Gen. Virol. 74:2391-2399, 1993). Además, la comparación de las secuencias genómicas de nucleótidos de diferentes aislados de HCV en todo el mundo establece que HCV es altamente heterogéneo, con una amplia diversidad de secuencias en los 74 aislados. De esta manera, las expresiones "virus de la hepatitis C" y "HCV" tal como se utilizan en la presente invención comprenden genéricamente la totalidad de dichos aislados.

Las expresiones "un antígeno derivado de un polipéptido E1", un "antígeno de polipéptido E1" y "antígeno E1 de HCV" se utilizan intercambiamente en la presente invención y comprenden las moléculas de una región E1 de HCV. El término "polipéptido", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a un polímero de aminoácidos y no se refiere a un tramo específico del producto; de esta manera, los péptidos, oligopéptidos y proteínas se encuentran comprendidos dentro de la definición de polipéptido. Este término tampoco se refiere ni excluye modificaciones del polipéptido posteriores a la expresión, por ejemplo glucosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones y similares. Los antígenos polipéptidos E1 pueden derivarse físicamente de la región E1 del HCV o producirse recombinante o sintéticamente, basándose en la secuencia conocida. La región E1 madura de HCV1 se inicia aproximadamente en el aminoácido 192 de la poliproteína y continua hasta aproximadamente el aminoácido 383.

Un polipéptido o secuencia de aminoácidos "derivada de" una región de HCV designada se refiere a un polipéptido que presenta una secuencia de aminoácidos idéntica a la de un polipéptido codificado en la secuencia, o una parte del mismo en la que la parte consiste de por lo menos 3 a 5 aminoácidos, preferentemente por lo menos 4 a 7 aminoá-

cidos, más preferentemente por lo menos 8 a 10 aminoácidos, y todavía más preferentemente por lo menos 11 a 15 aminoácidos, o una secuencia que sea inmunológicamente identificable con un polipéptido codificado en la secuencia. Esta terminología también incluye un polipéptido expresado a partir de una región designada de HCV.

Las expresiones “un antígeno derivado de un polipéptido E2”, “un antígeno de polipéptido E2” y “un antígeno E2 de HCV” se utilizan intercambiamente en la presente invención y comprenden moléculas de una región E2 del HCV. Estas moléculas pueden derivarse físicamente de la región o producirse recombinante o sintéticamente, basándose en la secuencia conocida. La región E2 madura de HCV1 se cree que se inicia en aproximadamente el aminoácido 384-385.

Para los fines de la presente invención, los polipéptidos E1 y E2 del HCV se definen con respecto al número de aminoácido de la poliproteína codificada por el genoma del HCV1, denominando la metionina iniciadora, posición 1. Sin embargo, debe indicarse que un antígeno de un “polipéptido E1” o un “polipéptido E2” no se encuentra limitada a polipéptido que presenten una secuencia exacta de HCV1. En efecto, el genoma del HCV se encuentra en un estado de flujo constante y contiene varios dominios variables que muestran grados relativamente elevados de variabilidad entre aislados. Resulta fácilmente evidente que las expresiones comprenden antígenos de los polipéptidos E1 y E2 procedentes de cualquiera de los diversos aislados de HCV, incluyendo aislados que presentan cualquiera de los 6 genotipos del HCV descrito en Simmonds *et al.*, J. Gen. Virol. 74:2391-2399, 1993. A este respecto, las regiones E1 o E2 correspondientes en un aislado heterólogo de HCV pueden determinarse fácilmente mediante alineación de las secuencias de los dos aislados de manera que la alineación de las secuencias sea máxima. Esto puede llevarse a cabo con cualquiera de entre varios paquetes de software informático, tales como ALIGN 1.0, disponible de la University of Virginia, Department of Biochemistry (At. Dr. William R. Pearson) (ver Pearson *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-2448, 1988).

Además, las expresiones “antígeno de polipéptido E1” y “antígeno de polipéptido E2” comprenden los polipéptidos que incluyen modificaciones de la secuencia nativa, tales como delecciones, adiciones y sustituciones internas (generalmente de naturaleza conservadora). Estas modificaciones pueden ser deliberadas, tal como las provocadas mediante mutagénesis sitio-dirigida, o accidentales, tal como mediante sucesos mutacionales de aparición natural.

Un “complejo E1/E2” se refiere a un complejo de los polipéptidos E1 y E2 indicados anteriormente. El modo de asociación de E1 y E2 en dicho complejo es inmaterial. En efecto, dicho complejo puede formarse espontáneamente simplemente mezclando los polipéptidos E1 y E2 que se han producido individualmente. De manera similar, al coexpresarse y secretarse, los polipéptidos E1 y E2 pueden formar un complejo espontáneamente en el medio. La formación de un “complejo E1/E2” se determina fácilmente utilizando técnicas estándares de detección de proteínas, tales como la electroforesis en gel de poliacrilamida y las técnicas inmunológicas, tales como la inmunoprecipitación.

El término “anticuerpo” comprende preparaciones de anticuerpo monoclonal, así como preparaciones, incluyendo anticuerpos híbridos, anticuerpos alterados, fragmentos F(ab')₂, moléculas F(ab), fragmentos Fv, anticuerpos de un único dominio, anticuerpos quiméricos y los fragmentos funcionales de los mismos que proporcionan propiedades ligantes inmunológicas de la molécula de anticuerpo parental.

Tal como se utiliza en la presente invención, la expresión “anticuerpo monoclonal” se refiere a una composición de anticuerpo que presenta una población homogénea de anticuerpos. El término no se encuentra limitado por la manera en la que se ha preparado. La expresión comprende moléculas de inmunoglobulina enteras, así como moléculas Fab, fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fv y otras moléculas que muestran propiedades ligantes inmunológicas de la molécula parental de anticuerpo monoclonal. La expresión “anticuerpo monoclonal recombinante” se define en la presente invención como un anticuerpo monoclonal que se ha producido mediante expresión de un polinucleótido recombinante.

La expresión “sitio de unión de antígeno” o “parte de unión” se refiere a la parte de la molécula de inmunoglobulina que participa en la unión del antígeno. El sitio de unión de antígeno está formado por residuos aminoácidos de las regiones variables N-terminales (“V”) de las cadenas pesada (“H”) y ligera (“L”). Tres tramos altamente divergentes dentro de las regiones V de las cadenas pesada y ligera, denominadas “regiones hipervariables”, se encuentran interpuestas entre tramos flanqueantes más conservados conocidas como “regiones de marco” o “FRs”. De esta manera, el término “FR” se refiere a las secuencias de aminoácidos que se encuentran naturalmente entre y contiguas a regiones hipervariables en las inmunoglobulinas. En una molécula de anticuerpo, las tres regiones hipervariables de una cadena ligera y las tres regiones hipervariables de una cadena pesada se encuentran en disposición mutua en el espacio tridimensional para formar una superficie de unión a antígeno. La superficie de unión a antígeno es complementaria a la superficie tridimensional de un antígeno unido, y las tres regiones hipervariables de cada una de las cadenas pesada y ligera se denominan “regiones determinantes de complementariedad”, o “CDRs”.

Tal como se utiliza en la presente invención, las expresiones “unión inmunológica” y “propiedades de unión inmunológica” se refieren a las interacciones no covalentes del tipo producido entre una molécula de inmunoglobulina y un antígeno para el que es específico la inmunoglobulina. La fuerza o afinidad de las interacciones de unión inmunológica pueden expresarse en términos de la constante de disociación (K_d) de la interacción, en la que una K_d más pequeña representa una mayor afinidad. Las propiedades de unión inmunológica de polipéptidos seleccionados pueden cuantificarse utilizando procedimientos bien conocidos de la técnica. Uno de dichos procedimientos implica medir las

tasas de formación y disociación de complejo de sitio de unión de antígeno/antígeno, en los que estas tasas dependen de las concentraciones de las parejas del complejo, de la afinidad de la interacción y de parámetros geométricos que influyen igualmente sobre la tasa en ambos sentidos. De esta manera, tanto la “constante de tasa de unión” (K_{on}) y la “constante de tasa de desunión” (K_{off}) pueden determinarse mediante el cálculo de las concentraciones y las tasas reales de asociación y disociación. La proporción K_{off}/K_{on} permite cancelar todos los parámetros no relacionados con la afinidad, y de esta manera es igual a la constante de disociación K_d . Ver, de manera general, Davies *et al.*, Annual Rev. Biochem. 59:439-473, 1990.

Varias moléculas terapéuticamente útiles son conocidas de la técnica, que comprenden sitios de unión de antígeno que son capaces de mostrar propiedades de unión inmunológica de una molécula de anticuerpo. Una de dichas moléculas es una molécula Fab que comprende un heterodímero que incluye un sitio de unión de antígeno intacto. El enzima pepsina es capaz de cortar las moléculas de IgG para proporcionar varios fragmentos, incluyendo el fragmento “F(ab')₂”, que comprende ambos sitios de unión de antígeno. Puede producirse un fragmento “Fv” mediante corte proteolítico preferente de un IgM, y en raras ocasiones una molécula de inmunoglobulina IgG o IgA. Sin embargo, los fragmentos Fv más comúnmente se derivan utilizando técnicas recombinantes conocidas de la técnica. El fragmento Fv incluye un heterodímero $V_H::V_L$ no covalente que incluye un sitio de unión de antígeno que conserva gran parte de las capacidades de reconocimiento y de unión de antígeno de la molécula de anticuerpo nativa (Inbar *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69:2659-2662, 1972; Hochman *et al.*, Biochem. 15:2706-2710, 1976; y Ehrlich *et al.*, Biochem. 19:4091-4096, 1980).

Un molécula de polipéptido o una secuencia de aminoácidos “derivada de” una molécula Fab o secuencia de ácidos nucleicos de Fab designada se refiere a un polipéptido que presenta una secuencia de aminoácidos idéntica a la de un polipéptido Fab codificado en la secuencia, o una parte de la misma en la que la parte consiste de por lo menos 3 a 5 aminoácidos, preferentemente por lo menos 4 a 7 aminoácidos, más preferentemente por lo menos 8 a 10 aminoácidos, y todavía más preferentemente por lo menos 11 a 15 aminoácidos.

Una molécula de polipéptido Fv monocatenario (“sFv”) es un heterodímero $V_H::V_L$ unido covalentemente que se expresa a partir de una fusión génica que incluye genes codificantes de V_H y de V_L unidos por un linker codificante de péptido (Huston *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85(16):5879-5883, 1988). Se han descrito varios procedimientos para identificar estructuras químicas para la conversión de cadenas polipeptídicas ligeras y pesadas agregadas naturalmente aunque separadas químicamente procedentes de una región del anticuerpo V en una molécula Sfv que se plegará en una estructura tridimensional sustancialmente similar a la estructura de un sitio de unión a antígeno (ver, por ejemplo, las patentes US nº 5.091.513 y nº 5.132.405, de Huston *et al.*, y nº 4.946.778, de Ladner *et al.*).

Cada una de las moléculas anteriormente indicadas incluye un conjunto de CDRs de cadena pesada y de cadena ligera, respectivamente interpuestos entre una FR de cadena pesada y una de cadena ligera que proporcionan soporte a las CDRs y definen la relación espacial mutua de las CDRs. Tal como se utiliza en la presente invención, la expresión “conjunto de CDRs” se refiere a las tres regiones hipervariables de una región V de cadena pesada o de cadena ligera. Desde el extremo N-terminal de una cadena pesada o ligera, estas regiones se denominan “CDR1”, “CDR2” y “CDR3”, respectivamente. Por lo tanto, un sitio de unión de antígeno incluye seis CDRs, que comprenden el conjunto de CDRs de una región V de cadena pesada y de cadena ligera.

Tal como se utiliza en la presente invención, la expresión “conjunto de FRs” se refiere a las cuatro secuencias de aminoácidos flanqueantes que circundan las CDRs de un conjunto de CDRs de una región V de cadena pesada o ligera. Algunos residuos de FR pueden contactar antígeno unido; sin embargo, las FRs principalmente son responsables del plegamiento de la región V en el sitio de unión de antígeno, particularmente los residuos de FR directamente contiguos a las CDRs.

Los términos “purificado” y “aislado”, en referencia a una secuencia polipeptídica o de nucleótidos, se refieren a que la molécula indicada se encuentra presente en ausencia total de otras macromoléculas biológicas del mismo tipo. Los términos “purificado” y “aislado” tal como se utilizan en la presente invención preferentemente se refieren a que se encuentran presentes por lo menos 75% en peso, más preferentemente por lo menos 85% en peso, todavía más preferentemente por lo menos 95% en peso, y todavía más preferentemente por lo menos 98% en peso, de macromoléculas biológicas del mismo tipo. Una “molécula de ácidos nucleicos aislada que codifica un polipéptido particular” se refiere a una molécula de ácidos nucleicos que se encuentra sustancialmente libre de otras moléculas de ácidos nucleicos que no codifican el polipéptido de la invención; sin embargo, la molécula puede incluir algunas bases o grupos adicionales que no afectan negativamente a las características básicas de la composición. De esta manera, por ejemplo, una molécula de ácidos nucleicos aislada que codifica la parte ligante de una región variable de cadena pesada particular de un anticuerpo consiste esencialmente de la secuencia de nucleótidos codificante de la parte ligante de la invención (por ejemplo el conjunto de CDRs interpuesto entre el conjunto de FRs).

El término “homología” se refiere al porcentaje de identidad entre dos polinucleótidos o grupos de polipéptido. La correspondencia entre dos o más secuencias puede determinarse mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, puede determinarse la homología mediante comparación directa de la información de secuencia en dos moléculas de polipéptido. Alternativamente, puede determinarse la homología mediante hibridación de polinucleótidos bajo las condiciones en que forman dúplex estables entre regiones homólogas (por ejemplo aquellas que se utilizarían previamente a la digestión S_1), seguido de la digestión con una o más nucleasas monocatenarias específicas, seguido de la determinación de tamaños de los fragmentos digeridos. Dos secuencias de ADN o de polipéptido son “sustancialmente homólogas”

cuando por lo menos aproximadamente 60% (preferentemente por lo menos aproximadamente 80%, y todavía más preferentemente por lo menos aproximadamente 90%) de los nucleótidos o aminoácidos se corresponden a lo largo de un tramo definido de la molécula.

5 Las expresiones “molécula de ADN recombinante” o “molécula de ácidos nucleicos recombinantes” se utilizan en la presente invención para referirse a un polinucleótido de origen genómico, ADNc, semisintético o sintético que, en virtud de su origen o manipulación: (1) no se encuentra asociado a la totalidad o a parte de un polinucleótido con el que se encuentra asociado en la Naturaleza, (2) se encuentra unido a un polinucleótido diferente de aquél con que se encuentra asociado en la Naturaleza, o (3) no se encuentra en la Naturaleza. de esta manera, la expresión comprende
10 moléculas de ácidos nucleicos “derivadas sintéticamente”.

La expresión “molécula de ácidos nucleicos” tal como se utiliza en la presente invención se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos. Esta expresión se refiere únicamente a la estructura primaria de la molécula y de esta manera incluye ADN y ARN de doble cadena y de una
15 cadena. También incluye tipos conocidos de modificaciones, por ejemplo marcajes que son conocidos de la técnica, metilación, “caperuzas”, sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales por un análogo, modificaciones internucleótidas, tales como, por ejemplo, aquéllas con enlaces no cargados (por ejemplo metilfosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y con enlaces cargados (por ejemplo fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), aquellos que contienen grupos colgantes, tales como, por ejemplo, proteínas (incluyendo, por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos de señal, poli-L-lisina, etc.), aquellos con intercalantes (por ejemplo acridina, soralén, etc.), aquellos
20 que contienen quelantes (por ejemplo metales, metales radioactivos, boro, metales oxidantes, etc.), aquellos que contienen alquilantes, aquellos con enlaces modificados (por ejemplo ácidos nucleicos anoméricos alfa, etc.), así como formas no modificadas del polinucleótido.

25 Una “secuencia codificante” es una molécula de ácidos nucleicos que se traduce en un polipéptido, habitualmente mediante ARNm, al situarla bajo el control de las secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia codificante pueden determinarse con un codón de inicio de traducción en el extremo 5’ terminal y un codón de parada de traducción en el extremo 3’ terminal. Una secuencia codificante puede incluir, aunque sin limitarse a ellos, secuencias de ADNc y de nucleótidos recombinantes.

30 La expresión “secuencia de control” se refiere a secuencias de ácidos nucleicos que resultan necesarias para llevar a cabo la expresión de las secuencias codificantes a las que se encuentran ligados. La naturaleza de dichas secuencias de control difiere dependiendo del organismo huésped: en procariotas, dichas secuencias de control incluyen generalmente promotor, sitio de unión ribosómica y secuencia de terminación de transcripción; en eucariotas, generalmente
35 dichas secuencias de control incluyen promotores y secuencia de terminación de transcripción. La expresión “secuencias de control” pretende incluir, como mínimo, todos los componentes la presencia de los cuales resulta necesaria para la expresión de una secuencia codificante, y también puede incluir componentes adicionales la presencia de los cuales resulta ventajosa, por ejemplo secuencias líder y secuencias de pareja de fusión.

40 La expresión “operablemente ligado” se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes descritos se encuentran en una relación que les permite funcionar de la manera pretendida. Una secuencia de control “operablemente ligada” a una secuencia codificante se encuentra ligada de una manera que se consigue la expresión de la secuencia codificante bajo condiciones compatibles con las secuencias de control.

45 Tal como se utiliza en la presente invención, la expresión “casete de expresión” se refiere a una molécula que comprende por lo menos una secuencia codificante operablemente ligada a una secuencia de control que incluye todas las secuencias de nucleótidos necesarias para la transcripción de copias clonadas de la secuencia codificante y la traducción de los ARNm en una célula huésped apropiada. Dichos casetes de expresión pueden utilizarse para expresar genes eucarióticos en una diversidad de huéspedes, tales como bacterias, cianófitas, células vegetales, células
50 de levadura, células de insecto y células animales. Bajo la invención, los casetes de expresión pueden incluir, aunque sin limitarse a ellos, vectores de clonación, plásmidos diseñados específicamente, virus o partículas víricas. Los casetes además pueden incluir un origen de replicación para la replicación autónoma en las células huésped, marcadores seleccionables, diversos sitios de restricción, un potencial de elevado número de copia y promotores fuertes.

55 El término “vector” se refiere a cualquier elemento genético, tal como un plásmido, fago, trasposón, cósmido, cromosoma, virus, etc., que es capaz de replicarse cuando se encuentra asociado con los elementos de control apropiados, y que puede transferir secuencias génicas entre las células. De esta manera, el término incluye vehículos de clonación y de expresión, así como vectores víricos.

60 Las expresiones “células huésped recombinantes”, “células huésped”, “cultivos celulares” y otros términos similares indican, por ejemplo, microorganismos, células de insecto y células de mamífero que pueden utilizarse, o han sido utilizados, como receptores de ADN de vector recombinante u otro ADN de transferencia, e incluyen la progenie de la célula original que ha sido transformada. Se entiende que la progenie de una única célula parental no necesariamente debe ser completamente idéntico al pariente original o en morfología o en complemento de ADN genómico o de ADN
65 total, debido a mutaciones naturales, accidentales o deliberadas. Entre los ejemplos de células huésped de mamífero se incluyen las células de ovario de hámster chino (CHO) y las células renales de mono (COS).

Específicamente, tal como se utiliza en la presente invención, "línea celular" se refiere a una población de células capaz de crecimiento y división continuos o prolongados *in vitro*. Con frecuencia las líneas celulares son poblaciones clonales derivadas de una única célula progenitora. Además es conocido de la técnica que pueden producirse cambios espontáneos o inducidos en el cariotipo durante el almacenamiento o la transferencia de dichas poblaciones clonales.

5 Por lo tanto, las células derivadas de la línea celular a la que se hace referencia puede no ser exactamente idénticas a las células o cultivos ancestrales, y la línea celular a la que se hace referencia incluye dichas variantes. La expresión "líneas celulares" también incluye las células inmortalizadas.

El término "transformación" tal como se utiliza en la presente invención se refiere a la inserción de un polinucleótido exógeno en una célula huésped, con independencia del procedimiento utilizado para la inserción, por ejemplo la incorporación directa, la transducción, la conjugación (factor F) o la electroporación. El polinucleótido exógeno puede mantenerse en forma de un vector no integrado, por ejemplo un plásmido, o alternativamente puede integrarse en el genoma del huésped.

15 B. Procedimientos generales

La presente invención se basa en la generación de nuevas moléculas de anticuerpo monoclonal humano de reactividad cruzada con otros genotipos, específicas de la glucoproteína de cubierta E2 del HCV. Los anticuerpos monoclonales se obtienen utilizando una biblioteca combinatorial de anticuerpo construida a partir de una fuente no inmunizada, y resultan útiles en la prevención, terapia y diagnóstico de la infección por HCV en sujetos mamíferos. Más particularmente, los anticuerpos monoclonales se obtienen a partir de bibliotecas combinatoriales que expresan moléculas Fab sobre la superficie de bacteriófagos ADN filamentosos utilizando técnicas de selección de antígenos.

Preparación de bibliotecas combinatoriales

Las bibliotecas combinatoriales para los fines de la presente invención pueden construirse utilizando técnicas conocidas, tales como las descritas por Chanock *et al.*, Infect. Agents Dis. 2:118-131, 1993, y Barbas, III *et al.*, Methods: Comp. Meth. Enzymol. 8:94-103, 1995. Las células productoras de anticuerpo pueden obtenerse a partir de un donante infectado por VIH no inmunizado, de, por ejemplo, plasma, suero, líquido espinal, linfa, las secciones

25 externas de los tractos respiratorio, intestinal y genitourinario, lágrimas, saliva, leche, glóbulos blancos y mielomas. Preferentemente la fuente de células productoras de anticuerpos son los linfocitos que han sido obtenidos a partir de una médula ósea o de una muestra de sangre periférica de un sujeto no inmunizado.

Los linfocitos pueden obtenerse de la muestra y aislarse y extraerse el ARN total utilizando procedimientos conocidos. Ver, por ejemplo, Chomczynski *et al.*, Anal. Biochem. 162:156-159, 1987. El ARN puede transcribirse inversamente en ADNc de primera cadena utilizando cebado de oligo-dT. El ADN codificante de fragmentos de cadena pesada (Fd) y de cadena ligera de inmunoglobulina puede amplificarse utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para proporcionar todos el material genético necesario para producir moléculas Fab ligantes de antígeno (Saiki *et al.*, Nature 324:163, 1986; Scharf *et al.*, Science 233:1076-1078, 1986 y patentes US nº 4.683.195 y nº 4.683.202.

30 Al conducir la amplificación por PCR, preferentemente pueden utilizarse varios cebadores conocidos para seleccionar las secuencias de cadena pesada $\gamma 1$ y de cadena ligera κ (Persson *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2432-2436, 1991; Kang *et al.*, Methods: Comp. Meth. Enzymol. 2:111-118, 1991). Los productos de PCR se agrupan separadamente en preparaciones de ADN de cadena pesada y de cadena ligera, y después se purifican, por ejemplo utilizando electroforesis en gel. Las moléculas de ADN de cadena pesada y ligera purificadas seguidamente se digieren con enzimas de restricción adecuados y los productos digeridos se purifican y se ligan en un sistema de vector fagémido adecuado (Yang *et al.*, J. Mol. Biol. 254:392-403, 1995; Barbas, III, *et al.*, Methods: Comp. Meth. Enzymol. 8:94-103, 1995; Barbas, III, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7978-7982, 1991). Son conocidos de la técnica varios sistemas de vector fagémido adecuados; sin embargo, un vector particularmente preferente para la utilización en la presente invención es el vector pComb3H, que ha sido descrito anteriormente (Barbas, III, *et al.*, *supra*, 1995). Al utilizar el

45 vector fagémido Pcomb3h, se clona ADN de cadena pesada en el fagémido de la invención contiguo o cadena arriba de la secuencia de dominio de anclaje C-terminal de la proteína III de cubierta (cpIII) del fagémido. La proteína cpIII es una proteína membranal integral y de esta manera sirve como anclaje de membrana para el ensamblaje de Fab.

Los vectores generalmente incluyen marcadores seleccionables conocidos de la técnica. Por ejemplo, el vector fagémido pComb3H contiene el gen bacteriano de resistencia a la ampicilina (B-lactamasa). El vector también incluye primera y segunda secuencias líder apropiadas, dispuestas respectivamente cadena arriba de los sitios de inserción de las secuencias codificantes de la cadena pesada y de la cadena ligera, de manera que los productos de expresión de las regiones codificantes de las cadenas pesada y ligera son enviados al periplasma tras su producción en una célula huésped adecuada. En pComb3H, estas secuencias líder son secuencias *pelB*, secuencias *ompA* o combinaciones de

55 las mismas.

El sistema de vector fagémido que contiene el ADN de inmunoglobulina humana seguidamente se introduce en una célula huésped bacteriana adecuada (por ejemplo utilizando electroforesis), en la que el fagémido expresa un polipéptido de fusión cadena pesada-cpIII y un polipéptido de cadena ligera, cada uno de los cuales es enviado hasta el periplasma de la célula huésped por las secuencias líder asociadas. La célula huésped bacteriana transfectada que contiene el vector fagémido se selecciona mediante cultivo en un medio adecuado que contiene un agente selectivo correspondiente al marcador seleccionable del vector fagémido (por ejemplo ampicilina).

65

El rescate del ADN de fagémido se lleva a cabo utilizando técnicas conocidas. En particular, la célula huésped transfectada se infecta con un fago ayudante que codifica varios productos de expresión necesarios en trans para el empaquetamiento del ADN de fagémido en partículas víricas recombinantes. De esta manera, se empaquetan copias monocatenarias de ADN fagémido en partículas víricas que, tras abandonar la célula huésped, incorporan moléculas fágicas cpVIII y reciben caperuzas de un número limitado de moléculas fágicas de cpIII (algunas de las moléculas de cpvIII y de cpIII se encuentran unidas a moléculas Fab). Las partículas fágicas recombinantes que muestran moléculas Fab (denominadas "Fabs fágicos") contienen los genes correspondientes de cadena pesada y de cadena ligera dentro del genoma empaquetado.

En el caso de que la técnica anteriormente indicada se ponga en práctica utilizando una biblioteca inicial de fagémidos, el procedimiento de rescate genera una biblioteca de fagos recombinantes que expresan moléculas Fab (una biblioteca de expresión fágica). El procedimiento de rescate resulta además en la amplificación de la biblioteca inicial, de manera que se generan múltiples copias de cada clon de fago recombinante (conjuntamente con cada conjunto de partes ligantes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina). A continuación, la biblioteca de expresión fágica se "tamiza" frente al antígeno E2 de HCV para seleccionar las moléculas Fab que son capaces de unirse selectivamente a dicho antígeno. Más particularmente, el procedimiento de tamizado puede llevarse a cabo mediante la aplicación de una suspensión que contiene la biblioteca de expresión fágica, sobre el antígeno E2 de HCV que ha sido inmovilizado en un recipiente plástico de reacción según procedimientos conocidos (Burton *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10134-10137, 1991). Tras la incubación bajo condiciones de unión adecuadas, se eliminan las partículas fágicas unidas no específicamente mediante lavados repetidos. Los Fabs fágicos específicos de antígeno E2 de HCV resultantes seguidamente se eluyen del antígeno insoluble utilizando un pH bajo, o en presencia de exceso de antígeno E2 soluble. El procedimiento de tamizado se repite varias veces, infectando las células huésped bacterianas con el fago eluido después de cada ronda de tamizado para propagar clones de Fab fágico para cada ronda de tamizado posterior (Samuelsson *et al.*, Virology 207:495-502, 1995).

En la presente invención, el procedimiento de tamizado se desarrolló específicamente para seleccionar moléculas Fab altamente potentes y de reactividad cruzada con otros genotipos, específicas del antígeno E2 del HCV. En particular, el genotipo del HCV sérico del sujeto humano infectado por HCV no inmunizado del que se obtuvieron las células productoras de anticuerpo se determinó mediante procedimientos conocidos (Widell *et al.*, J. Med. Virol. 44:272-279, 1994). La selección de la reactividad cruzada de cepas fue proporcionada por el diseño experimental, en el que se llevó a cabo el procedimiento de tamizado utilizando antígeno E2 de HCV derivado de un genotipo de HCV diferente del genotipo del HCV del donante humano infectado. Además, el antígeno E2 utilizado en los procedimientos de tamizado se seleccionó de manera que proporcionase antígeno E2 de HCV de sustancialmente la misma conformación que la esperada para dicho antígeno *in vivo*.

Se utilizaron dos preparaciones de proteínas de cubierta de HCV recombinante para proporcionar el antígeno de selección en el procedimiento de tamizado anteriormente descrito, una molécula de E2 de CHO "conformacional" y un complejo CHO E1/E2. La molécula E2 conformacional se construyó, expresó y secretó a partir de células CHO recombinantes tal como ha descrito anteriormente Spaete *et al.*, Virology 188:819-830, 1992, purificando seguidamente utilizando procedimientos conocidos (Rosa *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:1759-1763, 1996). Se construyó y se expresó una preparación de E1/E2 acoplado recombinante a partir de células CHO recombinantes tal como se describe en Spaete *et al.*, *supra*, 1992, purificando después utilizando procedimientos conocidos (Choo *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:1294-1298, 1994). Tras la purificación, los antígenos de selección se inmovilizaron en un recipiente plástico de reacción tal como se ha descrito anteriormente.

Los clones individuales que mostraban afinidad de unión superior para el antígeno de selección se seleccionaron y se expresaron mediante cultivo de células huésped infectadas en el medio selectivo hasta alcanzar un volumen de células adecuado. Las células huésped bacterianas se peletizaron y después se resuspendieron en medio. Tras una incubación adecuada, las células se centrifugaron y el contenido periplasmático se liberó mediante técnicas de congelación-descongelación. Tras eliminar los residuos bacterianos mediante centrifugación, el sobrenadante que contenía Fab se transfirió a recipientes adecuados y se almacenó para la utilización posterior.

Tras expresar los Fabs seleccionados, pueden determinarse las características de unión de las moléculas Fab seleccionadas. En particular, se determinó la afinidad de las moléculas Fab para el antígeno E2 de HCV utilizando una técnica de ELISA de inhibición (ver, por ejemplo, Persson *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2432-2436, 1991; Rath *et al.*, J. Immun. Methods 106:245-249, 1988). Los clones que expresaban moléculas Fab de alta potencia (por ejemplo con una afinidad de por lo menos aproximadamente $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, y preferentemente de por lo menos aproximadamente $1,7 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, según determinación con una ELISA de inhibición) se identificaron para la secuenciación.

El ADN fágico (plásmido) procedente de clones que mostraban una unión de alta potencia en el procedimiento de selección por tamizado se aislaron y se obtuvo ADN monocatenario mediante PCR utilizando cebadores (uno de los cuales, por ejemplo, se encontraba biotinilado en el extremo 5') que se hibridaban cadena arriba y cadena abajo de las regiones de clonación de inmunoglobulina. Tras la PCR, se obtuvo ADN monocatenario mediante desnaturalización del ADN bajo condiciones alcalinas y absorbiendo las cadenas de ADN biotinilado sobre un soporte sólido. Se llevaron a cabo reacciones de secuenciación dideoxi según procedimiento conocidos (Sanger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463-5467, 1977) utilizando cebadores marcados que hibridaban en dirección 3' respecto a la unión entre las regiones variables y constantes (Kabat *et al.*, en: Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4a edición, U.S. Dept. of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office, 1987). Los productos de reacción se corrieron

en un secuenciador automatizado (por ejemplo A.L.F., disponible de Pharmacia Biotech). La información de secuencia de ácidos nucleicos obtenida de esta manera se analizó para proporcionar secuencias codificantes para las partes de cadena pesada y de cadena ligera de las moléculas Fab monoclonales seleccionadas. Se identificaron múltiples copias de los mismos clones mediante comparaciones de los datos de secuencias. Además, se obtuvieron las secuencias de aminoácidos deducidas utilizando procedimientos conocidos.

Utilizando la información de secuencias de ácidos nucleicos anterior, también pueden producirse secuencias codificantes para las moléculas Fab sintéticamente utilizando procedimientos conocidos. Las secuencias de nucleótidos pueden diseñarse con los codones apropiados para la secuencia de aminoácidos particular deseada. En general, se seleccionan los codones preferentes para el huésped pretendido en el que se expresarán las secuencias. Las secuencias completas se ensamblan generalmente a partir de oligonucleótidos solapantes preparados mediante procedimientos estándares y se ensamblan en secuencias codificantes completas (ver, por ejemplo, Edge, Nature 292:756, 1981; Nambair *et al.*, Science 223:1299, 1984; Jay *et al.*, J. Biol. Chem. 259:6311, 1984).

15 *Sistemas de expresión*

Tras aislar o sintetizar las secuencias codificantes de las partes de cadena pesada y de cadena ligera de las moléculas Fab, pueden clonarse en cualquier vector o replicón adecuado para la expresión; por ejemplo pueden utilizarse de sistemas de expresión bacterianos, de mamífero, de levadura y víricos. Son conocidos para los expertos en la materia numerosos vectores de clonación y se describen posteriormente. La selección de un vector de clonación apropiado es opcional.

i. Expresión en células bacterianas

Pueden utilizarse sistemas de expresión bacterianos para producir moléculas Fab. Entre los elementos de control para la utilización en sistemas bacterianos se incluyen promotores, que opcionalmente contienen secuencias de operador, y sitios de unión ribosómica. Entre los promotores útiles se incluyen secuencias derivadas de enzimas metabolizadores de azúcares, tales como galactosa, lactosa (lac) y maltosa. Entre los ejemplos adicionales se incluyen secuencias de promotor derivadas de enzimas biosintéticos, tales como triptófano (trp), el sistema promotor β -lactamasa (bla), PL del bacteriófago λ y T7. Además, pueden utilizarse promotores sintéticos, tales como el promotor tac. Los sistemas de promotor β -lactamasa y lactosa se describen en Chang *et al.*, Nature 281:544, 1979; los sistemas de promotor fosfatasa alcalina y triptófano (trp) se describen en Goeddel *et al.*, Nucleic Acids Res. 8:4057, 1980 y en la patente EP n° 36.776, y los promotores híbridos, tales como el promotor tac, se describen en la patente US n° 4.551.433 y en deBoer *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:21-25, 1983. Sin embargo, también resultan adecuados otros promotores bacterianos útiles para la expresión de proteínas eucarióticas. Un experto en la materia podría ligar operablemente dichos promotores a las moléculas Fab por ejemplo, tal como se describe en Siebenlist *et al.*, Cell 20:269, 1980, utilizando linkers o adaptadores para suministrar cualquier sitio de restricción requerido. Los promotores para la utilización en sistemas bacterianos también contienen generalmente una secuencia de Shine-Dalgarno (SD) operablemente ligada al ADN codificante de la molécula Fab. Para las células huésped procarióticas que no reconocen y procesan la secuencia de señal del polipéptido nativo, la secuencia de señal puede sustituirse por una secuencia de señal procariótica seleccionada, por ejemplo de entre el grupo de la fosfatasa alcalina, la penicilinas, lpp, o los líderes de enterotoxina II termoestables. El origen de replicación del plásmido pBR322 resulta adecuado para la mayoría de las bacterias Gram-negativas.

Los sistemas anteriormente indicados resultan particularmente compatibles con *Escherichia coli*. Sin embargo, resulta posible utilizar numerosos otros sistemas en huéspedes bacterianos, incluyendo organismos Gram-negativos o Gram-positivos, tales como especies de *Bacillus*, *Streptococcus* spp., *Streptomyces* spp., especies de *Pseudomonas*, tales como *P. aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* o *Serratia marcescans*, entre otros. Entre los procedimientos para introducir ADN exógeno en estos huéspedes típicamente se incluyen la utilización de CaCl_2 u otros agentes, tales como cationes divalentes y DMSO. También puede introducirse ADN en las células bacterianas mediante electroporación, inyección nuclear o fusión de protoplasto, tal como se describe generalmente en Sambrook *et al.*, 1989, citado anteriormente. Estos ejemplos son ilustrativos, y no limitativos. Preferentemente la célula huésped debe secretar cantidades mínimas de enzimas proteolíticos. Alternativamente, resultan adecuados procedimientos de clonación *in vitro*, por ejemplo PCR u otras reacciones de polimerasa de ácidos nucleicos.

Las células procarióticas utilizadas para producir las moléculas Fab de la presente invención se cultivan en medios adecuados, tal como se describe generalmente en Sambrook *et al.*, citado anteriormente.

ii. Expresión en células de levadura

También pueden utilizarse sistemas de expresión levadura para producir las moléculas Fab de la invención. Se han desarrollado vectores de expresión y de transformación, replicones extracromosómicos o vectores integrantes, para la transformación en muchas levaduras. Por ejemplo, se han desarrollado vectores de expresión para, entre otras, las siguientes levaduras: *Saccharomyces cerevisiae*, tal como se describe en Hinnen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:1929, 1978; Ito *et al.*, J. Bacteriol. 153:163, 1983; *Candida albicans*, tal como se describe en Kurtz *et al.*, Mol. Cell. Biol. 6:142, 1986; *Candida maltosa*, tal como se describe en Kunze *et al.*, J. Basic Microbiol. 25:141, 1985; *Hansenula polymorpha*, tal como se describe en Gleeson *et al.*, J. Gen. Microbiol. 132:3459, 1986, y Roggenkamp *et al.*, Mol. Gen. Genet. 202:302, 1986; *Kluyveromyces fragilis*, tal como se describe en Das *et al.*, J. Bacteriol. 158:1165,

1984; *Kluyveromyces lactis*, tal como se describe en De Louvencourt *et al.*, J. Bacteriol. 154:737, 1983, y Van den Berg *et al.*, Bio/Technology 8:135, 1990; *Pichia gillierimondii*, tal como se describe en Kunze *et al.*, J. Basic Microbiol. 25:141, 1985; *Pichia pastoris*, tal como se describe en Cregg *et al.*, Mol. Cell. Biol. 5:3376, 1985, y en las patentes US nº 4.837.148 y nº 4.929.555; *Schizosaccharomyces pombe*, tal como se describe en Beach y Nurse, Nature 300:706, 5 1981, y *Yarrowia lipolytica*, tal como se describe en Davidow *et al.*, Curr. Genet. 10:380, 1985, y Gaillardin *et al.*, Curr. Genet. 10:49, 1985, huéspedes *Aspergillus*, tales como *A. nidulans*, tal como se describe en Ballance *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 112:284-289, 1983; Tilburn *et al.*, Gene 26:205-221, 1983, y Yelton *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:1470-1474, 1984, y *A. niger*, tal como se describe en Kelly e Hynes, EMBO J. 4:475-479, 1985; *Trichoderma reesia*, tal como se describe en la patente EP nº 244.234, y hongos filamentosos, tales como, por 10 ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, tal como se describe en la patente WO nº 91/00357.

Son conocidas secuencias de control para vectores levadura y entre ellas se incluyen regiones de promotor de genes tales como la alcohol deshidrogenasa (ADH), tal como se describe en la patente EP nº 284.044, la enolasa, la glucoquinasa, la glucosa-6-fosfato isomerasa, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAP o GAPDH), la hexoquinasa, la 15 fosfofructoquinasa, la 3-fosfoglicerato mutasa y la piruvato quinasa (PyK), tal como se describe en la patente EP nº 329.203. El gen PHO5 de levadura, codificante de fosfatasa ácida, también proporciona secuencias de promotor útiles, tal como se describe en Myanohara *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:1, 1983. Entre otras secuencias de promotor adecuadas para la utilización con huéspedes levadura se incluyen los promotores para la 3-fosfoglicerato quinasa, tal como se describe en Hitzeman *et al.*, J. Biol. Chem. 255:2073, 1980, u otros enzimas glucolíticos, tales como la piruvato descarboxilasa, la triosafosfato isomerasa y la fosfoglucosa isomerasa, tal como se describe en Hess *et al.*, J. Adv. 20 Enzyme Reg. 7:149, 1968, y Holland *et al.*, Biochemistry 17:4900, 1978. Entre los promotores de levadura inducibles con la ventaja adicional de que la transcripción se encuentra controlada por las condiciones de cultivo se incluyen, de la lista anteriormente indicada y otros, las regiones de promotor para la alcohol deshidrogenasa 2, el isocitocromo C, la fosfatasa ácida, los enzimas degradativos asociados con el metabolismo del nitrógeno, la metalotioneína, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y los enzimas responsables de la utilización de la maltosa y la galactosa. Los vectores y promotores adecuados para la utilización en la expresión en levaduras se describen adicionalmente en Hitzeman, patente EP nº 073.657. Los intensificadores de levadura también se utilizan ventajosamente con promotores de levadura. Además, los promotores sintéticos que no se encuentran en la Naturaleza también funcionan como promotores de 25 levadura. Por ejemplo, pueden unirse secuencias activadoras cadena arriba (UAS) de un promotor de levadura con la región de activación de transcripción de otro promotor de levadura, creando un promotor híbrido sintético. Entre los ejemplos de dichos promotores híbridos se incluyen la secuencia reguladora ADH unida a la región de activación de transcripción de la GAP, tal como se describe en las patentes US nº 4.876.197 y nº 4.880.734. Entre otros ejemplos de promotores híbridos se incluyen promotores que consisten de las secuencias reguladoras de los genes *ADH2*, *GAL4*, *GAL10* o *PHO5*, combinados con la región de activación de transcripción de un gen de enzima glucolítico tal como 30 *GAP* o *PyK*, tal como se describe en la patente EP nº 164.556. Además, un promotor de levadura puede incluir promotores naturales de origen no levadura que presenten la capacidad de unirse a ARN polimerasa de levadura e iniciar la transcripción.

Otros elementos de control que pueden incluirse en los vectores de expresión de levadura son terminadores, por 40 ejemplo de GAPDH y del gen enolasa, tal como se describe en Holland *et al.*, J. Biol. Chem. 256:1385, 1981, y las secuencias líder que codifican secuencias de señal adecuadas pueden derivarse de genes para proteínas de levadura secretadas, tales como el gen invertasa de levadura, tal como se describe en la patente EP nº 012.873 y en la patente JP nº 62.096.086 el gen factor α , tal como se describe en las patentes US nº 4.58.684, nº 4.546.083 y nº 4.870.008, patente EP nº 324.274 y patente WO nº 89/02463. Alternativamente, los líderes de origen no levadura, tales como un 45 líder interferón, también permiten la secreción en levaduras, tal como se describe en la patente EP nº 060.057.

Los procedimientos para introducir ADN exógeno en huéspedes levadura son bien conocidos de la técnica y típicamente incluyen la transformación de esferoplastos o de células de levadura intactas con cationes alcalinos. Las transformaciones en levaduras pueden llevarse a cabo según el procedimiento descrito en Van Solingen *et al.*, J. Bact. 50 130:946, 1977 y en Hsiao *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:3829, 1979. Sin embargo, también pueden utilizarse otros procedimientos para introducir ADN en las células, tal como mediante inyección nuclear, electroporación o fusión de protoplasto, tal como se describe generalmente en Sambrook *et al.*, citado anteriormente.

Para la secreción en levaduras, la secuencia de señal de polipéptido nativo puede sustituirse por los líderes invertasa, 55 factor α o fosfatasa ácida de levadura. El origen de replicación procedente del origen del plásmido 2μ resulta adecuado para las levaduras. Un gen de selección adecuado para la utilización en levaduras es el gen *trp1* presente en el plásmido de levadura descrito en Kingsman *et al.*, Gene 7:141, 1979, o Tschemper *et al.*, Gene 10:157, 1980. El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano. De manera similar, las cepas de levadura deficientes en *Leu2* (ATCC nº 20.622 o nº 38.626) resultan 60 complementadas por plásmidos conocidos que porta el gen *Leu2*.

Para la producción intracelular de los presentes polipéptidos en levaduras, una secuencia codificante de una proteína de levadura puede ligarse a una secuencia codificante de la molécula Fab para producir una proteína de fusión que 65 puede ser cortada intracelularmente por las células de levadura durante la expresión. Un ejemplo de dicha secuencia líder de levadura es el gen ubiquitina de levadura.

iii. *Expresión en células de insecto*

Las moléculas Fab también puede producirse en sistemas de expresión insecto. Por ejemplo, los vectores de expresión baculovirus (BEVs) son virus de insecto recombinantes en los que la secuencia codificante de un gen foráneo que debe expresarse insertado antes de un promotor de baculovirus en lugar de un gen vírico, por ejemplo polihedrina, tal como se describe en Smith y Summers, patente US nº 4.745.051.

Un constructo de expresión de la presente invención incluye un vector de ADN útil como intermediario para la infección o transformación de un sistema celular de insecto, conteniendo generalmente dicho vector, ADN codificante de un promotor transcripcional de baculovirus, opcionalmente aunque preferentemente seguido cadena abajo por una secuencia de ADN de señal de insecto capaz de dirigir la secreción de una proteína deseada, y un sitio para la inserción del gen foráneo codificante de la proteína foránea, situando la secuencia de ADN de señal y el gen foráneo bajo el control transcripcional de un promotor de baculovirus, siendo el gen foráneo de la presente invención la secuencia codificante de la molécula Fab.

El promotor para la utilización en la presente invención puede ser una región de promotor transcripcional de baculovirus derivada de cualquiera de entre más de 500 baculovirus que generalmente infectan insectos, tales como, por ejemplo, los órdenes Lepidoptera, Diptera, Orthoptera, Coleoptera e Hymenoptera, incluyendo, por ejemplo, aunque sin limitarse a ellos, los ADN víricos de *Autographa californica* MNPV, *Bombyx mori* NPV, *Richoplusia ni* MNPV, *Rachiplusia ou* MNPV o *Galleria melonella* MNPV, *Aedes aegypti*, *Drosophila melanogaster*, *Spodoptera frugiperda* y *Trichoplusia ni*. De esta manera, el promotor transcripcional de baculovirus puede ser, por ejemplo, un promotor de gen inmediato-temprano IEI o IEN de baculovirus, un gen inmediato-temprano en combinación con una región promotora de gen retrasado-temprano de baculovirus seleccionado de entre el grupo que consiste de un fragmento 39K y de un fragmento HindIII que contienen un gen retrasado-temprano o un promotor de gen tardío de baculovirus. Los promotores inmediato-temprano o retrasado-temprano pueden intensificarse con elementos intensificadores transcripcionales.

Resultan particularmente adecuados para la utilización en la presente invención el promotor polihedrina fuerte del baculovirus, que regula un nivel elevado de expresión de una inserción de ADN, tal como se describe en Friesen *et al.*, "The Regulation of Baculovirus Gene Expression", en: THE MOLECULAR BIOLOGY OF BACULOVIRUSES (W. Doerfler, editor), 1986; patentes EP nº 127.839 y nº 155.476, y el promotor del gen codificante de la proteína p10, tal como se describe en Vlak *et al.*, J. Gen. Virol. 69:765-776, 1988.

El plásmido para la utilización en la presente invención habitualmente también contiene la señal de poliadenilación polihedrina, tal como se describe en Miller *et al.*, Ann. Rev. Microbiol. 42:177, 1988, y un gen procariótico de resistencia a la ampicilina (*amp*) y un origen de replicación para la selección y propagación en *E. coli*. También puede incluirse el ADN codificante de las secuencias de señal adecuadas y generalmente se deriva de genes para proteínas secretadas de insecto o de baculovirus, tales como el gen polihedrina de baculovirus, tal como se describe en Carbonell *et al.*, Gene 73:409, 1988, así como las secuencias de señal de mamífero, tales como las derivadas de genes codificantes del interferón α humano, tal como se describe en Maeda *et al.*, Nature 315:592-594, 1986; el péptido liberador de gastrina humano, tal como se describe en Lebacqz-Verheyden *et al.*, Mol. Cell Biol. 8:3129, 1988; IL-2 humano, tal como se describe en Smith *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8404, 1985; IL-3 de ratón, tal como se describe en Miyajima *et al.*, Gene 58:273, 1987, y la glucocerebrosidasa humana, tal como se describe en Martin *et al.*, DNA 7:99, 1988.

Se han identificado numerosas cepas y variantes de baculovirus y las células huésped de insecto permisivas correspondientes procedentes de huéspedes tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), y *Bombyx mori*, y pueden utilizarse en la presente invención. Ver, por ejemplo, la descripción en Luckow *et al.*, Bio/Technology 6:47-55, 1988; Miller *et al.*, en: GENETIC ENGINEERING (Setlow, J.K. *et al.*, editores), vol. 8 (Plenum Publishing, 1986), páginas 277 a 279, y Maeda *et al.*, Nature 315:592-594, 1985. Se encuentran públicamente disponibles una diversidad de dichas cepas víricas, por ejemplo la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV. Dichos virus pueden utilizarse como el virus para la transfección de células huésped tales como células de *Spodoptera frugiperda*.

Pueden utilizarse otros genes de baculovirus además del promotor polihedrina en un sistema de expresión de baculovirus. Entre ellos se incluyen los genes inmediato-temprano (alfa), retrasado-temprano (beta), tardío (gamma) o muy tardío (delta) según la fase de la infección vírica durante la que se expresan. La expresión de estos genes se produce secuencialmente, probablemente como resultado de un mecanismo "en cascada" de regulación transcripcional. De esta manera, los genes inmediato-temprano se expresan inmediatamente después de la infección, en ausencia de otras funciones víricas, y uno o más de los productos génicos resultantes induce la transcripción de los genes retrasados-tempranos. Algunos productos génicos retrasados-tempranos, a su vez, inducen la transcripción de genes tardíos y finalmente, los genes muy tardíos se expresan bajo el control de productos génicos anteriormente expresados de una o más de las clases anteriores. Un componente relativamente bien definido de esta cascada de regulación es IEI, un gen inmediato-temprano preferente del virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcMNPV). IEI se expresa en ausencia de otras funciones víricas y codifica un producto que estimula la transcripción de varios genes de la clase retrasada-temprana, incluyendo el gen 39K preferente, tal como se describe en Guarino y Summers, J. Virol. 57:563-571, 1986 y J. Virol. 61:2091-2099, 1987, así como genes tardíos, tal como se describe en Guanno y Summers, Virol. 162:444-451, 1988.

Pueden utilizarse genes inmediatos-tempranos tal como se han descrito anteriormente en combinación con una región promotora de gen de baculovirus de la categoría retrasada-temprana. Al contrario que los genes inmediatos-tempranos, dichos genes retrasados-tempranos requieren la presencia de otros genes víricos o productos génicos tales como los de los genes inmediatos-tempranos. La combinación de genes inmediatos-tempranos puede prepararse con cualquiera de entre varias regiones promotoras de gen retrasado-temprano, tales como 39K o uno de los promotores de gen retrasado-temprano que se encuentran en el fragmento HindIII del genoma del baculovirus. En el presente caso, la región promotora 39K puede unirse al gen foráneo que debe expresarse de manera que la expresión puede encontrarse adicionalmente controlado por la presencia de IEI, tal como se describe en L.A. Guarino y Summers, 1986a, citado anteriormente; Guarino y Summers, J. Virol. 60:215-223, 1986, y Guarino *et al.*, J. Virol. 60:224-229, 1986c.

Además, en el caso de que se utilice una combinación de genes inmediatos-tempranos con una región promotora de gen retrasado-temprano, puede llevarse a cabo la intensificación de la expresión de los genes heterólogos con la presencia de una secuencia intensificadora unido directamente en cis con la región promotora de gen retrasado-temprano. Estas secuencias intensificadoras se caracterizan por la intensificación de la expresión de genes retrasados-tempranos en situaciones en las que el gen inmediato-temprano o su producto es limitada. Por ejemplo, la secuencia intensificadora hr5 puede unirse directamente, en cis, a la región promotora de gen retrasado-temprano, 39K, intensificando de esta manera la expresión del ADN heterólogo clonado, tal como se describe en Guarino y Summers, 1986a, 1986b, y Guraino *et al.*, 1986.

El gen polihedrina se clasifica como un gen muy tardío. Por lo tanto, la transcripción a partir del promotor polihedrina requiere la expresión previa de número desconocido, aunque probablemente grande, de otros productos génicos víricos y celulares. Debido a esta expresión retrasada del promotor polihedrina, los últimos BEVs, tales como el sistema BEV ejemplar descrito por Smith y Summers en, por ejemplo, la patente US nº 4.745.051, expresan genes foráneos únicamente como resultado de la expresión génica a partir del resto del genoma vírico, y únicamente hasta encontrarse bien iniciada la infección vírica. Esto representa una limitación a la utilización de los BEVs existentes. La capacidad de la célula huésped de procesar proteínas nuevamente sintetizadas se reduce a medida que progresa la infección del baculovirus. De esta manera, la expresión génica del promotor polihedrina se produce en un momento en que la capacidad de la célula huésped de procesar proteínas nuevamente sintetizadas se encuentra potencialmente reducida para determinadas proteínas, tales como el activador del plasminógeno tisular humano. En consecuencia, la expresión de las glucoproteínas secretorias en los sistemas BEV se ve complicada por la secreción incompleta del producto génico clonado, atrapando de esta manera el producto génico clonado dentro de la célula en una forma incompletamente procesada.

Aunque se ha reconocido que una secuencia de señal de insecto puede utilizarse para expresar una proteína foránea que puede cortarse para producir una proteína madura, la presente invención también puede ponerse en práctica con una secuencia de señal de mamífero.

Una secuencia de señal de insecto ejemplar adecuada de la presente invención es la secuencia codificante del péptido hormona adipocinética de lepidóptero (AKH). La familia AKH consiste de neuropéptidos bloqueados cortos que regulan la movilización y metabolismo de los sustratos energéticos en insectos. En una realización preferente, puede utilizarse una secuencia de ADN codificante de un péptido de señal AKH del lepidóptero *Manduca sexta*. También pueden utilizarse ventajosamente otros péptidos de señal AKH de insecto, tales como aquellos procedentes del ortóptero *Schistocerca gregaria*. Otra secuencia de señal de insecto ejemplar es la secuencia codificante de las proteínas de cutícula de *Drosophila*, tales como CP1, CP2, CP2 o CP4.

En la actualidad, el vector de transferencia más comúnmente utilizado que puede utilizarse en la presente invención para introducir genes foráneos en AcNPV es pAc373. Muchos otros vectores, conocidos por los expertos en la materia, también pueden utilizarse en la presente invención. Los materiales y métodos para los sistemas de expresión de baculovirus/célula de insecto se encuentran disponibles comercialmente en forma de un kit de compañías tales como Invitrogen (San Diego, CA) (kit "MaxBac"). Las técnicas utilizadas en la presente invención son generalmente conocidas por los expertos en la materia y se describen completamente en Summers y Smith, A MANUAL OF METHODS FOR BACULOVIRUS VECTORS AND INSECT CELL CULTURE PROCEDURES, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin nº 1555, Texas A&M University, 1987; Smith *et al.*, Mol. Cell. Biol., 1983, y Luckow y Summers, 1989. Entre ellos se incluyen, por ejemplo, la utilización de pVL985, que altera el codón de inicio de la polihedrina de ATG a ATT, y que introduce un sitio de clonación BamHI 32 pares de bases cadena abajo de ATT, tal como se describe en Luckow y Summers, Virology 17:31, 1989.

De esta manera, por ejemplo, para la expresión en células de insecto de los presentes polipéptidos, la secuencia de ADN deseado puede insertarse en el vector de transferencia utilizando técnicas conocidas. Puede cotransformarse una célula huésped de insecto con el vector de transferencia que contiene el ADN deseado insertado conjuntamente con el ADN genómico del baculovirus de tipo salvaje, habitualmente mediante cotransfección. El vector y el genoma vírico se permite que se recombinen, resultando en un virus recombinante que puede identificarse y purificarse fácilmente. El virus recombinante empaquetado puede utilizarse para infectar células huésped de insecto para expresar una molécula Fab.

Otros procedimientos que resultan aplicables en la presente invención son los procedimientos estándares de cultivo de células de insecto, de cotransfección y de preparación de plásmidos proporcionados en Summers y Smith, 1987, citado anteriormente. Esta referencia también está comprendida en los procedimientos estándares de clonación de

genes en vectores de transferencia AcMNPV, de aislamiento de plásmido de ADN, de transferencia de genes en el genoma de AcMNPV, de purificación de ADN vírico, de marcaje radioactivo de proteínas recombinantes y de preparación de medio de cultivo de células de insecto. El procedimiento para el cultivo de virus y células se describe en Volkman y Summers, J. Virol. 19:820-832, 1975, y en Volkman *et al.*, J. Virol. 19:820-832, 1976.

5

iv. Expresión en células de mamífero

Los sistemas de expresión de mamífero también pueden utilizarse para producir las moléculas Fab. Entre los promotores típicos para la expresión en células de mamífero se incluyen el promotor temprano de SV40, el promotor de CMV, el promotor LTR de virus de tumor mamario de ratón, el promotor tardío mayor de adenovirus (AdMLP) y el promotor del virus del herpes simplex, entre otros. Otros promotores no víricos, tales como el promotor derivado del gen de la metalotefina murina, también encontrarán utilidad en los constructos de mamífero. La expresión en mamíferos puede ser constitutiva o regulada (inducible), dependiendo del promotor. Típicamente también se encontrarán presentes secuencias de terminación de transcripción y de poliadenilación, situadas en dirección 3' respecto al codón de parada de traducción. Preferentemente también se encuentra presente una secuencia para la optimización del inicio de traducción, situado en dirección 5' respecto a la secuencia codificante de Fab. Entre los ejemplos de terminadores de transcripción/señales de poliadenilación se incluyen aquellos derivados de SV40, tal como se describe en Sambrook *et al.*, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2a edición, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989. Los intrones, que contienen sitios de corte y empalme donantes y aceptores, también pueden diseñarse en los constructos de la presente invención.

Los elementos intensificadores también pueden utilizarse en la presente invención para incrementar los niveles de expresión de los constructos de mamífero. Entre los ejemplos se incluyen el intensificador del gen temprano de SV40, tal como se describe en Dijkema *et al.*, EMBO J. 4:761, 1985, y el intensificador/promotor derivado de la repetición terminal larga (LTR) del virus del sarcoma de Rous, tal como se describe en Gorman *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:6777, 1982b, y el citomegalovirus humano, tal como se describe en Boshart *et al.*, Cell 41:521, 1985. También puede encontrarse presente una secuencia líder que incluye una secuencia codificante de un péptido de señal, permitiendo la secreción de la proteína foránea en las células de mamífero. Preferentemente existen sitios de procesamiento codificados entre el fragmento líder y el gen de interés de manera que la secuencia líder pueda cortarse *in vivo* o *in vitro*. El líder tripartito de adenovirus es un ejemplo de una secuencia líder que permite la secreción de una proteína foránea en células de mamífero.

Existen vectores de expresión que permiten la expresión transitoria en células de mamífero de ADN codificante de las moléculas Fab. En general, la expresión transitoria implica la utilización de un vector de expresión que es capaz de replicarse eficientemente en una célula huésped, de manera que la célula huésped acumula muchas copias del vector de expresión y, a su vez, sintetiza niveles elevados de un polipéptido deseado codificado por el vector de expresión. Los sistemas de expresión transitoria, que comprenden un vector de expresión adecuado y una célula huésped, permiten la identificación positiva conveniente de polipéptidos codificados por los ADNs clonados, así como el cribado rápido de dichos polipéptidos para propiedades biológicas o fisiológicas deseadas. Tras completarse, los vectores de expresión de mamífero pueden utilizarse para transformar cualquiera de entre varias células de mamífero. Los procedimientos para la introducción de polinucleótidos heterólogos en células de mamífero son conocidos de la técnica e incluyen la transfección mediada por dextrano, la precipitación con fosfato de calcio, la transfección mediada por polibreno, la fusión de protoplasto, la electroporación, la encapsulación del polinucleótido o polinucleótidos en liposomas y la microinyección directa del ADN en los núcleos. Los aspectos generales de las transformaciones de sistema de células huésped de mamífero han sido descritos por Axel en la patente US n° 4.399.216. Un lípido sintético particularmente útil para la transfección de polinucleótidos es el cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxy)propil]-N,N,N-trimetilamonio, que se encuentra disponible comercialmente bajo el nombre Lipofectin® (disponible de BRL, Gaithersburg, MD) y se describe en Felgner *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413, 1987.

Las líneas celulares de mamífero disponibles como huéspedes para la expresión también son conocidas y entre ellas se incluyen muchas líneas de células inmortalizadas disponibles de la American Type Culture Collection (ATCC), incluyendo, aunque sin limitarse a ellas, las células ováricas de hámster chino (CHO), las células HeLa, las células renales de hámster neonato (BHK), las células renales de mono (COS), las células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo HepG2), las células renales embrionarias humanas, las células renales de hámster neonato, las células de sertoli de ratón, las células renales caninas, las células hepáticas de rata búfalo, las células pulmonares humanas, las células hepáticas humanas, las células de tumor mamario de ratón, así como otros.

Las células huésped de mamífero utilizadas para producir las moléculas Fab de la presente invención pueden cultivarse en una diversidad de medios. Los medios disponibles comercialmente, tales como F10 de Ham (Sigma), medio esencial mínimo (MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), (Sigma) resultan adecuados para cultivar las células huésped. Además, puede utilizarse cualquiera de los medios descritos en Ham y Wallace, Meth. Enz. 58:44, 1979; Bames y Sato, Anal. Biochem. 102:255, 1980; patentes US n° 4.767.704, n° 4.657.866, n° 4.927.762 o n° 4.560.655, patente WO n° 90/103430, n° 87/00195 y patente US re n° 30.985, como medio de cultivo para las células huésped. Cualquiera de estos medios puede suplementarse según resulte necesario con hormonas y/o otros factores de crecimiento, tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico, sales (tales como cloruro sódico, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleósidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco Gentamycin™ M), elementos traza (definidos como compuestos inorgánicos habitualmente presentes a concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa o una

fuerza energética equivalente. También puede incluirse cualquier otro suplemento necesario a concentraciones apropiadas que serían conocidas por los expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura, el pH y similares, son aquéllas utilizadas anteriormente con la célula huésped seleccionada para la expresión y resultarán evidentes para el experto ordinario en la materia.

5

Preparación de moléculas de unión específica

Utilizando las técnicas anteriores, pueden proporcionarse varias moléculas de unión específicas que muestran afinidad de unión inmunológica para el antígeno E2 de HCV. En particular, dependiendo del sistema de expresión y huésped seleccionados, pueden producirse fácilmente moléculas de unión específica de Fab solubles mediante el cultivo de células huésped transformadas por un vector de expresión descrito anteriormente bajo condiciones en las que se expresan las partes de cadena pesada y ligera. Pueden aislarse de las células huésped y purificarse heterodímeros que comprenden cadenas pesadas y ligeras no covalentemente asociadas. Debido a que la presente invención también permite la secreción opcional de los polipéptidos de cadena pesada y de cadena ligera, los heterodímeros Fab pueden purificarse directamente a partir del medio. La selección de las condiciones de cultivo apropiadas y los procedimientos de recuperación se encuentran comprendidos dentro los conocimientos de la técnica.

Además, las moléculas Fab de la presente invención pueden producirse utilizando procedimientos convencionales de síntesis de proteínas, basados en las secuencias de aminoácidos determinadas. En general, estos procedimientos utilizan la adición secuencial de uno o más aminoácidos a una cadena de péptidos en crecimiento. Normalmente, el grupo amino o carboxilo del primer aminoácido se protege con un grupo protector adecuado. El aminoácido protegido o derivatizado seguidamente puede unirse a un soporte sólido inerte o utilizarse en solución mediante la adición del siguiente aminoácido en la secuencia que presente el grupo complementario (amino o carboxilo) convenientemente protegido, bajo condiciones que permitan la formación de un enlace amida. Después, se elimina el grupo protector del residuo aminoácido recién añadido y seguidamente se añade el siguiente aminoácido (convenientemente protegido), y de esta manera sucesivamente. Tras unir los aminoácidos deseados en la secuencia correcta, se elimina cualquier grupo protector restante (y cualquier soporte sólido, si se utilizan técnicas de síntesis en fase sólida) secuencialmente o concurrentemente, proporcionando el polipéptido final. Mediante la simple modificación de este procedimiento general, resulta posible añadir más de un aminoácido cada vez a una cadena en crecimiento, por ejemplo mediante acoplamiento (bajo condiciones que no racemizan los centros quirales) un tripéptido protegido con un dipéptido correctamente protegido para formar, tras la desprotección, un pentapéptido (ver, por ejemplo, J.M. Stewart y J.D. Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2a edición, Pierce Chemical Co., Rockford, IL (1984), y G. Barany y R.B. Merrifield, *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, editores E. Gross y J. Meienhofer, vol. 2., Academic Press, New York, 1980, páginas 3 a 254, para las técnicas de síntesis de péptidos en fase sólida; y M. Bodansky, *Principles of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, Berlín, 1984, y E. Gross y J. Meienhofer, editores, *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, *supra*, vol. 1, para síntesis en solución clásicas.

Pueden prepararse moléculas de unión específica a anticuerpos monoclonales humanos recombinantes a partir de las moléculas Fab utilizando técnicas conocidas (Bender *et al.*, *Hum. Antibod. Hybridomas* 4:74, 1992). En particular, la secuencia codificante de la parte de cadena pesada de un clon Fab seleccionada puede insertarse en un vector de expresión conjuntamente con la secuencia codificante de los dominios constantes de una cadena pesada de Ig humana, utilizando las diversas técnicas recombinantes descritas anteriormente. Por ejemplo, puede utilizarse para este fin el vector de expresión de mamífero pSG5 (Green *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 16:369, 1988).

La clonación implica PCR solapante para eliminar la secuencia de líder bacteriano (del vector fagémido) y modificar el extremo N-terminal de la secuencia codificante de cadena pesada hasta formar una secuencia de consenso humana. La secuencia codificante de la parte de cadena ligera del clon Fab seleccionado de manera similar puede modificarse en el extremo N-terminal para incluir una secuencia de consenso humana, y clonarse en un vector de expresión tal como pSG5. Los vectores pSG5 contienen un origen de replicación de SV40 de manera que, tras la cotransfección de los vectores de cadena pesada y de cadena ligera en células de mamífero, tales como células COS-7, puede confirmarse la producción de moléculas de anticuerpo funcional (Burton *et al.*, *Science* 266:1024-1027, 1994).

Las cadenas pesada y ligera posteriormente pueden clonarse en vectores de clonación separados y subclonarse la secuencia codificante de la cadena pesada o de la cadena ligera en el otro vector, proporcionando un plásmido combinatorial. Por ejemplo, las secuencias codificantes de cadena pesada y de cadena ligera pueden insertarse respectivamente en los vectores pEE6 y pEE12 (Bebington *et al.*, *Bio/Technology* 10:169, 1992) que incluyen un promotor de citomegalovirus humano y el marcador seleccionable glutamina sintetasa. La cadena pesada, conjuntamente con elementos de control del vector pEE6, seguidamente pueden subclonarse en el vector pEE12, proporcionando un plásmido combinatorial. El plásmido combinatorial puede expresarse en un sistema de expresión de células CHO. Aquellos clones del sistema de expresión CHO que proporcionen niveles suficientes de producción de anticuerpo recombinante pueden seleccionarse para el escalado. Los anticuerpos recombinantes expresados en el sistema CHO pueden purificarse utilizando técnicas conocidas (por ejemplo cromatografía de afinidad utilizando proteína A) y evaluarse la afinidad de unión de las moléculas de unión específica recombinantes utilizando un ensayo de inhibición ELISA tal como se ha descrito anteriormente.

65

Alternativamente, pueden transferirse las secuencias codificantes de los clones Fab a los vectores pCLCHC y pIgG1, respectivamente, y después expresarse en forma de IgG completo en células CHO tal como se ha descrito anteriormente (Samuelsson *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 26:3029, 1996).

También pueden prepararse moléculas de unión específica $F(ab')_2$ recombinantes y Fv recombinantes a partir de clones Fab derivados de fagos utilizando técnicas conocidas. Las moléculas Fv generalmente comprenden un heterodímero cadena pesada:cadena ligera no unido covalentemente que incluye la parte ligante de antígeno de la molécula Fab y conserva gran parte de las capacidades de reconocimiento y unión de antígeno de las moléculas de anticuerpo nativo (Inbar *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69:2659-2662, 1972; Hochman *et al.*, Biochem. 15:2706-2710, 1976, y Ehrlich *et al.*, Biochem. 19:4091-4096, 1980. Típicamente las técnicas recombinantes anteriormente indicadas utilizadas para construir los anticuerpos monoclonales recombinantes pueden modificarse para proporcionar las moléculas de unión específica truncadas. Estas moléculas también pueden clonarse en sistemas de expresión CHO, purificarse y caracterizarse tal como se ha indicado anteriormente.

Los clones Fab derivados de fagos pueden utilizarse además para proporcionar moléculas de Fv monocatenarias (sFv) utilizando técnicas conocidas. Estas moléculas sFv comprenden un heterodímero cadena pesada:cadena ligera unido covalentemente que se expresa a partir de una fusión génica que incluye las secuencias codificantes de cadena pesada y de cadena ligera obtenidas de la molécula Fab derivada de fago, en las que las cadenas se unen mediante un *linker* codificante de péptido (Huston *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85(16):5879-5883, 1988). Se han descrito varios procedimientos para distinguir estructuras químicas para convertir las cadenas pesadas y ligeras naturalmente agregadas aunque químicamente separadas en una molécula sFv que se plegará en una estructura tridimensional sustancialmente similar a la estructura de un sitio ligante de antígeno (ver, por ejemplo, las patentes US nº 5.091.513 y nº 5.132.405, de Huston *et al.*, y nº 4.946.778, de Ladner *et al.*).

En la práctica de la invención, se utilizan procedimientos de diseño de ADN recombinante para desarrollar las estructuras químicas apropiadas para unir las cadenas pesada y ligera en la molécula ligante de sFv. Entre los criterios de diseño se incluyen la determinación de la longitud apropiada para abarcar la distancia entre el extremo C-terminal de una cadena y el extremo N-terminal de la otra, en los que el *linker* se forma generalmente a partir de residuos aminoácidos hidrofílicos pequeños que no tienden a enrollarse o a formar estructuras secundarias. Dichos procedimientos han sido descritos en la técnica (ver, por ejemplo, las patentes US nº 5.091.513 y nº 5.132.405, de Huston *et al.*; y la patente US nº 4.946.78, de Ladner *et al.*).

La primera etapa general de diseño del *linker* implica la identificación de sitios plausibles para unirse. Entre los sitios de unión apropiados en cada una de las cadenas de inmunoglobulina se incluyen aquellas que resultarán en la pérdida mínima de residuos de las cadenas pesada y ligera, y que exigirán un *linker* que presente un número mínimo de residuos, consistentemente con la necesidad de estabilidad de la molécula. Un par de sitios definen un "hueco" que debe ligarse. Los *linkers* que conectan el extremo C-terminal de una cadena al extremo N-terminal de la siguiente incluyen generalmente aminoácidos hidrofílicos que adoptan una configuración no estructurada en solución fisiológica y preferentemente se encuentran libres de residuos que presentan grupos laterales grandes que podrían interferir con el plegamiento correcto de las cadenas pesada y ligera. De esta manera, entre los *linkers* adecuados se incluyen cadenas polipeptídicas de conjuntos alternantes de residuos de glicina y de serina, y pueden incluir residuos de ácido glutámico y de lisina insertados para incrementar la solubilidad. Un *linker* particular utilizado en la práctica de la invención presenta la secuencia de aminoácidos [(Gly)₄Ser]₃. Otro *linker* particularmente preferente presenta la secuencia de aminoácidos que comprende 2 ó 3 repeticiones de [(Ser)₄Gly], tal como [(Ser)₄Gly]₃. Las secuencias de nucleótidos codificante de dichos grupos *linker* pueden proporcionarse fácilmente utilizando diversas técnicas de síntesis de oligonucleótidos conocidas de la técnica (ver, por ejemplo, Sambrook y Maniatis, *supra*).

Tras la determinación de la secuencia *linker* apropiada, pueden unirse las secuencias de nucleótidos codificantes de las moléculas sFv utilizando un enfoque de PCR solapante (ver, por ejemplo, Horton *et al.*, BioTechniques 8:528-535, 1990). Los extremos de las cadenas ligera y pesada que deben unirse a través de la secuencia de *linker* seleccionada en primer lugar se extienden mediante amplificación por PCR de cada pesada, utilizando cebadores que contienen la secuencia terminal de la región de cadena seguida de la totalidad o la mayoría de las secuencias *linker* deseadas. Tras esta etapa de extensión, las cadenas ligera y pesada contienen extensiones solapantes que conjuntamente contienen la secuencia de *linker* completa, y que pueden hibridarse en el solapamiento y extenderse mediante PCR para obtener la secuencia de sFv completa utilizando procedimientos conocidos de la técnica. Los genes presentes en casetes de expresión que comprenden la secuencia sFv seguidamente pueden expresarse en un sistema de expresión adecuado, y las moléculas sFv producidas a partir del mismo pueden purificarse y caracterizarse tal como se ha descrito anteriormente.

Composiciones de vacuna

En la presente invención se proporcionan composiciones de vacuna terapéutica y profiláctica, que generalmente comprenden mezclas de uno o más de los anticuerpos monoclonales anti-HCV anteriormente descritos, incluyendo moléculas Fab, fragmentos Fv, moléculas sFv y las combinaciones de los mismos. Las vacunas profilácticas pueden utilizarse para prevenir la infección por HCV, y utilizarse las vacunas terapéuticas para tratar los individuos tras la infección por HCV. Entre los usos profilácticos se incluyen la provisión de un título de anticuerpos incrementado contra HCV en un sujeto vacunado. De esta manera, los sujetos con alto riesgo de contraer infección por HCV (por ejemplo individuos inmunocomprometidos, pacientes de trasplante de órganos, individuos que han recibido transfusiones de sangre o de productos sanguíneos e individuos que han estado en contacto estrecho con individuos infectados por HCV) pueden recibir inmunidad pasiva frente al agente HCV. Además, debido a la reactividad cruzada de los anticuerpos monoclonales y de las moléculas Fab y sFv producidas en la presente invención, puede obtenerse cierto nivel de protección frente a varios aislados heterólogos de HCV. Entre otros usos profilácticos de las presentes vacunas anti-

HCV se incluyen la prevención de la enfermedad HCV en un individuo tras la exposición al agente infeccioso. Los usos terapéuticos de las presentes vacunas implican la reducción y/o eliminación del agente infeccioso de los individuos infectados, así como la reducción y/o eliminación del HCV circulante y la posible extensión de la enfermedad.

5 Las composiciones pueden administrarse conjuntamente con agentes inmunorreguladores auxiliares, por ejemplo citoquinas, linfoquinas y quimoquinas, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, IL-2, IL-2 modificado (cys125-->ser125), GM-CSF, IL-12, interferón γ , IP-10, MIP1 β y RANTES. En el caso de que las composiciones de vacuna se utilicen como vacunas terapéuticas, las composiciones pueden administrarse conjuntamente con terapéuticos anti-HCV conocidos, tal como la terapia de interferón α (IFN- α), que generalmente implica la administración de
10 3 millones de unidades de IFN- α tres veces por semana subcutáneamente (Causse *et al.*, Gastroenterology 101:497-502, 1991; Davis *et al.*, N. Engl. J. Med. 321:1501-1506, 1989; Marcellin *et al.*, Hepatology 13:393-397, 1991), terapia de interferón β (IFN- β) (Omata *et al.*, Lancet 338:914-915, 1991), terapia de ribavirina (Di Bisceglie *et al.*, Hepatology 16:649-654, 1992; Reichard *et al.*, Lancet 337:1058-1061, 1991) y la terapia antisentido (Wakita *et al.*, J. Biol. Chem. 269:14205-14210, 1994). Las composiciones de vacuna terapéuticas que comprenden los presentes anticuerpos monoclonales también pueden utilizarse conjuntamente con terapia de combinación anti-HCV conocidas, por
15 ejemplo la combinación de IFN- α y ursodiol (Bottelli *et al.*, Gastroenterology 104:879 (abstr.), 1993; O'Brien *et al.*, Gastroenterology 104:966 (Abstr.), 1993) y la combinación de IFN- β y ribavirina (Kakumu *et al.*, Gastroenterology 105:507-512, 1993).

20 La preparación de composiciones de vacuna que contienen uno o más anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, moléculas sFv o combinaciones de los mismos, como el ingrediente activo es generalmente conocida para los expertos en la materia. Típicamente dichas vacunas se preparan en forma de inyectables (por ejemplo en forma de soluciones líquidas o suspensiones o como formas sólidas adecuadas para la solución o suspensión en líquidos previamente a la inyección). Las composiciones generalmente también incluyen uno o más "excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables", tales como agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol o similar, y combinaciones de los mismos. Además, pueden encontrarse presentes en dichos vehículos cantidades menores de sustancias auxiliares, tales como
25 agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponadoras del pH, y similares, en dichos vehículos. Las composiciones de vacuna pueden emulsionarse o el ingrediente activo (anticuerpos monoclonales) puede encapsularse en liposomas.

30 Tras la formulación, las composiciones de vacuna se administran convencionalmente por vía parenteral, por ejemplo mediante inyección (subcutánea o intramuscular). Entre las formulaciones adicionales adecuadas para otros modos de administración se incluyen formulaciones orales y pulmonares, supositorios y aplicaciones transdérmicas. Para los supositorios, entre los ligantes y portadores tradicionales pueden incluirse, por ejemplo, polialquilenglicoles o triglicéridos. Dichas formulaciones de supositorio pueden proporcionarse a partir de mezclas que contienen el ingrediente o
35 ingredientes activos en el intervalo de entre 0,5% y 10%, preferentemente de entre 1% y 2%. Entre las formulaciones orales se incluyen excipientes utilizados normalmente tales como, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio y similar. Las composiciones de vacuna se administran en el sujeto que debe tratarse de una manera compatible con la formulación de dosis, y en una cantidad que resulte profiláctica y/o terapéuticamente eficaz. La cantidad de la composición que debe administrarse, generalmente en el intervalo de entre 1 y 500 microgramos de agente activo por dosis, depende del sujeto que debe tratarse, de la capacidad del sistema inmunológico del sujeto de montar sus propias respuestas inmunológicas y del grado de protección deseado. La cantidad exacta necesaria variará dependiendo de la edad y condición general del individuo que debe tratarse, de la severidad de la condición que debe tratarse y del agente anti-HCV particular
40 seleccionado y de su modo de administración, entre otros factores. Una cantidad apropiada eficaz podrá ser fácilmente determinada por un experto en la materia. De esta manera, una "cantidad terapéuticamente eficaz" de la composición será suficiente para el tratamiento o prevención de los síntomas de la enfermedad HCV y se encontrará comprendida en un intervalo relativamente amplio que podrá determinarse mediante pruebas rutinarias.

45 Además, las composiciones de vacuna pueden administrarse en un programa de dosis única, o preferentemente en un programa de múltiples dosis. Un programa de dosis múltiples es uno en el que un curso primario de vacunación puede ser de 1 a 10 dosis separadas, seguido de otras dosis proporcionadas a intervalos de tiempo posteriores necesarios para mantener o reforzar la acción de las composiciones. De esta manera, el régimen de dosificación también estará determinado, por lo menos en parte, por las necesidades particulares del sujeto que debe tratarse y dependerá del
50 criterio de una persona razonablemente experta en la materia.

Terapia génica

Los anticuerpos monoclonales recombinantes también pueden utilizarse para la terapia génica. En este aspecto, los
60 genes codificantes de anticuerpos recombinantes pueden introducirse en una célula huésped de mamífero adecuada para la expresión o coexpresión utilizando varios sistemas basados en virus que se han desarrollado para la transferencia génica en células de mamífero. Por ejemplo, los retrovirus proporcionan una plataforma conveniente para los sistemas de administración génica. Una secuencia de nucleótidos seleccionada codificante de un polipéptido de dominio V_H y/o V_L puede insertarse en un vector y empaquetarse en partículas retrovíricas utilizando técnicas conocidas. Los virus recombinantes seguidamente pueden aislarse y administrarse en un sujeto. Se han descrito varios sistemas retrovíricos adecuados (patente US n° 5.219.740; Miller y Rosman, BioTechniques 7:980-990, 1989; Miller, A.D., Human Gene Therapy 1:5-14, 1990; Scarpa *et al.*, Virology 180:849-852, 1991; Burns *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8033-8037, y Boris-Lawrie y Temin, Cur. Opin. Genet. Develop. 3:102-109, 1993). Se describen procedimientos particu-

larmente preferentes para producir y utilizar vectores retrovéricos para la terapia génica de la presente invención, por ejemplo, en la publicación de patente internacional WO n° 91/02805, publicada el 7 de marzo de 1991, y en la solicitud de patente US n° de serie 08/404.796, presentada el 15 de marzo de 1995 para "Eukariotic Layered Vector Initiation Systems", n° 08/405.627, publicada el 15 de marzo de 1995, para "Recombinant α -Viral Vectors", y n° 08/156.789, presentada el 23 de noviembre, 1993, para "Packaging Cells".

También se han descrito varios vectores adenovirus adecuados. Al contrario que los retrovirus que se integran en el genoma del huésped, los adenovirus persisten extracromosómicamente, minimizando de esta manera los riesgos asociados con la mutagénesis por inserción (Haj-Ahmad y Graham, J. Virol. 57:267-274, 1986; Bett *et al.*, J. Virol. 67:5911-5921, 1993; Mittereder *et al.*, Human Gene Therapy 5:717-729, 1994; Seth *et al.*, J. Virol. 68:933-940, 1994; Barr *et al.*, Gene Therapy 1:51-58, 1994; Berkner, K.L., BioTechniques 6:616-629, 1988, y Rich *et al.*, Human Gene Therapy 4:461-476, 1993).

Se han desarrollado recientemente diversos sistemas de vector virus adenoasociado (AAV) para la administración génica. Estos sistemas pueden incluir secuencias de control, tales como promotor y sitios de poliadenilación, así como marcadores seleccionables o genes informadores, secuencias intensificadoras y otros elementos de control que permiten la inducción de la transcripción. Los vectores AAV pueden construirse fácilmente utilizando técnicas bien conocidas de la técnica (ver, por ejemplo, las patentes US n° 5.173.414 y n° 5.139.941; publicaciones de patente internacional WO n° 92/01070 (publicada el 23 de enero de 1992) y WO n° 93/03769 (publicada el 4 de marzo de 1993); Lebkowski *et al.*, Molec. Biol. 8:3988-3996, 1988; Vincent *et al.*, Vaccines 90 (Cold Spring Harbor Laboratory Press), 1990; Carter, B.J., Current Opinion in Biotechnology 3:533-539, 1992; Muzyczka, N., Current Topics in Microbiol. and Immunol. 158:97-129, 1992; Kotin, R.M., Human Gene Therapy 5:793-801, 1994; Shelling y Smith, Gene Therapy 1:165-169, 1994; y Zhou *et al.*, J. Exp. Med. 179:1867-1875, 1994).

Entre los vectores víricos adicionales que encontrarán utilidad en el transporte de las presentes moléculas de ácidos nucleicos codificantes de las moléculas Fab se incluyen aquéllas derivadas de la familia de virus de la viruela, incluyendo el virus vaccinia y el virus de la viruela aviar. A título de ejemplo, los recombinantes de virus vaccinia que expresan los genes pueden construirse de la manera siguiente. El ADN codificante de la molécula Fab particular en primer lugar se inserta en un vector apropiado de manera que se encuentre en posición contigua a un promotor de Vaccinia y secuencias de ADN de Vaccinia flanqueantes, tal como la secuencia codificante de la timidina quinasa (TK). A continuación, este vector se utiliza para transfectar células que se infectan simultáneamente con Vaccinia. La recombinación homóloga sirve para insertar el promotor de Vaccinia más el gen codificante de la molécula Fab en el genoma vírico. El recombinante TK⁻ resultante puede seleccionarse mediante el cultivo de las células en presencia de 5-bromodesoxiuridina y recolectando las placas víricas resistentes a la misma.

Puede utilizarse convenientemente un sistema de infección/transfección basado en Vaccinia para proporcionar la expresión inducible transitoria de las moléculas Fab en una célula huésped. En este sistema, las células en primer lugar se infectan *in vitro* con un virus Vaccinia recombinante que codifica la ARN polimerasa del bacteriófago T7. Esta polimerasa muestra una especificidad exquisita en el aspecto de que únicamente transcribe moldes que portan promotores de T7. Tras la infección, las células se transfectan con el polinucleótido de interés, regulado por un promotor de T7. La polimerasa expresada en el citoplasma del virus Vaccinia recombinante transcribe el ADN transfectado en ARN⁻ que después es traducido en proteína por la maquinaria de traducción del huésped. El procedimiento proporciona una producción citoplasmática transitoria de elevado nivel de grandes cantidades de ARN y los productos de traducción del mismo (ver, por ejemplo, Elroy-Stein y Moss, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6743-6747, 1990; Fuerst *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8122-8126, 1986).

Alternativamente, también pueden utilizarse virus de viruela aviar, tales como el virus de la viruela aviar de aves silvestres y el virus de la viruela del canario, para administrar las secuencias de nucleótidos codificantes de Fab. La utilización de un vector virus de viruela aviar resulta particularmente deseable en el ser humano y en otras especies de mamífero debido a que los miembros del género avipox únicamente pueden replicarse productivamente en especies aviares susceptibles y por lo tanto no son infectivas en las células de mamífero. Los procedimientos para producir virus de viruela aviar recombinantes son conocidos de la técnica y utilizan la recombinación genética, tal como se ha descrito anteriormente con respecto a la producción de virus Vaccinia (ver, por ejemplo, las publicaciones de patente internacional WO n° 91/12882, n° 89/03429, publicadas el 20 de abril de 1989, y la patente WO n° 92/03545, publicada el 5 de marzo de 1992).

Los vectores conjugados moleculares, tales como los vectores adenovirus quiméricos descritos en Michael *et al.*, J. Biol. Chem. 268:6866-6869, 1993, y Wagner *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6099-6103, 1992, también pueden utilizarse para la administración génica bajo la invención.

Reactivos de ensayo y kits diagnósticos

Las moléculas ligantes anti-HCV anteriormente indicadas (los anticuerpos monoclonales recombinantes, incluyendo las moléculas Fab, los fragmentos Fv y las moléculas sFv) que son capaces de reaccionar inmunológicamente con muestras que contienen partículas HCV también se utilizan en la presente invención para detectar la presencia de partículas víricas de HCV y/o de antígenos víricos en ensayos de unión específica de muestras biológicas. En particular, las nuevas moléculas ligantes específicas de la presente invención pueden utilizarse en procedimientos altamente sensibles para cribar e identificar individuos que portan y/o infectados por HCV, así como para el cribado de sangre

contaminada por HCV o productos hemáticos. Las presentes moléculas ligantes también pueden utilizarse en ensayos para el seguimiento del progreso de terapias anti-HCV en individuos tratados, y para el seguimiento de la tasa de crecimiento de cultivos de HCV utilizados en investigación y en el estudio del agente HCV.

5 El formato de ensayos de unión específica podrá ser muy diverso de acuerdo con procedimientos que son bien conocidos de la técnica. Por ejemplo, pueden formarse ensayos de unión específica para utilizar uno, o una mezcla de varios, anticuerpos monoclonales humanos recombinantes (incluyendo moléculas Fab, fragmentos Fv, así como moléculas de sFv) que han sido preparados según la presente invención. El formato de ensayo puede basarse generalmente, por ejemplo, en técnicas de ensayo de competición, de reacción directa de unión o de tipo sándwich. Además, 10 los presentes ensayos pueden llevarse a cabo utilizando inmunoprecipitación u otras técnicas para separar los reactivos de ensayo durante o después del inicio del ensayo. Pueden llevarse a cabo otros ensayos utilizando moléculas de unión específica que se han insolubilizado antes del inicio del ensayo. En este aspecto, son bien conocidas de la técnica varias procedimientos de insolubilización, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, insolubilización mediante adsorción a un inmunoabsorbente o similar, absorción por contacto con la pared de un recipiente de reacción, reticulación covalente 15 a matrices insolubles o sustratos de "fase sólida", unión no covalente a sustratos de fase sólida utilizando interacciones iónicas o hidrofóbicas, o mediante agregación utilizando precipitantes, tales como polietilenglicol o agentes reticulantes, tales como glutaraldehído.

Existe un gran número de sustratos de fase sólida que pueden seleccionarse para la utilización en los presentes 20 ensayos por los expertos en la materia. Por ejemplo, las partículas de látex, las micropartículas, las perlas magnéticas, paramagnéticas o no magnéticas, las membranas, los tubos de plástico, las paredes de pocillos de microtitulación, las partículas de vidrio o silicio y los glóbulos rojos de oveja resultan adecuados para la utilización en la presente invención.

25 En general, la mayoría de los presentes ensayos implica la utilización de un complejo de unión marcado formado a partir de la combinación de una molécula de unión específica (anticuerpos monoclonales recombinantes, fragmentos Fab, fragmentos Fv y moléculas sFv) con un grupo de marcaje detectable. Son conocidas de la técnica varias marcajes y pueden unirse fácilmente (utilizando técnicas de asociación covalente o no covalente) a las moléculas de unión de la presente invención, proporcionando un complejo de unión para la utilización en los formatos de ensayo anteriormente 30 indicados. Entre los grupos detectables adecuados se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, isótopos radioactivos, fluorescentes, compuestos luminiscentes (por ejemplo fluoresceína y rodamina), quimioluminiscentes (por ejemplo compuestos acridinio, fenantridinio y dioxetano), enzimas (por ejemplo fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante y beta-galactosidasa), sustratos enzimáticos, cofactores enzimáticos, inhibidores de enzima, pigmentos e iones metálicos. Estos marcajes pueden asociarse con las moléculas de unión utilizando técnicas de unión que son conocidas 35 de la técnica.

Los procedimientos de ensayo ejemplares generalmente implican las etapas siguientes: (1) preparar los complejos de unión detectablemente marcados tal como se ha indicado anteriormente, (2) obtener una muestra que se sospecha que contiene partículas de HCV y/o antígeno HCV, (3) incubar la muestra con los complejos marcados bajo condiciones que permitan la formación de un complejo de molécula de unión específica-antígeno (por ejemplo un complejo de anticuerpo-antígeno), y (4) detectar la presencia o ausencia de complejos de molécula de unión marcada-antígeno. Tal como apreciarán los expertos en la materia tras la lectura de la presente memoria, dichos ensayos pueden utilizarse para cribar para la presencia de infección por HCV en sangre y productos séricos de un donante humano, para realizar el seguimiento de la tasa de crecimiento de cultivos de HCV en contextos diagnósticos y/o de investigación, para 45 detectar la infección por HCV en un individuo o para realizar el seguimiento del efecto terapéutico de un tratamiento anti-HCV en un sujeto infectado. En el caso de que los ensayos se utilicen en el contexto clínico, por ejemplo para detectar la infección por HCV o realizar el seguimiento de terapias anti-HCV, pueden obtenerse muestras de líquidos corporales humanos y animales, tales como sangre completa, suero, plasma, líquido cerebroespinal, orina y similares. Además, los ensayos pueden utilizarse fácilmente para proporcionar información cuantitativa utilizando la referencia a estándares o calibradores, tal como es conocido de la técnica. 50

En un procedimiento de ensayo particular de la invención, puede utilizarse un ensayo de inmunosorción ligada a enzima (ELISA) para cuantificar una concentración de antígeno HCV en una muestra. En el procedimiento, las moléculas de unión específica de la presente invención se conjugan con un enzima, proporcionando un complejo de 55 unión marcado, en el que el ensayo utiliza el enzima unido como marcaje cuantitativo. Con el fin de medir el antígeno, se inmoviliza una molécula de unión capaz de unirse específicamente al antígeno HCV seleccionado (por ejemplo una molécula de anticuerpo) en un sustrato de fase sólida (por ejemplo una placa de microtitulación o taza de plástico), se incuban con diluciones de la muestra de ensayo, se lava y se incuban con los complejos de molécula de unión-enzima de la invención, y después se lavan nuevamente. A este respecto, son conocidos de manera general marcajes enzimáticos 60 adecuados, incluyendo, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante. La actividad enzimática unida a la fase sólida se mide mediante la adición del sustrato enzimático específico, y determinando la formación de producto o la utilización de sustrato colorimétricamente. La actividad enzimática unida al sustrato de fase sólida es una función directa de la cantidad de antígeno presente en la muestra.

65 En otro procedimiento de ensayo particular de la invención, la presencia de HCV en una muestra biológica (por ejemplo como indicador de la infección por HCV) puede detectarse utilizando técnicas de ensayo de inmunotransferencia en tira (SIA), tales como las conocidas en la técnica que combinan técnicas tradicionales de transferencia western y por puntos, por ejemplo el ensayo RIBA[®] (Chiron Corp., Emeryville, CA). En estos ensayos, se inmovi-

lizan una o más de las moléculas de unión específica (los anticuerpos monoclonales recombinantes, incluyendo las moléculas Fab) en forma de bandas individuales discretas sobre una tira de ensayo de soporte membranoso. La visualización de la reactividad con las partículas HCV presentes en la muestra biológica se consigue utilizando técnicas de unión sándwich conjuntamente con un sustrato enzimático colorimétrico. Los controles internos también pueden encontrarse presentes en la tira. El ensayo puede llevarse a cabo manualmente o utilizarse en un formato automatizado.

Además, los anticuerpos monoclonales humanos recombinantes (incluyendo las moléculas Fab, fragmentos Fv, así como las moléculas sFv) que se han preparado según la presente invención pueden utilizarse en técnicas de cromatografía por afinidad con el fin de detectar la presencia de HCV en una muestra biológica. Estos procedimientos son bien conocidos de la técnica.

Los kits adecuados para la utilización en la realización de cualquiera de los ensayos anteriormente indicados y las técnicas de cromatografía por afinidad, y que contienen reactivos apropiados de complejo de molécula de unión marcada también pueden proporcionarse de acuerdo con la práctica de la invención. Los kits de ensayo se ensamblan mediante empaquetamiento de los materiales apropiados, incluyendo todos los reactivos y materiales necesarios para llevar a cabo el ensayo en un recipiente adecuado, conjuntamente con un conjunto apropiado de instrucciones de ensayo.

Posteriormente se proporcionan ejemplos de realizaciones específicas para llevar a cabo la presente invención. Los ejemplos se ofrecen únicamente con fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la presente invención en modo alguno.

Se han realizado esfuerzos por garantizar la exactitud con respecto a los datos utilizados (por ejemplo cantidades, temperaturas, etc.), aunque evidentemente debe tenerse en cuenta cierto error y desviación experimental.

Parte experimental

Ejemplo 1

Caracterización de la biblioteca donante

Se obtuvo médula ósea de un donante de sangre varón asintomático de 60 años de edad, que se encontró que era positivo para HCV durante el cribado regular realizado durante una donación de sangre. La causa de la infección era desconocida. El donante no había sido inmunizado, y no había recibido ningún tratamiento para la infección por HCV previamente a la aspiración de médula ósea, que alcanzó un volumen aproximado de 3 ml. Se determinó el genotipo del HCV en el suero del donante en el momento de la donación de médula ósea utilizando un procedimiento publicado y se encontró que era HCV 2b (Widell *et al.*, J. Med. Virol. 44:272-279, 1994).

En particular, la secuencia de nucleótidos de la región hipervariable 1 (HVR1) del gen E2 del aislado de HCV del donante se obtuvo de la manera siguiente. Se obtuvo ADN molde monocatenario y se llevó a cabo una reacción de secuenciación utilizando cebadores recién diseñados (A. Widell *et al.*, manuscrito en preparación), en ciclos de reacción de secuenciación con nucleótidos marcados (kit de secuenciación en ciclos de PCR, Perkin-Elmer) siguiendo las instrucciones del fabricante (Allander *et al.*, J. Med. Virol. 43:415-419, 1994). El producto de reacción se corrió en un secuenciador automatizado (Applied Biosystems, CA) y los datos se editaron y se analizaron utilizando el programa informático MacMolly (disponible de SoftGene, Berlín, Alemania). La secuencia de aminoácidos deducida de la región HVR-E2 del aislado donante se determinó que era la siguiente: VAGVDASTYTTGGQSGRTTYGIV GLFSLGPSQKLSLINTNGSWHINR (SEC ID n°).

Ejemplo 2

Construcción de la biblioteca de expresión fágica

Se aislaron linfocitos de la muestra de médula ósea obtenida en el Ejemplo 1 utilizando Ficoll-Plaque (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). Se extrajo el ARN total mediante el procedimiento de extracción con fenol ácido (Chomczynski *et al.*, Anal. Biochem. 162:156-159, 1987); se llevó a cabo síntesis de ADNc de primera cadena utilizando el cebado con oligo-dT de 10 µg de ARN (kit de síntesis de ADNc, Pharmacia Biotech) y se amplificó por PCR ADN de cadena pesada (Fd) y de cadena ligera utilizando cebadores 5' biotinilados de secuencias anteriormente publicadas para las cadenas γ1 pesada y κ ligera (cebadores 5': VH1a, VH1f, VH2f, VH3a, VH3f, VH4f, VH6a, VH6f, VK1a, VK2a, VK3a; cebadores 3': CGIz y CK1a) (disponibles de Scandinavian Gene Synthesis, Köping, Suecia) (ver, por ejemplo, Persson *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2432-2436, 1991; Kang *et al.*, Methods: Comp. Meth. Enzymol. 2:111-118, 1991).

Se llevó a cabo una PCR utilizando un ciclador térmico 4800 (Perkin-Elmer) a 94°C durante 5 minutos, realizando seguidamente 5 ciclos de 94°C durante 60 segundos, 52°C durante 30 segundos y 72°C durante 180 segundos. Tras 35 ciclos, una etapa de extensión a 72°C durante 10 minutos completó el procedimiento de PCR. Los productos de PCR se analizaron corriendo una fracción de cada uno en un gel de agarosa al 1,5%, se agruparon separadamente el ADN de cadena pesada y de cadena ligera, se extrajeron con fenol-cloroformo y después se precipitaron con etanol.

Se purificaron en gel 12 μ g del ADN de cadena pesada y del ADN de cadena ligera, en un gel de agarosa al 2,5%, se electroeluyeron (Schleicher & Schuell, Alemania) y se digirieron con las endonucleasas de restricción XhoI/SpeI y SacI/XbaI, respectivamente (disponibles de Life Technologies, Gaithersburg, MD). Los productos de PCR digeridos, posteriormente se purificaron en gel, se recuperaron mediante electroelución y se ligaron en el vector pComb3H (Barbas, III *et al.*, Methods: Comp. Meth. Enzymol. 8:94-103, 1995) tras la digestión de los mismos con los enzimas de restricción correspondientes, y se purificaron/electroeluyeron en gel tal como se ha descrito anteriormente para sistemas de vector similares (Yang *et al.*, J. Mol. Biol. 254:392-403, 1994; Barbas, III *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7978-7982, 1991). Para las ligaciones, se utilizó ligasa de T4 (Life Technologies) a una concentración de 0,5 unidades por 10 μ l de volumen de reacción, a aproximadamente 16°C durante la noche. La biblioteca combinatorial se expresó en fagos, incluyendo la recolección de los fagos, según se ha informado anteriormente (Samuelsson *et al.*, Virology 207:495-502, 1995).

La ligación con genes de cadena ligera en pComb3H proporcionó una biblioteca de 2×10^7 miembros. La ligación posterior de los genes Fd en dicha biblioteca resultó en una biblioteca $\gamma 1/\kappa$ de 2×10^6 miembros.

Ejemplo 3

Preparación de los antígenos selectivos de E2 de HCV

Se construyó una forma secretada truncada de la molécula E2 de HCV que incluía los aminoácidos 383_{ala} a 715_{lys} (utilizando la nomenclatura de Choo *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2451-2455, 1991). La molécula E2 se expresó utilizando un sistema de expresión de células de ovario de hámster chino/dihidrofolato reductasa (CHO/DHFR) para proporcionar un "antígeno E2 de HCV conformacional", de la manera siguiente. Se generó un fragmento de ADN de E2 de HCV de los aminoácidos 383 a 715 de HCV1 mediante PCR y después se ligó en un vector plásmido que presentaba el promotor/intensificador temprano inmediato del citomegalovirus murino (MCMV) (Dorsch-Hasler *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8325-8329, 1985) y el marcador génico dhfr seleccionable. A continuación, el plásmido resultante se transfectó establemente en células CHO dhfr⁻, generando una línea celular CHO recombinante estable que secretaba el antígeno E2 de HCV conformacional.

Se purificó el antígeno E2 conformacional utilizando procedimientos conocidos (Rosa *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:1759-1763, 1996), de la manera siguiente. Se concentró 15 veces medio condicionado procedente de células CHO mediante ultrafiltración, seguido de una reducción de volumen adicional de 10 veces mediante precipitación con sulfato amónico a una saturación de 75%, y redisolución en cloruro de Tris 25 mM/EDTA 1 mM, pH 7,5. Para la purificación se utilizó el anticuerpo monoclonal 5E5/H7 (cultivado contra E1/E2 de HeLa). Se equilibró la columna de anticuerpo en cloruro de Tris 25 mM/NaCl 0,15 M, pH 7,5. El antígeno E2 precipitado con sulfato amónico se disolvió en cloruro de Tris 25 mM/EDTA 1 mM, pH 7,5, y se cargó en la columna. La columna se lavó con solución salina tamponada con fosfato (PBS)/NaCl 1 M y después se eluyó con 3 a 4 volúmenes de columna de Actisep (Sterogene, Arcadia, CA). Se agrupó la totalidad de las fracciones de color amarillo, que contenían Actisep, se concentraron en un ultrafiltrador celular agitado, y se diafiltraron en tampón PBS.

Se construyó un antígeno recombinante complejo E1/E2 de HCV y se expresó utilizando un sistema de expresión de células de ovario de hámster chino/dihidrofolato reductasa (CHO/DHFR), de la manera siguiente. Se generó el plásmido pMCMV-HC5p (Spaete *et al.*, Virology 188:819-830, 1992), que codifica la región estructural de HCV en forma de un polipéptido de 917 aminoácidos que comprende Met₁ a Gly₉₁₇ del genoma de HCV1, mediante clonación de un fragmento StuI de HCV de 2.813 pares de bases (pb) de pGEM-4 BLU-hc5P-18 en el sitio SalI único del vector de expresión celular de mamífero pMCVAdhfr (Spaete *et al.*, J. Virol. 64:2922-2931, 1990). El vector pMCVAdhfr codifica el gen dhfr seleccionable con la transcripción del gen expresado controlado por el promotor/9intensificador temprano inmediato de MCMV y terminado por las secuencias de poliadenilación de SV40. El fragmento Klenow (Boehringer-Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN) se utilizó para rellenar el sitio SalI previamente a la ligación del fragmento StuI. El plásmido pMCMV-HC5p se transfectó establemente en células CHO dhfr⁻, generando una línea celular CHO recombinante estable (n° 62) que expresaba el antígeno complejo E1/E2 de HCV recombinante.

El antígeno complejo E1/E2 recombinante se purificó utilizando procedimientos conocidos (Choo *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:1294-1298, 1994), de la manera siguiente. La línea celular CHO n° 62 se recolectó mediante pelletización y congelación. Tras la lisis mediante homogeneización Dounce en tampón hipotónico, el pellet se extrajo mediante homogenización en Triton X-100® al 2% y se copurificaron selectivamente E1 (33 kD) y E2 (72 kD) mediante sucesivamente cromatografía en agarosa-lectina de *Gralanthus nivalis* unida (Vector Laboratories) e intercambio catiónico en S-sefarsa de flujo rápido (Pharmacia).

Ejemplo 4

Cribado de la biblioteca combinatorial

Se llevó a cabo la selección antigénica de moléculas Fab unidas específicamente utilizando una variación de técnicas conocidas (Burton *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10134-10137, 1991). En particular, se recubrieron cuatro pocillos de una placa de microtitulación (Costar 3690, Cambridge, MA) a 4°C durante la noche con 50 μ l de antígeno E2 de HCV conformacional recombinante purificado o antígeno complejo E1/E2 recombinante purificado (preparado en el Ejemplo 3), se expresó en células CHO a una concentración de 2,5 μ g/ml (Spaete *et al.*, Virology 188:819-830,

1992). El bloqueo se llevó a cabo llenando completamente los pocillos con leche seca no grasa al 5% en PBS durante 1 hora a 22°C. Se añadieron 50 µl de la biblioteca fágica (5x10¹⁰ cfu) a cada pocillo, y la placa se incubó durante 2 horas a 37°C. Se extrajeron los fagos y cada pocillo se lavó llenando completamente con una solución de PBS y Tween 20 al 0,5% durante 5 minutos, y después extrayendo cuidadosamente la solución de lavado. El lavado se llevó a cabo 1 a 10 veces, tal como se describe posteriormente. Los fagos se eluyeron mediante la adición de 50 µl por pocillo de tampón de elución (HCl 0,1 M ajustado a pH 2,2 con glicina sólida) e incubando durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se extrajo el tampón de elución y se neutralizó con 3 µl de base Tris 2 M por cada 50 µl de tampón de elución. Se infectaron células de *E. coli* XL-1 blue (Barbas, III *et al.*, Methods: Comp. Meth. Enzymol. 2:119-124, 1991) con los fagos eluidos, se sembraron alícuotas en placas y se llevó a cabo la propagación de los fagos tras cada ronda de cribado tal como se encuentra descrito (Samuelsson *et al.*, Virology 207:495-502, 1995).

En el primer grupo de cribados (serie de cribados I), se incrementó el número de lavados en cada ronda de cribado posterior durante tres rondas (1, 3 y 10 lavados, respectivamente), mientras que en el segundo grupo de cribados (serie de cribados II), se llevó a cabo una única ronda de cribados con 10 lavados. Tal como puede observarse a partir de los resultados ilustrados en la Tabla 1, se detectó un incremento de 100 veces en los fagos eluidos en la serie de cribados I.

TABLA 1			
n° de cribado	lavados (n°)	fagos eluidos (cfu)	Factor de enriquecimiento
<i>Serie de cribados I</i>			
1	1	2,6 x 10 ⁶	--
2	3	2,3 x 10 ⁷	9
3	10	2,6 x 10 ⁸	100
<i>Serie de cribados II</i>			
1	10	2,4 x 10 ⁵	

El antígeno utilizado en los cribados tanto de serie I como de serie II era el antígeno E2 conformacional recombinante. Se llevó a cabo un tercer grupo de cribados (serie de cribados III) tal como en la serie I; sin embargo, se utilizó el antígeno complejo E1/E2 recombinante para seleccionar los clones positivos.

Ejemplo 5

Expresión de las moléculas Fab

Se expresaron moléculas Fab mediante el cultivo de colonias celulares de *E. coli* XL-1 blue resistentes a ampicilina, que contenían plásmidos Fab, con el gen gIII (codificante de la proteína de anclaje cpIII) (a) intacta para proporcionar fragmentos Fab insolubles, o (b) delecionada mediante digestión con SpeI y NheI para proporcionar fragmentos Fab solubles (la digestión con estas enzimas proporciona extremos cohesivos compatibles; de esta manera el fragmento de ADN resultante sin el fragmento gIII puede purificarse en gel y autoligarse), en medio SB (super-caldo; 30 g de triptona, 20 g de extracto de levadura y 10 g de MOPS por litro, pH 7) (Burton *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10134-10137, 1991) que contenían 50 µg/ml de ampicilina y glucosa al 1% hasta alcanzar una DO₆₀₀ nm de aproximadamente 1,0. Las células huésped bacterianas se peletizaron mediante centrifugación y se intercambió el medio por medio SB con IPTG 1 mM y MgCl₂ 20 mM, y las células se resuspendieron. El cultivo resultante se incubó a temperatura ambiente en una plataforma de agitación fijada a aproximadamente 290 rpm y se dejó durante la noche. El día siguiente las células se peletizaron, se descartó el sobrenadante, se añadió PBS (hasta aproximadamente 2% a 4% del volumen del cultivo original) y se liberó el contenido periplásmico de las células bacterianas mediante tres ciclos de congelación-descongelación. Se peletizaron los residuos bacterianos mediante centrifugación y el sobrenadante que contenía las moléculas Fab se dividió en alícuotas en viales nuevos. Las moléculas Fab se mantuvieron a -20°C hasta su utilización.

Ejemplo 6

Niveles de expresión de los clones de Fab

Se determinaron los niveles de expresión de las moléculas Fab (obtenidas en el Ejemplo 5) utilizando técnicas ELISA conocidas (Samuelsson *et al.*, Virology 207:495-502, 1995). En particular, F(ab')₂ antihumano de cabra (Pierce, USA) o Fd antihumano de cabra (The Binding Site, Reino Unido) se diluyó 1:1.000 en tampón carbonato-bicarbonato 0,1 M, pH 9,6 y se recubrieron pocillos de microtitulación con el mismo mediante incubación durante la noche a 4°C. Se descartó la solución de recubrimiento, y los pocillos se bloquearon con leche seca al 5% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente, extrajeron después la solución de bloqueo, y se añadieron las muestras de Fab (del Ejemplo 5) a diluciones apropiadas en PBS-T. Tras la incubación a temperatura ambiente durante 1 hora, las placas se lavaron

y se añadió ALP-F(ab')₂ antihumano de cabra a una dilución de 1:500. Tras incubar durante 1 hora y cinco lavados posteriores, se añadió la solución de sustrato de marcaje, p-nitrofenilfosfato (Sigma, USA) en dietanolamina 0,1 M, pH 9,8. Se midió la absorbancia a 405 nm en un lector de microplacas (Dynastar, MA). La mayoría de los clones de Fab se observó que producían entre 0,2 y 2,0 mg de Fab/l de cultivo, correspondiente a 10 a 100 µg/ml en las preparaciones periplásmicas. Los clones Fab expresados se cribaron para reactividad de E2 y se secuenciaron rápidamente, con el fin de identificar múltiples copias del mismo clon original.

Ejemplo 7

10 *Transferencia western para la expresión de cadena pesada y de cadena ligera*

Con el fin de someter a ensayo la expresión correcta de ambas cadenas, se analizaron varias moléculas de Fab en transferencias western utilizando antisuero para cadenas humanas Fd⁻ y ligeras. En particular, se separaron 10 µl de las preparaciones de la molécula Fab periplásmica (preparada en el Ejemplo 5) en un gel premoldeado de Tris al 12%-glicina poliacrilamida, y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa mediante electrotransferencia utilizando un aparato Mini-cell de Xcell (Novex Experimental Technology, San Diego, CA). La membrana se bloqueó en 5% de leche seca durante la noche, y se incubó con antisuero de anti-Fab humano acoplado con fosfatasa alcalina (disponible de Pierce) diluido 1:1.000 en leche seca al 5% y Tween-20 al 0,05% (PBS-MT) durante 3 horas a 22°C con agitación constante. Se seleccionó el antisuero anti-Fab humano porque es conocido que reacciona principalmente con las cadenas ligeras. Para detectar los productos de expresión de cadena pesada (Fd), en primer lugar se incubaron tiras con un suero de oveja anti-Fd humano (Binding Site, Reino Unido) que se diluyó 1:1.000 (tal como se ha indicado anteriormente), se lavó y después se incubó nuevamente con un anticuerpo secundario, IgG anti-cabra-AP (Sigma, St. Louis, MO) a una dilución de 1:500.

Tras la última incubación durante 1 hora a 22°C, las membranas se lavaron tres veces en PBS-T y se llevó a cabo el revelado del color con 2 ml de solución BCIP/NBT (Sigma, St. Louis, MO) durante 7 minutos. Las membranas se incubaron en agua y se secaron. Se utilizaron marcadores de peso molecular preteñidos (Amersham, Reino Unido) en cada membrana.

Para todos los clones sometidos a ensayo, la expresión de ambas cadenas era aproximadamente equivalente. La cadena pesada (expresada en forma de un polipéptido de fusión con la proteína gIII truncada) mostró un peso molecular aproximado de 70 kD.

Ejemplo 8

35 *Secuenciación de los clones Fab*

Se aisló plásmido de ADN de cada clon de molécula Fab cultivado en los cultivos celulares de *E. coli* XL-1 blue (en el Ejemplo 5) utilizando un sistema de reactivos de purificación de ADN Wizard Miniprep (Promega). Se obtuvo ADN monocatenario mediante PCR utilizando cebadores que se hibridaban cadena arriba y abajo de las regiones de clonación en el vector pComb3H (pC3H-2488S: 5'-CAA CGC AAT TAA TGT GAG TTA G; G-parte posterior: 5'-GCC CCC TTA TTA GCG TTT GCC ATC). En cada reacción, uno de los dos cebadores de PCXR utilizados se biotiniló en el extremo 5'-terminal. Tras 35 ciclos de amplificación por PCR, se obtuvo ADN monocatenario mediante desnaturalización del ADN bajo condiciones alcalinas y adsorción de la cadena de ADN biotinilado a perlas recubiertas con estreptavidina (Dynal, Oslo, Noruega) utilizando técnicas conocidas (Hultman *et al.*, Nucl. Acids Res. 17:4937-4945).

Se llevaron a cabo reacciones de secuenciación dideoxi según el procedimiento de Sanger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463-5467, 1977, utilizando cebadores marcados con FITC que se hibridaban en dirección 3' respecto a la unión entre las regiones variables y constante de Ig o en dirección 5' respecto a los genes de las cadenas pesada y ligera. Particularmente, se utilizó SEQKb: 5'-ATA GAA GTT GTT CAG CAG GCA y omp-seq: 5'-AAA ACA GCT ATC GCG ATT GCA G para las cadenas ligeras κ. Se utilizó SEQG5b: 5'-GTC GTT GAC CAG GCA GCC CAG y pel-seq: 5'-ACC TAT TGC CTA CGG CAG CCG para las cadenas pesadas γ. Los productos de reacción se corrieron en un secuenciador automático (A.L.F., Pharmacia Biotech) y se tradujeron y alinearon utilizando el programa informático MacMolly (SoftGene, Berlín, Alemania).

A partir de la primera serie de cribados llevada a cabo en el Ejemplo 4 (serie de cribados I), se secuenciaron 10 clones de moléculas Fab (identificadas como clones L1-L10 de moléculas Fab) sometidos a ensayo para expresión (tal como se describe en los Ejemplos 6 y 7) utilizando el procedimiento de secuenciación descrito anteriormente. Se encontró que estos 10 clones presentaban secuencias de CDR3 muy similares en las cadenas pesadas de los mismos (la región H3), indicando que todos derivaban del mismo clon de células B (Litwin *et al.*, J. Exp. Med. 171:293-297, 1990). Sin embargo, aunque las uniones VDJ y la longitud de las regiones H3 eran idénticos, se identificaron varias mutaciones puntuales diferentes en sus cadenas pesadas, y se combinó cada cadena pesada con una cadena ligera diferente. Se seleccionaron dos clones, identificados como clones L1 y L3 de molécula Fab, para el ensayo adicional.

A partir de la segunda serie de cribados llevada a cabo en el Ejemplo 4 (serie de cribados II), se secuenciaron 20 clones de molécula Fab (identificados como clones 1:1-1:20 de molécula Fab) sometidos a ensayo para expresión (tal como se describe en los Ejemplos 6 y 7). A partir de esta ronda de secuenciación, se encontró que 6 clones de

Fab producían niveles insuficientes de Fab, y que 4 clones de Fab mostraban reactividad cruzada con el antígeno de control en un ensayo de unión específica. A partir de esta información de secuenciación obtenida de los 10 clones de Fab restantes, se encontró que 7 clones de Fab portaban cadenas pesadas relacionadas con las encontradas en la serie de cribados I (los clones L1-10 de molécula Fab). Sin embargo, 3 de los 7 clones de Fab presentaban regiones H3
 5 claramente diferentes de los clones de la serie de cribados I, y también eran únicas comparadas entre sí. Estos clones se seleccionaron para el ensayo adicional y se identifican en la presente invención como clones 1:5, 1:7 y 1:11 de molécula Fab.

A partir de la tercera serie de cribados llevada a cabo en el Ejemplo 4 (serie de cribado III), se sometieron a ensayo
 10 30 clones de molécula Fab para expresión (tal como se describe en los Ejemplos 6 y 7), y se encontró que 16 eran reactivos tanto con el complejo antigénico E1/E2 como con el antígeno E2 solo. Estos 16 clones se secuenciaron tal como se ha indicado anteriormente. 12 de los 16 clones que se secuenciaron se encontró que presentaban una secuencia H3 similar a la de los clones L1-L10, mientras que los 4 restantes se encontró que presentaban secuencias H3 únicas. Dos de los 4 clones que presentaban secuencias H3 únicas se seleccionaron para ensayos adicionales y se identifican
 15 en la presente invención como clones A8 y A12 de molécula Fab.

Las secuencias de ácidos nucleicos de cadena ligera κ de los clones de molécula Fab siguientes: 1:5, 1:7, 1:11, L3, L1, A8 y A12, se ilustran en las figuras 3A-3G, respectivamente.

Las secuencias de ácidos nucleicos de la cadena pesada $\gamma 1$ de los clones de molécula Fab siguientes: 1:5, 1:7, 1:11, L3, L1, 8 y A12 se ilustran en las figuras 4A-4G, respectivamente.

Las secuencias de aminoácidos de cadena pesada $\gamma 1$ deducida de los clones de molécula Fab 1:5, 1:7, 1:11, L3, L1, A8 y A12 se ilustran en las figuras 1A-1G, respectivamente. Se han identificado las regiones CDR (CDR1, CDR2 y CDR3) de cada cadena en las figuras.

Las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera κ deducida de los clones de molécula Fab 1:5, 1:7, 1:11, L3, L1, A8 y A12 se ilustran en las figuras 2A-2G, respectivamente. Las regiones CDR (CDR1, CDR2 y CDR3) de cada cadena también se han identificado tal como se ha indicado anteriormente.

En resumen, de los 50 clones obtenidos de las tres series de cribado, se encontró que 36 eran específicos de E2, y que 29 de entre los 36 clones específicos de E2 compartían una cadena pesada relacionada.

Ejemplo 9

Ensayo ELISA para la reactividad de antígeno E2 de HCV

Se cribaron los clones de molécula Fab 1:5, 1:7, 1:11 y L3 para reactividad de antígeno E2 de HCV, de la manera
 40 siguiente. Se diluyó antígeno E2 de HCV conformacional recombinante o antígeno complejo E1/E2 de HCV recombinante (preparado tal como se ha descrito en el Ejemplo 3) hasta una concentración de 0,25 $\mu\text{g/ml}$ en tampón carbonato-bicarbonato 0,05 M, pH 9,6, y se recubrieron pocillos de microtitulación (Costar n° 3690; Life Technologies) con el mismo durante la noche a 4°C. Se descartó el antígeno no unido, y los pocillos se bloquearon con leche seca no grasa al 5% en PBS durante 60 minutos a temperatura ambiente. Tras descartar la solución de bloqueo, se añadieron las
 45 soluciones que contenían la molécula Fab que debía someterse a ensayo a las diluciones 1:2, 1:10 y 1:100 (diluyente: PBS con NP-40 al 0,1%). Se incubaron las placas a temperatura ambiente durante 2 horas, se lavaron cinco veces con PBS con Tween 20 al 0,05% (PBS-T) y se añadió F(ab')₂ antihumano de cabra-ALP (Pierce, Rocherford, IL) a una dilución de 1:1.000. Tras 60 minutos y los lavados posteriores, se añadió solución de sustrato (p-nitrofenilfosfato) (SIGMA, St. Louis, MO) y se midió la absorbancia a 405 nm en un lector de microplacas (Dynastar, MA).

El valor de corte para las lecturas positivas se fijó en 4 veces el valor de DO obtenido para una muestra de control negativo que comprendía un Fab anti-VIH de igual concentración (Barbas III *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7978-7982, 1991). Con fines de control, se utilizó albúmina de suero bovino (BSA) (SIGMA), VIH gp120_{LAI} (Intracell, Cambridge, MA) y toxoide tetánico (TT) (SBL Vaccin, Solna, Suecia) en capas de 5, 1 y 1 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente,
 55 se utilizaron en ELISAs correspondientes como controles para reactividad no específica.

Se ilustran los resultados de las ELISAs en la Tabla II, posteriormente. Tal como puede observarse, las moléculas Fab expresadas en los clones 1:5, 1:7, 1:11 y L3 reaccionaron fuertemente, cada uno de ellos, tanto con el antígeno E2 de HCV conformacional como el antígeno complejo E1/E2 de HCV, no mostrando ninguna reactividad cruzada con
 60 los antígenos de control (BSA, VIHgp120 y TT).

TABLA II						
Clon	[Fab] ($\mu\text{g/ml}$) ¹	Reactividad en ELISA frente a:				
		E2 ²	E1/E2 ²	BSA ²	VIH gp120 ²	TT ²
L3	100	1,695	2,460	0,089	ND	0,313
1:5	10	0,219	0,614	0,031	ND	0,012 ³
1:7	100	>3.000	>3.000	0,006	ND	ND
1:11	10	>3.000	1,831	0,506	ND	ND
¹ Concentración de Fab en la preparación periplásmica utilizada en los análisis						
² DO 405 nm, muestra diluida 1:10.						
³ muestra diluida 1:100.						

20 Ejemplo 10

Ensayo de transferencia western para la reactividad del antígeno E2 de HCV

Los clones de molécula Fab 1:5, 1:7, 1:11, L1, L3, A8 y A12 se cribaron para reactividad de antígeno E2 de HCV utilizando las técnicas siguientes. Se llevaron a cabo transferencias western utilizando 1 μg de la glucoproteína E2 de HCV conformacional recombinante (obtenida en el Ejemplo 3) que se desnaturizó mediante calentamiento a 98°C durante 5 minutos en un tampón Laemmli, se separó en un gel de gradiente de poliacrilamida 8 a 16% (Novex Experimental Technologies) y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa que se había bloqueado tal como se ha indicado anteriormente, y se cortó en tiras. Posteriormente, se incubó cada tira con una preparación de Fab (expresado a partir de los clones 1:5, 1:7, 1:11, L3, L1, A8 y A12) que se diluyó 1:20 en PBS-MT durante 2 horas a 22°C bajo agitación constante. Las tiras se lavaron tres veces en PBS-T y se añadió suero de Fb antihumano de cabra conjugado con fosfatasa alcalina (Pierce), diluido 1:1.000 en PBS-MT. Tras incubar durante 1 hora a 22°C, las tiras se lavaron nuevamente tres veces en PBS con Tween 20 al 0,05% y se llevó a cabo el revelado del color con 2 ml de solución BCIP/NBT (Sigma, St. Louis, MO) durante 10 minutos. A modo de control positivo, se incubó suero humano positivo para anti-HCV con una tira en lugar de las preparaciones de Fab.

Ninguna de las moléculas Fab sometidas a ensayo (procedentes de los clones 1:5, 1:7, 1:11, L3, L1, A8 y A12) reaccionó con el antígeno E2 de HCV desnaturizado en la transferencia western, indicando que cada molécula Fab se une a un epítipo conformacional del antígeno E2 de HCV. Sin embargo, el control positivo (suero humano positivo para anti-HCV) sí reaccionó con el antígeno E2 desnaturizado en la transferencia western.

El ensayo anteriormente descrito se repitió bajo condiciones idénticas, siendo la única modificación la utilización de antígeno E2 de HCV que se había separado en gel bajo condiciones no desnaturizantes. Se encontró que los dos clones (1:7 y A8) sometidos a ensayo en este ensayo adicional se unían al antígeno E2 no desnaturizado.

Ejemplo 11

Ensayo ELISA de inhibición para la determinación de la afinidad

Se estimó la afinidad de las moléculas Fab (procedentes de los clones 1:5, 1:7, 1:11, L3, L1, A8 y A12) para el antígeno E2 de HCV utilizando un procedimiento ELISA de inhibición tal como se ha descrito anteriormente (Persson *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2432-2436, 1991; Rath *et al.*, J. Immun. Methods 106:245-249, 1988). Las muestras que debían someterse a ensayo en primer lugar se titularon a diluciones de diez veces con el fin de estimar un rango de concentraciones de manera que una concentración reducida en diez veces proporcionase una reducción sustancial de la unión detectada en la ELISA de E2 de HCV. Para las mediciones de la afinidad, se llevó a cabo el recubrimiento de los pocillos de microtitulación con antígeno E2 de HCV (genotipo 1a de HCV) y el bloqueo posterior tal como se ha descrito anteriormente para la ELISA llevada a cabo en el Ejemplo 9. Se añadieron a los pocillos diluciones apropiadas de las muestras de Fab, con o sin antígeno E2 de HCV soluble añadido (concentración final: 5 $\mu\text{g/ml}$), y se incubaron a temperatura ambiente durante 3 horas. Las placas se lavaron uniformemente 4 veces con PBS-T, y se revelaron utilizando sustrato AP-anti-Fab y el lector espectrofotométrico indicado anteriormente, en el Ejemplo 9. Se calculó la reducción de DO en presencia de antígeno E2 de HCV soluble y se estimó mediante extrapolación la concentración necesaria para una reducción de 50%.

Tal como se ilustra en la Tabla III, posteriormente, las afinidades aproximadas de las moléculas Fab (procedentes de los clones 1:5, 1:7, 1:11, L3, L1, A8 y A12) para el antígeno E2 de HCV conformacional recombinante (genotipo 1a de HCV) variaban entre 1×10^7 y $2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$.

TABLA III		
Clon	K_d^1 (nM)	Afinidad (M^{-1})
L3	28	4×10^7
1:5	>100	$<1 \times 10^7$
1:7	6	2×10^8
1:11	28	4×10^7
L1	28	4×10^7
A8	6	2×10^8
A12	100	1×10^7
¹ Concentración aproximada necesaria de E2 soluble para una reducción de DO de 50%		

También se evaluó la afinidad de las moléculas Fab (procedentes de los clones 1:7, A8 y A12) para un antígeno E2 de HCV diferente (genotipo 1b de HCV) utilizando la ELISA de inhibición anteriormente indicada. Se encontró que las afinidades para el antígeno E2 del genotipo 1b en cada una de las moléculas sometidas a ensayo era similar a las informadas anteriormente (Tabla III) para el antígeno E2 de genotipo 1a.

Además, se evaluaron moléculas IgG recombinantes completas preparadas a partir de los clones de molécula Fab siguientes: L1, L3, 1:5, 1:7 y 1:11, utilizando la ELISA de inhibición anteriormente indicada con el antígeno E2 de HCV de genotipo 1a. Las afinidades observadas eran similares a las informadas anteriormente (Tabla III) para los clones de molécula Fab.

Ejemplo 12

Inhibición de la unión de E2 de HCV

Se determinó la capacidad de las moléculas Fab (procedentes de los clones 1:5, 1:7, 1:11, L3, L1, A8 y A12) de bloquear la unión de E2 de HCV a células diana utilizando el procedimiento de neutralización de la unión (NOB) de Rosa *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:1759-1763, 1996. Más particularmente, se utilizó antígeno E2 de HCV conformacional purificado (de ambos genotipos: HCV 1a y HCV 1b, y preparados tal como se describe en el Ejemplo 3) en experimentos de inmunofluorescencia indirecta para evaluar la capacidad de dos lotes separados de clones de molécula Fab expresados por bacterias para neutralizar la unión del polipéptido E2 de HCV a células humanas *in vitro*.

En el ensayo, se mezclaron 20 μ l del antígeno E2 de HCV conformacional purificado (en PBS a una concentración de 0,5 μ g/ml) con diversas diluciones de los clones de Fab. Tras incubar a 4°C durante 1 hora, se añadieron pellets de células MOLT-4 (una línea celular humana que se ha informado que permite la replicación de bajo nivel de HCV *in vitro*, tal como describen Shimizu *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5477-5481, 1992) y la mezcla de reacción resultante se incubó durante 1 hora a 4°C. Se eliminaron el antígeno HCV y los anticuerpos no unidos mediante dos centrifugaciones en PBS a 200 x g durante 5 minutos a 4°C. A continuación, las células se incubaron durante 30 minutos a 4°C con suero humano reactivo con anti-E2 de HCV. Seguidamente las células se lavaron dos veces en PBS y se incubaron durante 30 minutos con antisuero conjugado con isotiocianato de fluoresceína específico para Fab humano. Las células se lavaron nuevamente en PBS a 4°C y se resuspendieron en 100 μ l de PBS. Se analizó la fluorescencia unida a células con un citómetro de flujo (FACScan, Becton Dickinson) utilizando el programa informático Lysis II (Becton Dickinson). Se calculó la intensidad de fluorescencia media de las poblaciones celulares incubadas con las diversas preparaciones de Fab, y se comparó con la intensidad de fluorescencia media de células incubadas sin anticuerpos o sin el antígeno E2.

Se ilustran los resultados posteriormente, en la Tabla IV. Tal como puede observarse, la totalidad de los siete clones Fab sometidos a ensayo inhibió eficientemente la unión de células MOLT-4 con el antígeno E2 de HCV conformacional (ambos genotipos de HCV, 1a y 1b). Los clones A8, 1:7, L1 y L3 presentaban una actividad de neutralización muy elevada en el ensayo. El título de reducción del 50% se muestra para todos los clones sometidos a ensayo en la Tabla IV, y el resultado completo del ensayo para 4 de los clones se muestra en la figura 5. Dos clones de Fab de control negativo preparados de la misma manera que la descrita anteriormente aunque dirigidos contra la glucoproteína gp120 de cubierta de VIH-1 (clones b12 y b14) no presentaron actividad de neutralización en el ensayo.

TABLA IV			
	Antígeno		
	E2-1a		E2-1b
	Exp. I	Exp. II	Exp. II
clon			
1:5	1,5*	2,5	2,5
1:7	0,02	0,01	0,02
1:11	0,4	0,1	0,15
L1	0,02	0,03	0,03
L3	0,02	0,02	0,03
A8	n.d.	0,001	0,007
A12	n.d.	0,1	0,15
b12	>10	>10	>10
b14	n.d.	>10	>10
*concentración de Fab, en µg/ml			

Debido a que el primer contacto entre el virus HCV y el huésped del mismo se produce mediante la unión de la cubierta del virus con receptores de superficie celular, la capacidad de las presentes moléculas de Fab de neutralizar dicha interacción determinar la efectividad de la utilización de dichas moléculas en vacunas para proporcionar inmunización pasiva frente a HCV.

De esta manera, se dan a conocer nuevos anticuerpos monoclonales humanos contra el antígeno E2 de HCV. Aunque se han descrito realizaciones preferentes de la invención en detalle, debe entenderse que pueden llevarse a cabo variaciones evidentes sin apartarse del espíritu y alcance de la invención según las reivindicaciones adjuntas.

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante está prevista únicamente para ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto el máximo cuidado en su realización, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP declina cualquier responsabilidad en este respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- WO 8904669 A [0004]
- WO 9011089 A [0004]
- WO 9014436 A [0004]
- EP 447984 A [0007]
- US 5308750 A, Mehta [0009]
- US 5091513 A [0044] [0109] [0110]
- US 5132405 A, Huston [0044] [0109] [0110]
- US 4946778 A, Ladner [0044] [0109] [0110]
- US 4683195 A [0061]
- US 4683202 A [0061]
- EP 36776 A [0073]
- US 4551433 A [0073]
- US 4837148 A [0076]

ES 2 320 051 T3

- US 4929555 A [0076]
- EP 244234 A [0076]
- 5 • WO 9100357 A [0076]
- EP 284044 A [0077]
- EP 329203 A [0077]
- 10 • EP 073657 A [0077]
- US 4876197 A [0077]
- 15 • US 4880734 A [0077]
- EP 164556 A [0077]
- EP 012873 A [0078]
- 20 • JP 62096086 B [0078]
- US 4588684 A [0078]
- 25 • US 4546083 A [0078]
- US 4870008 A [0078]
- EP 324274 A [0078]
- 30 • WO 8902463 A [0078]
- EP 060057 A [0078]
- 35 • US 4745051 A [0082] [0091]
- EP 127839 A [0085]
- EP 155476 A [0085]
- 40 • US 4399216 A [0099]
- US 4767704 A [0101]
- 45 • US 4657866 A [0101]
- US 4927762 A [0101]
- US 4560655 A [0101]
- 50 • WO 90103430 A [0101]
- WO 8700195 A [0101]
- 55 • US RE30985 E [0101]
- US 5219740 A [0118]
- WO 9102805 A [0118]
- 60 • US 40479695 A [0118]
- US 08405627 B [0118]
- 65 • US 08156789 B [0118]
- US 5173414 A [0120]

- US 5139941 A [0120]
- WO 9201070 A [0120]
- 5 • WO 9303769 A [0120]
- WO 9112882 A [0123]
- WO 8903429 A [0123]
- 10 • WO 9203545 A [0123]
- EP 9701977 W [0179]

15 **Literatura no de patentes citada en la descripción**

- **ALTER** *et al.* *Infect Agents Dis*, 1993, vol. 2, 155-166 [0002]
- **OHTO** *et al.* *N Engl J Med*, 1994, vol. 330, 744-750 [0002]
- 20 • **ALTER** *et al.* *JAMA*, 1990, vol. 264, 2231-2235 [0002]
- **ALTER** *et al.* *N Engl J Med*, 1992, vol. 327, 1899-1905 [0002]
- 25 • **SIMMONDS** *et al.* *J. Gen. Virol.*, 1993, vol. 74, 2391-2399 [0004] [0031]
- **CHOO** *et al.* *Science*, 1989, vol. 244, 359-362 [0004]
- **CHOO** *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 2451-2455 [0004]
- 30 • **HAN** *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 1711-1715 [0004]
- **HOUGHTON** *et al.* *Hepatology*, 1991, vol. 14, 381-388 [0005]
- 35 • **GRAKOU** *et al.* *J. Virol.*, 1993, vol. 67, 1385-1395 [0005] [0005]
- **TOMEI** *et al.* *J. Virol.*, 1993, vol. 67, 4017-4026 [0005]
- **LANFORD** *et al.* *Virology*, 1993, vol. 197, 225-235 [0005]
- 40 • **RALSTON** *et al.* *J. Virol.*, 1993, vol. 67, 6753-6761 [0005]
- **CHOO** *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, vol. 91, 1294-1298 [0007]
- 45 • **KOZIEL** *et al.* *J Virol*, 1993, vol. 67, 7522-7532 [0008]
- **ALTER** *et al.* *N Engl J Med*, 1989, vol. 321, 1494-1500 [0008]
- **SHIMIZU** *et al.* *J Virol*, 1994, vol. 68, 1494-1500 [0008]
- 50 • **FARCI** *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, vol. 91, 7792-7796 [0008]
- **KOHLER** *et al.* *Nature*, 1975, vol. 256, 495-497 [0009]
- 55 • **SAMBROOK** *et al.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 1989 [0028]
- DNA Cloning: A Practical Approach. vol. I,II [0028]
- *Oligonucleotide Synthesis*. 1984 [0028]
- 60 • *Nucleic Acid Hybridization*. 1985 [0028]
- *Transcription and Translation*. 1984 [0028]
- 65 • *Animal Cell Culture*. 1986 [0028]
- **PERBAL**. *A Practical Guide to Molecular Cloning*, 1984 [0028]

ES 2 320 051 T3

- *Fundamental Virology*. vol. I,II [0028]
- Hepatitis C Viruses. HOUGHTON, M. *et al.* *Fields Virology*. *Lippincott-Raven Publishers*, 1996 [0031]
- 5 • **SIMMONDS** *et al.* *J Gen Virol*, 1993, vol. 74, 2391-2399 [0035]
- **PEARSON** *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, vol. 85, 2444-2448 [0035]
- 10 • **DAVIES** *et al.* *Annual Rev Biochem*, 1990, vol. 59, 439-473 [0041]
- **INBAR** *et al.* *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1972, vol. 69, 2659-2662 [0042] [0108]
- **HOCHMAN** *et al.* *Biochem*, 1976, vol. 15, 2706-2710 [0042] [0108]
- 15 • **EHRlich** *et al.* *Biochem*, 1980, vol. 19, 4091-4096 [0042] [0108]
- **HUSTON** *et al.* *Proc Nat Acad Sci USA*, 1988, vol. 85 (16), 5879-5883 [0044]
- **CHANOCK** *et al.* *Infect Agents Dis*, 1993, vol. 2, 118-131 [0060]
- 20 • **BARBAS, III** *et al.* *Methods: Comp. Meth Enzymol*, 1995, vol. 8, 94-103 [0060] [0061] [0140]
- **CHOMCZYNSKI** *et al.* *Anal Biochem*, 1987, vol. 162, 156-159 [0061] [0138]
- 25 • **SAIKI** *et al.* *Nature*, 1986, vol. 324, 163 [0061]
- **SCHARF** *et al.* *Science*, 1986, vol. 233, 1076-1078 [0061]
- **PERSSON** *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, vol. 88, 2432-2436 [0061] [0069] [0138] [0170]
- 30 • **KANG** *et al.* *Methods: Comp. Meth Enzymol*, 1991, vol. 2, 111-118 [0061] [0138]
- **YANG** *et al.* *J Mol Biol*, 1995, vol. 254, 392-403 [0061] [0140]
- 35 • **BARBAS, III** *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, vol. 88, 7978-7982 [0061] [0140]
- **BURTON** *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, vol. 88, 10134-10137 [0065] [0146] [0149]
- **SAMUELSSON** *et al.* *Virology*, 1995, vol. 207, 495-502 [0065] [0140] [0146] [0150]
- 40 • **WIDELL** *et al.* *J Med Virol*, 1994, vol. 44, 272-279 [0066] [0136]
- **SPAETE** *et al.* *Virology*, 1992, vol. 188, 819-830 [0067] [0144] [0146]
- 45 • **ROSA** *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, vol. 93, 1759-1763 [0067] [0143] [0174]
- **CHOO** *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, vol. 91, 1294-1298 [0067] [0145]
- **RATH** *et al.* *J Immun Methods*, 1988, vol. 106, 245-249 [0069] [0170]
- 50 • **SANGER** *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, vol. 74, 5463-5467 [0070] [0155]
- **KABAT** *et al.* *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. U.S. *Dept. of Health and Human Services*, 1987
[0070]
- 55 • **EDGE**. *Nature*, 1981, vol. 292, 756 [0071]
- **NAMBAIR** *et al.* *Science*, 1984, vol. 223, 1299 [0071]
- 60 • **JAY** *et al.* *J. Biol. Chem.*, 1984, vol. 259, 6311 [0071]
- **CHANG** *et al.* *Nature*, 1978, vol. 275, 615 [0073]
- **GOEDDEL** *et al.* *Nature*, vol. 281, 544 [0073]
- 65 • **GOEDDEL** *et al.* *Nucleic Acids Res.*, 1980, vol. 8, 4057 [0073]
- **DEBOER** *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, vol. 80, 21-25 [0073]

ES 2 320 051 T3

- **SIEBENLIST** *et al. Cell*, 1980, vol. 20, 269 [0073]
- **HINNEN** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1978, vol. 75, 1929 [0076]
- 5 • **ITO** *et al. J. Bacteriol.*, 1983, vol. 153, 163 [0076]
- **KURTZ** *et al. Mol. Cell. Biol.*, 1986, vol. 6, 142 [0076]
- **KUNZE** *et al. J. Basic Microbiol.*, 1985, vol. 25, 141 [0076] [0076]
- 10 • **GLEESON** *et al. J. Gen. Microbiol.*, 1986, vol. 132, 3459 [0076]
- **ROGGENKAMP** *et al. Mol. Gen. Genet.*, 1986, vol. 202, 302 [0076]
- 15 • **DAS** *et al. J. Bacteriol.*, 1984, vol. 158, 1165 [0076]
- **DE LOUVENCOURT** *et al. J. Bacteriol.*, 1983, vol. 154, 737 [0076]
- **VAN DEN BERG** *et al. Bio/Technology*, 1990, vol. 8, 135 [0076]
- 20 • **CREGG** *et al. Mol. Cell. Biol.*, 1985, vol. 5, 3376 [0076]
- **BEACH; NURSE**. *Nature*, 1981, vol. 300, 706 [0076]
- 25 • **DAVIDOW** *et al. Curr. Genet.*, 1985, vol. 10, 380 [0076]
- **GAILLARDIN** *et al. Curr. Genet.*, 1985, vol. 10, 49 [0076]
- **BALLANCE** *et al. Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1983, vol. 112, 284-289 [0076]
- 30 • **TILBURN** *et al. Gene*, 1983, vol. 26, 205-221 [0076]
- **YELTON** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 1470-1474 [0076]
- 35 • **KELLY; HYNES**. *EMBO J.*, 1985, vol. 4, 475-479 [0076]
- **MYANOHARA** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, vol. 80, 1 [0077]
- **HITZEMAN** *et al. J. Biol. Chem.*, 1980, vol. 255, 2073 [0077]
- 40 • **HESS** *et al. J. Adv. Enzyme Reg.*, 1968, vol. 7, 149 [0077]
- **HOLLAND** *et al. Biochemistry*, 1978, vol. 17, 4900 [0077]
- 45 • **HOLLAND** *et al. J. Biol. Chem.*, 1981, vol. 256, 1385 [0078]
- **VAN SOLINGEN** *et al. J. Bact.*, 1977, vol. 130, 946 [0079]
- **HSIAO** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, vol. 76, 3829 [0079]
- 50 • **KINGSMAN** *et al. Gene*, 1979, vol. 7, 141 [0080]
- **TSCHEMPER** *et al. Gene*, 1980, vol. 10, 157 [0080]
- 55 • The Regulation of Baculovirus Gene Expression. **FRIESEN** *et al. THE MOLECULAR BIOLOGY OF BACULO-VIRUSES*. 1986 [0085]
- **VLAK** *et al. J. Gen. Virol.*, 1988, vol. 69, 765-776 [0085]
- 60 • **MILLER** *et al. Ann. Rev. Microbiol.*, 1988, vol. 42, 177 [0086]
- **CARBONELL** *et al. Gene*, 1988, vol. 73, 409 [0086]
- **MAEDA** *et al. Nature*, 1985, vol. 315, 592-594 [0086] [0087]
- 65 • **LEBACQ-VERHEYDEN** *et al. Mol. Cell. Biol.*, 1988, vol. 8, 3129 [0086]
- **SMITH** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, vol. 82, 8404 [0086]

ES 2 320 051 T3

- **MIYAJIMA** *et al. Gene*, 1987, vol. 58, 273 [0086]
- **MARTIN** *et al. DNA*, 1988, vol. 7, 99 [0086]
- 5 • **LUCKOW** *et al. Bio/Technology*, 1988, vol. 6, 47-55 [0087]
- **MILLER** *et al. GENETIC ENGINEERING. Plenum Publishing*, 1986, vol. 8, 277-279 [0087]
- **GUARINO; SUMMERS.** *J. Virol.*, 1986, vol. 57, 563-571 [0088]
- 10 • *J. Virol.*, 1987, vol. 61, 2091-2099 [0088]
- **GUANNO; SUMMERS.** *Virol.*, 1988, vol. 162, 444-451 [0088]
- 15 • **GUARINO; SUMMERS.** *J. Virol.*, 1986, vol. 60, 215-223 [0089]
- **GUARINO** *et al. J. Virol.*, 1986, vol. 60, 224-229 [0089]
- 20 • **SUMMERS; SMITH.** *A MANUAL OF METHODS FOR BACULOVIRUS VECTORS AND INSECT CELL CULTURE PROCEDURES*, 1987 [0094]
- **SMITH** *et al. Mol. Cell. Biol.*, 1983 [0094]
- **LUCKOW; SUMMERS.** *Virology*, 1989, vol. 17, 31 [0094]
- 25 • **VOLKMAN; SUMMERS.** *J. Virol.*, 1975, vol. 19, 820-832 [0096]
- **VOLKMAN** *et al. J. Virol.*, 1976, vol. 19, 820-832 [0096]
- 30 • **SAMBROOK** *et al. MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. Cold Spring Harbor Press*, 1989 [0097]
- **DIJKEMA** *et al. EMBO J*, 1985, vol. 4, 761 [0098]
- 35 • **GORMAN** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982, vol. 79, 6777 [0098]
- **BOSHART** *et al. Cell*, vol. 41, 521 [0098]
- **FELGNER** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, vol. 84, 7413 [0099]
- 40 • **HAM; WALLACE.** *Meth. Enz.*, 1979, vol. 58, 44 [0101]
- **BARNES; SATO.** *Anal. Biochem.*, 1980, vol. 102, 255 [0101]
- 45 • **J. M. STEWART; J. D. YOUNG.** *Solid Phase Peptide Synthesis. Pierce Chemical Co*, 1984 [0103]
- **G. BARANY; R. B. MERRIFIELD.** *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology. Academic Press*, 1980, vol. 2, 3-254 [0103]
- 50 • **M. BODANSKY.** *Principles of Peptide Synthesis. Springer-Verlag*, 1984 [0103]
- *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology.* vol. 1 [0103]
- **BENDER** *et al. Hum Antibod Hybridomas*, 1992, vol. 4, 74 [0104]
- 55 • **GREEN** *et al. Nucleic Acids Res*, 1988, vol. 16, 369 [0104]
- **BURTON** *et al. Science*, 1994, vol. 266, 1024-1027 [0105]
- 60 • **BEBBINGTON** *et al. Bio/Technology*, 1992, vol. 10, 169 [0106]
- **SAMUELSSON** *et al. Eur. J. Immunol.*, 1996, vol. 26, 3029 [0107]
- **HUSTON** *et al. Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1988, vol. 85 (16), 5879-5883 [0109]
- 65 • **HORTON** *et al. BioTechniques*, 1990, vol. 8, 528-535 [0112]
- **CAUSSE** *et al. Gastroenterology*, 1991, vol. 101, 497-502 [0114]

- **DAVIS** *et al. N Engl J Med*, 1989, vol. 321, 1501-1506 [0114]
- **MARCELLIN** *et al. Hepatology*, 1991, vol. 13, 393-397 [0114]
- 5 • **OMATA** *et al. Lancet*, 1991, vol. 338, 914-915 [0114]
- **DI BISCEGLIE** *et al. Hepatology*, 1992, vol. 16, 649-654 [0114]
- **REICHARD** *et al. Lancet*, 1991, vol. 337, 1058-1061 [0114]
- 10 • **WAKITA** *et al. J Biol Chem*, 1994, vol. 269, 14205-14210 [0114]
- **BOTTELLI** *et al. Gastroenterology*, 1993, vol. 104, 879 [0114]
- 15 • **O'BRIEN** *et al. Gastroenterology*, 1993, vol. 104, 966 [0114]
- **KAKUMU** *et al. Gastroenterology*, 1993, vol. 105, 507-512 [0114]
- **MILLER; ROSMAN**. *BioTechniques*, 1989, vol. 7, 980-990 [0118]
- 20 • **MILLER, A.D.** *Human Gene Therapy*, 1990, vol. 1, 5-14 [0118]
- **SCARPA** *et al. Virology*, 1991, vol. 180, 849-852 [0118]
- 25 • **BURNS** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 8033-8037 [0118]
- **BORIS-LAWRIE; TEMIN**. *Cur. Opin. Genet. Develop.*, 1993, vol. 3, 102-109 [0118]
- **HAJ-AHMAD; GRAHAM**. *J. Virol.*, 1986, vol. 57, 267-274 [0119]
- 30 • **BETT** *et al. J. Virol.*, 1993, vol. 67, 5911-5921 [0119]
- **MITTEREDER** *et al. Human Gene Therapy*, 1994, vol. 5, 717-729 [0119]
- 35 • **SETH** *et al. J. Virol.*, 1994, vol. 68, 933-940 [0119]
- **BARR** *et al. Gene Therapy*, 1994, vol. 1, 51-58 [0119]
- **BERKNER, K.L.** *BioTechniques*, 1988, vol. 6, 616-629 [0119]
- 40 • **RICH** *et al. Human Gene Therapy*, 1993, vol. 4, 461-476 [0119]
- **LEBKOWSKI** *et al. Molec. Cell. Biol.* 1988, vol. 8, 3988-3996 [0120]
- 45 • **VINCENT** *et al. Vaccines. Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1990, vol. 90 [0120]
- **CARTER, B.J.** *Current Opinion in Biotechnology*, 1992, vol. 3, 533-539 [0120]
- **MUZYCZKA, N.** *Current Topics in Microbiol. and Immunol.*, 1992, vol. 158, 97-129 [0120]
- 50 • **KOTIN, R.M.** *Human Gene Therapy*, 1994, vol. 5, 793-801 [0120]
- **SHELLING; SMITH**. *Gene Therapy*, 1994, vol. 1, 165-169 [0120]
- 55 • **ZHOU** *et al. J. Exp. Med.*, 1994, vol. 179, 1867-1875 [0120]
- **ELROY-STEIN; MOSS**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, vol. 87, 6743-6747 [0122]
- **FUERST** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, vol. 83, 8122-8126 [0122]
- 60 • **MICHAEL** *et al. J. Biol. Chem.*, 1993, vol. 268, 6866-6869 [0124]
- **WAGNER** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 6099-6103 [0124]
- 65 • **ALLANDER** *et al. J Med Virol*, 1994, vol. 43, 415-419 [0142]
- **CHOO** *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, vol. 88, 2451-2455 [0142]

ES 2 320 051 T3

- **DORSCH-HASLER** *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, vol. 82, 8325-8329 [0142]
- **SPAETE** *et al.* *J Virol*, 1990, vol. 64, 2922-2931 [0144]
- 5 • **BARBAS, III** *et al.* *Methods: Comp. Meth Enzymol*, 1991, vol. 2, 119-124 [0146]
- **HULTMAN** *et al.* *Nucl Acid Res*, 1989, vol. 17, 4937-4945 [0154]
- **LITWIN** *et al.* *J Exp Med*, 1990, vol. 171, 293-297 [0156]
- 10 • **BARBAS III** *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, vol. 88, 7978-7982 [0165]
- **SHIMIZU** *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, vol. 89, 5477-5481 [0175]

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo monoclonal humano recombinante que muestra afinidad de unión inmunológica con el antígeno E2 del virus de la hepatitis C (HCV), comprendiendo el anticuerpo una molécula Fab que comprende una parte ligante del antígeno E2 de HCV de una región variable de cadena pesada $\gamma 1$ humana (V_H) y una parte ligante de antígeno E2 de HCV de una región variable de cadena ligera κ humana (V_L), en las que:
 - la región V_H es:
 - (i) la secuencia de aminoácidos contigua ilustrada en cualquiera de las figuras 1A a 1G, o
 - (ii) una secuencia de aminoácidos contigua con una identidad de secuencia de por lo menos 90% con cualquiera de (i), y
 - la región V_L es:
 - (a) la secuencia de aminoácidos contigua ilustrada en cualquiera de las figuras 2A a 2G, o
 - (b) una secuencia de aminoácidos contigua con una identidad de secuencia de por lo menos 90% con cualquiera de a),en la que el anticuerpo monoclonal presenta reactividad cruzada con antígenos E2 de los genotipos 1a y 1b de HCV.
2. Anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1, en el que la molécula Fab comprende la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada (V_H) ilustrada en la figura 1A.
3. Anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1, en el que la molécula Fab comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (V_H) ilustrada en la figura 1B.
4. Anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1, en el que la molécula Fab comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (V_H) ilustrada en la figura 1C.
5. Anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1, en el que la molécula Fab comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (V_H) ilustrada en la figura 1D.
6. Anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1, en el que la molécula Fab comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera (V_L) ilustrada en la figura 2A.
7. Anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1, en el que la molécula Fab comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera (V_L) ilustrada en la figura 2B.
8. Anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1, en el que la molécula Fab comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera (V_L) ilustrada en la figura 2C.
9. Anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1, en el que la molécula Fab comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera (V_L) ilustrada en la figura 2D.
10. Anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1, en el que la molécula Fab comprende la secuencia de aminoácidos contigua ilustrada en la figura 1A y la secuencia de aminoácidos contigua ilustrada en la figura 2B.
11. Anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1, en el que la molécula Fab comprende la secuencia de aminoácidos contigua ilustrada en la figura 1B y la secuencia de aminoácidos contigua ilustrada en la figura 2B.
12. Anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1, en el que la molécula Fab comprende la secuencia de aminoácidos contigua ilustrada en la figura 1C y la secuencia de aminoácidos contigua ilustrada en la figura 2C.
13. Anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1, en el que la molécula Fab comprende la secuencia de aminoácidos contigua ilustrada en la figura 1D y la secuencia de aminoácidos contigua ilustrada en la figura 2D.
14. Anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo monoclonal comprende un fragmento $F(ab')_2$ capaz de unirse a un antígeno E2 del virus de la hepatitis C (HCV).
15. Anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo monoclonal comprende una molécula de Fab capaz de unirse a un antígeno E2 del virus de la hepatitis C (HCV).
16. Anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, **caracterizado** además porque dicho anticuerpo monoclonal presenta una afinidad de unión de por lo menos aproximadamente $1,0 \times 10^7$.

ES 2 320 051 T3

17. Anticuerpo monoclonal según la reivindicación 16, **caracterizado** además porque dicho anticuerpo monoclonal también se une al complejo E1/E2 del virus de la hepatitis C (HCV) según determinación mediante ensayo ELISA.

18. Composición de vacuna que comprende el anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

19. Complejo de unión que comprende el anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, y un grupo detectable unido al mismo.

20. Complejo de unión según la reivindicación 19, en el que el grupo detectable se selecciona de entre el grupo que consiste de isótopos radioactivos, fluorescentes, quimioluminiscentes, enzimas, sustratos de enzima, cofactores de enzima, inhibidores de enzima y pigmentos.

21. Procedimiento para detectar la presencia de partículas de HCV en una muestra que se sospecha que contiene HCV, que comprende:

(a) incubar la muestra con el complejo de unión según la reivindicación 19 ó 20, llevando a cabo la incubación bajo condiciones que permiten la formación de un complejo de anticuerpo-antígeno, y

(b) detectar la presencia o la ausencia del complejo de anticuerpo-antígeno.

22. Procedimiento para realizar el seguimiento del progreso de un tratamiento terapéutico anti-HCV de un sujeto mamífero infectado por HCV, en una muestra biológica procedente de dicho sujeto, que comprende:

(a) incubar la muestra con el complejo de unión según la reivindicación 19 ó 20, llevando a cabo la incubación bajo condiciones que permiten la formación de un complejo de anticuerpo-antígeno, y

(b) detectar la presencia o la ausencia del complejo de anticuerpo-antígeno.

23. Molécula de ácidos nucleicos aislada codificante del anticuerpo recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en la que una primera secuencia de nucleótidos codifica la parte ligante de antígeno E2 de HCV de una región variable de cadena pesada (V_H) $\gamma 1$ humana y una segunda secuencia de nucleótidos codifica la parte ligante de antígeno E2 de HCV de una región variable de cadena ligera (V_L) κ humana.

24. Molécula de ácidos nucleicos aislada, que comprende una primera secuencia de nucleótidos codificante de una parte ligante de una región variable de cadena pesada (V_H) $\gamma 1$ de una molécula Fab humana obtenida de una biblioteca combinatorial, en la que dicha molécula Fab muestra afinidad de unión inmunológica con un antígeno E2 del virus de la hepatitis C (HCV), en la que la primera secuencia de nucleótidos es:

(i) la secuencia contigua ilustrada en cualquiera de las figuras 4A a 4G, o

(ii) una secuencia contigua de nucleótidos con una identidad de secuencia de por lo menos 90% con cualquiera de (i),

en la que la molécula Fab presenta reactividad cruzada con antígenos E2 de los genotipos 1a y 1b de HCV.

25. Molécula de ácidos nucleicos aislada, que comprende una primera secuencia de nucleótidos codificante de una parte ligante de una región variable de cadena ligera (V_L) κ de una molécula Fab humana obtenida de una biblioteca combinatorial, en la que dicha molécula Fab muestra afinidad de unión inmunológica con un antígeno E2 del virus de la hepatitis C (HCV), en la que la primera secuencia de nucleótidos es:

(i) la secuencia contigua de cualquiera de entre aquellas ilustradas en las figuras 3A a 3G, o

(ii) una secuencia contigua de nucleótidos con una identidad de secuencia de por lo menos 90% con cualquiera de (i),

en la que la molécula Fab presenta reactividad cruzada con antígenos E2 de los genotipos 1a y 1b de HCV.

26. Molécula de ácidos nucleicos aislada según la reivindicación 23, en la que la molécula codifica una molécula Fab humana, en la que la secuencia de nucleótidos codificante de la parte ligante del antígeno E2 de HCV de una región variable de cadena pesada (V_H) $\gamma 1$ humana es según se define en la reivindicación 24, y la secuencia de nucleótidos codificante de la parte ligante de antígeno E2 de HCV de una región variable de cadena ligera (V_L) κ humana es según se define en la reivindicación 25.

27. Molécula de ácidos nucleicos según la reivindicación 24 ó 26, en la que la secuencia codificante de V_H se ilustra en la figura 4A.

28. Molécula de ácidos nucleicos según la reivindicación 24 ó 26, en la que la secuencia codificante de V_H se ilustra en la figura 4B.

29. Molécula de ácidos nucleicos según la reivindicación 24 ó 26, en la que la secuencia codificante de V_H se ilustra en la figura 4C.

30. Molécula de ácidos nucleicos según la reivindicación 24 ó 26, en la que la secuencia codificante de V_H se ilustra en la figura 4D.

31. Molécula de ácidos nucleicos según la reivindicación 24 ó 26, en la que la secuencia codificante de V_H se ilustra en la figura 4E.

32. Molécula de ácidos nucleicos según la reivindicación 24 ó 26, en la que la secuencia codificante de V_H se ilustra en la figura 4F.

33. Molécula de ácidos nucleicos según la reivindicación 24 ó 26, en la que la secuencia codificante de V_H se ilustra en la figura 4G.

34. Molécula de ácidos nucleicos según la reivindicación 25 ó 26, en la que la secuencia codificante de V_L se ilustra en la figura 3A.

35. Molécula de ácidos nucleicos según la reivindicación 25 ó 26, en la que la secuencia codificante de V_L se ilustra en la figura 3B.

36. Molécula de ácidos nucleicos según la reivindicación 25 ó 26, en la que la secuencia codificante de V_L se ilustra en la figura 3C.

37. Molécula de ácidos nucleicos según la reivindicación 25 ó 26, en la que la secuencia codificante de V_L se ilustra en la figura 3D.

38. Molécula de ácidos nucleicos según la reivindicación 25 ó 26, en la que la secuencia codificante de V_L se ilustra en la figura 3E.

39. Molécula de ácidos nucleicos según la reivindicación 25 ó 26, en la que la secuencia codificante de V_L se ilustra en la figura 3F.

40. Molécula de ácidos nucleicos según la reivindicación 25 ó 26, en la que la secuencia codificante de V_L se ilustra en la figura 3G.

41. Molécula de ácidos nucleicos según cualquiera de las reivindicaciones 23 y 26 a 40, que además comprende:

una tercera secuencia de nucleótidos codificante de un primer péptido secuencia líder, en la que dicha tercera secuencia de nucleótidos se encuentra operablemente ligada al extremo 5' terminal de la primera secuencia de nucleótidos y es capaz de causar la secreción de la región variable de cadena pesada codificada en el caso de que se expresen la región variable de cadena pesada codificada y el primer péptido de secuencia líder, y

una cuarta secuencia de nucleótidos codificante de un segundo péptido de secuencia líder,

en la que dicha cuarta secuencia de nucleótidos se encuentra operablemente ligada al extremo 5' terminal de la segunda secuencia de nucleótidos y es capaz de causar la secreción de la región variable de cadena ligera codificada en el caso de que se expresen la región variable de cadena ligera y el segundo péptido de secuencia líder.

42. Molécula de ácidos nucleicos según cualquiera de las reivindicaciones 23 a 41, en la que la afinidad de unión inmunológica para el antígeno E2 de HCV es de por lo menos aproximadamente $1,0 \times 10^7$.

43. Vector de expresión, que comprende la molécula de ácidos nucleicos según cualquiera de las reivindicaciones 26 a 42 operablemente ligada a secuencias de control que dirigen la transcripción de la primera y segunda secuencias de nucleótidos, de manera que dichas primera y segunda secuencias de nucleótidos pueden transcribirse y traducirse en una célula huésped.

44. Vector de expresión según la reivindicación 43, en el que las secuencias de control son capaces de dirigir la transcripción de la primera y segunda secuencias de nucleótidos en una célula huésped de mamífero.

45. Vector de expresión según la reivindicación 43, en el que las secuencias de control son capaces de dirigir la transcripción de la primera y segunda secuencias de nucleótidos en una célula huésped de mamífero.

ES 2 320 051 T3

46. Célula huésped procariótica transformada con el vector de expresión según la reivindicación 44.

47. Célula huésped de mamífero transformada con el vector de expresión según la reivindicación 45.

5 48. Procedimiento para producir una molécula recombinante, que comprende:

(a) proporcionar una población de células huésped transformadas según las reivindicaciones 46 ó 47, y

10 (b) expresar dicha molécula Fab recombinante a partir del vector de expresión.

49. Utilización de un anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 en la preparación de una vacuna destinada al tratamiento o prevención de una infección por HCV de un sujeto mamífero.

15 50. Utilización según la reivindicación 49, en la que dicho medicamento está destinado al tratamiento de una infección por HCV, conjuntamente con interferón α o ribavirina.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIGURA 1A (1:5, CADENA PESADA)

EVQLLEQSGA EVKXPGSSVK VSCRASGGTF SGHTITWVRQ ^{CDRI}APGQGLEWMG ^{CDR2}ESTIEGSAFYAONTACKEL DAVSIUADES TSTSFIELSN LRSDDTAVYI ^{CDR3}CARDPPIVCS AGRCYSGEFO QWCGQTIVTV SS

EVQLLEQSGA EVKXPGSSVK VSCQVFGDTF SEHTIQWUHQ ^{CDRI}APGQGFENVIG ^{CDR2}NIIPYDNTDPI YADKEGRLS ITADDSTSTA YNIELSLUSE DTAVYFCARV ^{CDR3}VIPNAIHITM GQYEDYWGQG TLVTVSS

FIGURA 1B (1:7, CADENA PESADA)

FIGURA 1C (1:11, CADENA PESADA)

EVQLLEQSGA EVKPGSSVK VSCKASGGTF SCRDTSWVRQ APCQGLEWVNG CSISEGETSH SAQKEDGRVS ITADESASTA YMEISSLRSE DTATVYCAKD ^{CDR1} ^{CDR2} ^{CDR3} PPRECSGGENC YGGEEDQIVGQ GTLVTVSS

FIGURA 1D (L3, CADENA PESADA)

EVQLLESGG VVQKGSIRL SCAASGFTFK IYGMHWVRQ PKKGLWVWAGLSEGGANDYY ADSVKGKRVV SRONSROTVE LQNISSLRLD TAVY'CATEG ^{CDR1} ^{CDR2} ^{CDR3} SPEGSIRGRY YLEHWGQGT LVTVSS

FIGURA 1E (L1, CADENA PESADA)

EVOLLESGGG VVQPGRLRL SCAASGFTFS AYGMHWVRQA PGKGLEWVAG IWEDGSNQYYSDSVKGRFTV -
 CDR 1 CDR 2
 SRDNSRNTLF LQMNSLRPED TAVYCATEV LEGSIKGRYY LENWGQGTLVTVSS
 CDR 3

FIGURA 1F (A8, CADENA PESADA)

EVOLLESGPG LVKPSGTL SL TCTVSGGSIR SSHWSWVRQ PPGKGLEWIG EVEESGSTIYNPSLNDRVFM -
 CDR 1 CDR 2
 SVDKSKDQVS LRLSSVTAAD TAVYCARSP IKMNDGRMML DAFDIWGQGTLVIVSS
 CDR 3

FIGURA 1G (A12, CADENA PESADA)

EVOLLESGSE VKKPGSSVKV SCRASGGSFR SYNENWVRQA PGQGLEWMGG IIPMEGTANYAQKEQGRVTI -
 CDR 1 CDR 2
 TADESTATGY MELSSLRSED TAVYCAMPY PKHCSRGSSCW GWEDPWGQGTLVTVSS
 CDR 3

FIGURA 2A (1:5, CADENA LIGERA)

CDR1
CDR2
CDR3
 AELTQSPGTL SLSPGERATL SCRASOSYSSNDAWYQQRP GQAPRLIYGLASSRAIGIPD RFGSGSGTD FTLTISRLEP EDFAVYYCOLYGN~~SRWTF~~CGQ GTKVEIK

CDR1
CDR2
CDR3
 AELTQSPATL SLSPGERATL SCRASOSY~~NK~~YLAWYQQKPG QAPRLIYDA~~SNRA~~IGIPAR FSGSGSGTD FTLTISNLEPE DFAVYYCQOL~~SDWVTF~~GGGT KVEIK

FIGURA 2B (1:7, CADENA LIGERA)

FIGURA 2C (1:11, CADENA LIGERA)

CDR1
AELTQSPCTL SLSPGERATL SCGASQSVMS NLAWYQQKP GQAPRLIYG YSSRAIGIPD RFSGSGGTD FTLTISRLEP EDFAVYCCQ YGSSPRTFGQ GTKLEIK
CDR2
CDR3

CDR1
AELTQSPATL SVSPGERASL SCRASQSYGN NLAWYQQKP QAPRLIYG NIRAIGTPDR FSGSGGTEF TLTISSLQSE DFAVYFCQHY SIWPLIFGGG TKVEFK
CDR2
CDR3

FIGURA 2D (L3, CADENA LIGERA)

FIGURA 2E (L1, CADENA LIGERA)

AELTQSPGTL SLSVGERATL SCBASQNIYS ^{CDR 1}GYLGWYQQKP ^{CDR 2}GPPRLIYG ASNBAIGIPD
- RFSGSGSGTD FTLTISRLES EDFAVYCCQ ^{CDR 3}YGSPPYTFGQ GTKVEIK

ES 2 320 051 T3

FIGURA 2F (A8, CADENA LIGERA)

AELTQSPSSL SAFVGDRVTI TCBASQSISR ^{CDR 1}NLNWYQQKPG ^{CDR 2}TAPKVLIAA SSLSGSGVPSR
- FSGSGSGTDF TLTITSLQPE DFATYCCQS ^{CDR 3}YITPRIFGQG TKVEVK

FIGURA 2G (A12, CADENA LIGERA)

AELTQSPGTL SLSVGERATL SCBASQSLS ^{CDR 1}KYLAWYQQKP ^{CDR 2}GQAPRLFIYD ASSBAIGIPD
- RFSGSGSGTD FTLTISRLEP EDFAVYCCQ ^{CDR 3}YGTIPRIFGQG TKVEIK

FIGURA 3A (1:5, CADENA LIGERA)

GAGCTCAGC AGTCTCCAGG CACCCTGTCT TTGTCTCCAG GGGAAAGAGC CACCCTCTCC TGCAGGGCCA
 GTCAGAGTGT TAGCAGCAAT TACTTAGCCT GGTACCAGCA GAGACCTGGC CAGGCTCCCA GGCTCCTCAT
 CTATGGTGCA TCCAGCAGGG CCACTGGCAT CCCAGACAGG TTCAGTGGCA GTGGGTCTGG GACAGACTTC
 ACTCTCACCA TCAGCAGACT GGAGCCTGAA GATTTGCAG TGTATTACTG TCAGCTTTAT GGTAACCTCAC
 GTTGGACGTT CGGCCAAGGG ACCAAGGTGG AGATCAAA

GAGCTCACTC AGTCTCCAGC CACCCTGTCT TTGTCTCCAG GGGAAAGAGC CACCCTCTCC TGCAGGGCCA
 GTCAGAGTGT TAACAAGTAC TTAGCCTGGT ACCAACAGAA ACCTGGCCAG GCTCCAGGC TCCTCATCTA
 TGATGCATCC AACAGGGCCA CTGGCATCCC AGCAGGTTT AGTGGCAGTG GTCTGGGAC AGACTTCACT
 CTCACCATCA GCAACCTAGA GCCTGAAGAT TTTGCAGTTT ATTACTGTCA GCAGCGTAGC GACTGGGTCA
 CTTTCGGCGG AGGGACCAAG GTGGAGATCA AA

FIGURA 3B (1:7, CADENA LIGERA)

FIGURA 3C (1:11, CADENA LIGERA)

GAGCTCACGC AGTCTCCAGG CACCCTGTCT TTGCTCCAG GGAAGAGC CACCCTCTCC TCGGGGGCCA
 GTCAGAGTGT TAGGAGCAAC TACTTAGCCT GGTACCAGCA AAACCTGGC CAGGCTCCCA GGCTCCTCAT
 CTATGGTGTA TCCAGCAGG CCACTGGCAT CCCAGACAGG TTCAGTGGA GTGGTCTGG GACAGACTTC
 ACTCTACCA TCAGCAGACT GGAGCCTGAA GATTTGCAG TGTATTACTG TCAGCAGTAT GGTAGCTCAC
 CTCGGACITT TGGCCAGGG ACCAAGTTGG AGATCAA

GAGCTCACGC AGTCTCCAGC CACCCTGTCT GTGCTCCAG GGAAGAGC CTCCCTCTCC TGCAGGGCCA
 GTCAGAGTGT CGGTACAAT TTAGCTTGGT ATCAGCAGAA ACCTGGCCAG GCTCCAGGC TCCTCATTTA
 TGGTGGAAC ACCAGAGCCA CTGGTACCCC AGACAGGTTT AGTGCCAGTG GGTCTGGGAC AGAATTCACT
 CTCACCAATCA GCAGCCTGCA GTCTGAGGAC TTTCAGTTT ATTCTGTCA AACTATAGT ACCTGGCCGC
 TCACTTTCGG CGGGGGGACC AAGGTCGAGT TCAAG

FIGURA 3D (L3, CADENA LIGERA)

FIGURA 3E (L1, CADENA LIGERA)

GAGGTGCAGC TGCTCGAGTC TGGGGAGGC GTGGTCCAGC CTGGGAGGTC CCTGAGACTC TCCTGTGCAG
CGTCTGGATT CACCTTCAGT GCTTATGGCA TGCACCTGGGT CCGCCAGGCT CCAGBCAAGG GGCTBGAGTG
GGTGGCAGGT ATATGGTTTG ATGGAAGTAA TCAATACTAT TCAGACTCCG TGAAGGGCCG ATCACCCGTC
TCCAGAGACA ATTCAGGAA CACGCTGTTT CTGCAATGA ACAGCCTGAG ACCCGAGGAC ACGGCTGTCT
ATTACTGTGC GACAGAGGTA CTTTCTGGAT CGATTAGGG GCGTTACTAC CTTGAAACT GGGGCCAGGG
AACCTGGTC ACCGTCTCCT CA

FIGURA 3F (A8, CADENA LIGERA)

GCGGAGCTCA CCDAGTCTCC ATCGTCCCTG TCTGCATTG TNGGAGACAG AGTCACCATC ACTTGCCGGG
CAAGTCAGAG TATTAGCAGG AACTTAAAT GGTATCAGCA GAAACCAGGG ACAGCCCTA AGTCTCTGAT
CTATGCTGCA TCCAGTTTGC AAGTGGGT CCATCGAGG TTCAGTGGCA GTGGATCTGG GACAGATTTC
ACTCTACCA TCACCAGTCT GCAACCTGAA GATTTTGCA CTTACTATTG TCAACAGAGT TACACAACC
CTCGGACBT CCGCCAAGGG ACCAAGGTGG AAGTCAAA

FIGURA 3G (A12, CADENA LIGERA)

GCCGAGCTCA CGCAGTCTCC AGGCACCCTG TCTTTGTCTC CAGGGGAAG AGCCACCCTC TCCTGCAGGG
CCAGTCAGAG TCTTAGCAGC AAATACTTAG CNTGGTACCA ACAGAAACCT GGCCAGGCTC CCAGGCTCTT
CATTATGAT GCATCCAGCA GGGCCACTGG CATCCAGAC AGGTTCAAGT GCAGTGGGTG TGGGACAGAC
TTCAGTCTCA GCATCAGCAG ATTGGAGCCT GAAGATTTTG CAGTGTATTA CTGTCAGCAG TATGGAACAC
CTCGCACCTT CCGCCAGGGG ACCAAGGTGG AATCAAA

FIGURA 4A (1:5, CADENA PESADA)

CTCGAGCAGT CTGGGGCTGA GGTGAGGAAG CCTGGGTCCT CGGTGAAGGT CTCCTGCAAG GCTTCTGGAG
GCACCTTCAG CGGCCATGTT ATCACCTGGG TCGACAGGC CCTGGACAA GACTTGAGT GGATGGGAGA
GAGCATCCCT ATCTTTGGTT CCGCAACTA CGCTCAAAC TACGCTGAGA AATTCGGGA CAGAGTCTCG
ATTATCGCG ACGAATCCAC GAGCAGTGG TTCAATTGAGC TGAGCAACCT GAGATCTGAC GACACGGCCG
TCTACTACTG TCGGAGAGAC CCTCCAAGAT ATTGCAGTGC TGGTAGATGC TACCCGGGAT TCTTCCAGCA
GTGGGGCCAG GGCACCCTCG TCACCGTCTC CTCA

CTCGAGCAGT CTGGGGCTGA GGTGAAGAAG CCTGGGTCCT CGGTGAAGGT CTCCTGTCAG GTTTTGGAG
ACACCTTCAG CAGATACACT ATTCAGTGGT TCGACAGGC CCTGGACAA GGGCCTGAGT GGATGGGAAA
TATCATCCCT GTCTATAATA CACCAACTA CGCGAGAAG TTTCAGGGA GACTCTCGAT AACCGCCGAC
GATTCCACGA GCACAGCCTA CATGGAACCTG AGTAGCCTCA GATCTGAGGA CACGGCCGTC TATTCTGTG
CGAGAGTCGT AATACCAAT GCAATCCGC ACACGATGGG ATATTACTTT GACTACTGGG GCCAGGGAAC
CCTGGTCACC GTCTCCTCA

FIGURA 4B (1:7, CADENA PESADA)

FIGURA 4C (1:11, CADENA PESADA)

CTCGAGCAGT CTGGGGCTGA GGTGAAGAAG CCTGGGTCCT CAGTGAAGGT CTCCTGCAAG GCTTCTGGAG
 GCACCTTCAG CGGCCATGTT ATCAGCTGGG TCGACAGGC CCTGGACAA GGCCTTGAGT GGATGGGGGG
 GAGTATCTCT TTCTTTGGCA CATCAACTC CGACAGAAG TTCCAGGGCA'GAGTCTCGAT TACCGCGGAC
 GAATCCGCGA GCACAGCCTA CATGGAGCTG AGTAGCCTGA GATCGGAGGA CACGGCCATC TATTACTGTG
 CGAAGAGCCC TCCAAGATTT TGTAGTGGTG GTAACGTGCTA CCCGGGGTTC TTCCAGCAGT GGGGCCAGGG
 CACCCTGGTC ACCGTCTCCT CA

FIGURA 4D (L3, CADENA PESADA)

CTCGAGTCGG GGGAGGGCGT GGTCCAGCCT GGGAGGTCCC TGAGACTCTC CTGTGCAGCG TCTGGATTCA
 CCTTCAAGAC GTATGGCATG CACTGGGTCC GCCAGGCTCC AGGCAAGGG CTGGAGTGGG TGGCAGGTAT
 TTCGTTTGAT GGAAGTAACC AATATTACGC AGACTCCGTG AAGGGCCGAT TCATCGTCTC CAGAGACAA
 TCCAGGGACA CGGTGTTTCT GCAGATGAGC AGCTGAGAC TCGAGGACAC GGCTGTCTAT TACTGTGCCA
 CAGAGGGTTC TCCTTTGGC TCGATTAAAG GCGTTACTA CCTTGAAAT TGGGGCCAGG GAACCTTGGT
 CACCGTCTCC TCA

FIGURA 4E (L1, CADENA PESADA)

GAGGTGCAGC TGCTCGAGTC TGGGGGAGGC GTGGTCCAGC CTGGGAGGTC CCTGAGACTC TCCTGTGCAG
CGTCTGGATT CACCTTCAGT GCTTATGGCA TGCACCTGGT CCGCCAGGCT CCAGGCAAGG GGCTGGAGTG
GGTGGCAGGT ATATGTTTG ATGAAGTAA TCAATACTAT TCAGACTCCG TGAAGGGCCG ATTACCCGTC
TCCAGAGACA ATCCAGGAA CACGCTGTTT CTGCAATGA ACAGCCTGAG ACCCGAGGAC ACGGCTGTCT
ATTACTGTGC GACAGAGGTA CTTTTTGGAT CGATTAGGG GCGTTACTAC CTTGAAACT GGGGCCAGGG
AACCTGGTC ACCGTCTCCT CA

FIGURA 4F (A8, CADENA PESADA)

GAGGTGCAGC TGCTCGAGTC GGGCCAGGA CTGGTGAAGC CTTCGGGAC CCTGTCCCTC ACCTGCACCTG
TCTCTGGTGG CTCCATCAGG AGCAGTCACT GGTGGAGTTG GGTCCGCCAG CCCCAGGGA AGGACTGGA
GTGGATTGGA GAAGTCTTTT TTAGTGAAG CACCATCTAC AACCATCCC TCAACGATCG AGTCTTCATG
TCTGTAGACA AGTCCAAAGGA CCAGGTCTCC CTGAGGCTGA GCTCTGTGAC CGCCGCGGAC ACGGCCGTGT
ATTACTGTGC GAGATCCCCC ATAAATGA ATCAGGGAAG ATGATGTTG GATGCCTTTG ATATCTGGGG
CCAGGGGACA CTCGTCACTG TCCTCTCC

FIGURA 4G (A12, CADENA PESADA)

GAGGTGCAGC TGCTCGAGTC TGGGTCTGAG GTGAAGAAGC CTGGGTCTTC GGTGAAGGTC TCCTGCAGGG
CCTCTGGAGG CAGCTTCAGA AGCTACAATT TCAATTGGT GCGACAGGCC CCTGGACAAG GTCTTGAGTG
GATGGGAGGC ATCATCCCTA TGTTCCGAAC AGCAAACTAC GCACAGAAGT TTCAGGGCAG AGTCACAATT
ACCGCGGACG AATCCACGGC CACAGGCTAC ATGGAGTTGA GCAGTCTGAG ATCTGAAGAC ACGGCCGTTT
ATTACTGTGC GATGCCCTAT CCAAAACATT GCAGTCGTGG AAGTTGCTGG GGC.TGGTTG ACCCCTGGGG
CCAGGGAAC CTGCTCACCG TGCTCTCA

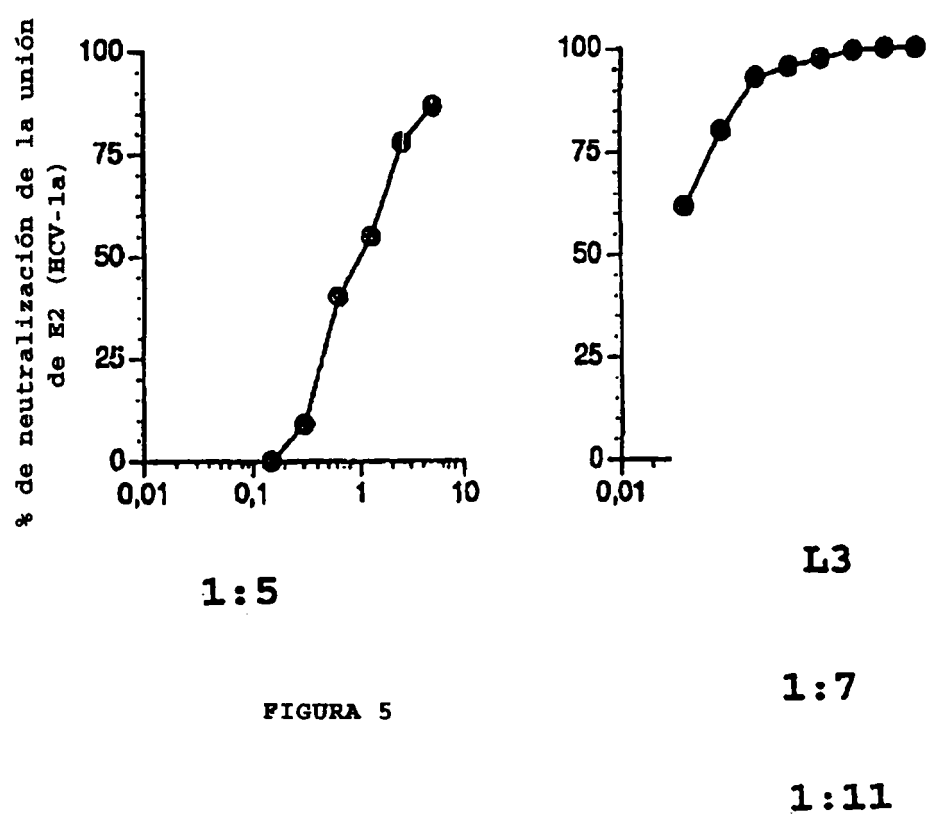


FIGURA 5

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

(i) SOLICITANTE:

- (A) NOMBRE: PERSSON, MATS AXEL y ALLANDER, TOBIAS ERIK
- (B) CALLE: DEPARTMENT OF MEDICINE M3:00, KAROLINSKA HOSPITAL
- (C) CIUDAD: ESTOCOLMO
- (D) PAÍS: ESTOCOLMO
- (E) CÓDIGO POSTAL (ZIP): S-171 76

(ii) TÍTULO DE LA INVENCION: ANTICUERPOS MONOCLONALES HUMANOS ESPECÍFICOS PARA EL ANTÍGENO E2 DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C (HCV)

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 34

(iv) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:

- (A) TIPO DE MEDIO: disquete
- (B) ORDENADOR: IBM PC compatible
- (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) PROGRAMA INFORMÁTICO: PatentIn Release nº 1.0, versión nº 1.30 (EPO)

(v) DATOS ACTUALES DE LA SOLICITUD:

- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: PCT/EP97/01977

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID nº 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

- (A) LONGITUD: 132 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CADENA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID nº 1:

ES 2 320 051 T3

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

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

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

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

Tyr Ala Gln Lys Phe Arg Asp Arg Val Ser Ile Ile Ala Asp Glu Ser
65 70 75 80

Thr Ser Thr Ser Phe Ile Glu Leu Ser Asn Leu Arg Ser Asp Asp Thr
85 90 95

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

Arg Cys Tyr Pro Gly Phe Phe Gln Gln Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
115 120 125

Thr Val Ser Ser
130

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID nº 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 127 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CADENA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID nº 2:

ES 2 320 051 T3

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65
 70
 75
 80
 85
 90
 95
 100
 105
 110
 115
 120
 125

Glu Val Gln Leu Leu Glu Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
 Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Gln Val Phe Gly Asp Thr Phe Ser Arg
 Tyr Thr Ile Gln Trp Leu Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Pro Glu Trp
 Met Gly Asn Ile Ile Pro Val Tyr Asn Thr Pro Asn Tyr Ala Gln Lys
 Phe Gln Gly Arg Leu Ser Ile Thr Ala Asp Asp Ser Thr Ser Thr Ala
 Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe
 Cys Ala Arg Val Val Ile Pro Asn Ala Ile Arg His Thr Met Gly Tyr
 Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID nº 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 128 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CADENA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº 3:

ES 2 320 051 T3

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

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

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

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

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

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

Cys Ala Lys Asp Pro Pro Arg Phe Cys Ser Gly Gly Asn Cys Tyr Pro
100 105 110

Gly Phe Phe Gln Gln Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID nº 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 125 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº 4:

ES 2 320 051 T3

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg
1				5				10					15		
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Lys	Thr	Tyr
			20					25					30		
Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ala	Gly	Ile	Ser	Phe	Asp	Gly	Ser	Asn	Gln	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50					55				60					
Lys	Gly	Arg	Phe	Ile	Val	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Arg	Asp	Thr	Val	Phe
65					70					75					80
Leu	Gln	Met	Ser	Ser	Leu	Arg	Leu	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85					90					95		
Ala	Thr	Glu	Gly	Ser	Pro	Phe	Gly	Ser	Ile	Lys	Gly	Arg	Tyr	Tyr	Leu
		100					105						110		
Glu	Asn	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser			
		115					120					125			

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID nº 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 124 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº 5

ES 2 320 051 T3

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

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID nº 6:

- 40 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 126 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 45 (C) CADENA: única
 (D) TOPOLOGÍA: lineal
 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
 50 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº 6:

55

60

65

ES 2 320 051 T3

5 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gly
 1 5 10 15
 10 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Arg Ser Ser
 20 25 30
 15 His Trp Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 20 Ile Gly Glu Val Phe Phe Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60
 25 Asn Asp Arg Val Phe Met Ser Val Asp Lys Ser Lys Asp Gln Val Ser
 65 70 75 80
 30 Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 35 Ala Arg Ser Pro Ile Lys Met Asn Gln Gly Arg Met Met Leu Asp Ala
 100 105 110
 40 Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Ile Val Ser Ser
 115 120 125

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID nº 7:

- 40 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 126 aminoácidos
 - (B) TIPO: aminoácido
 - 45 (C) CADENA: única
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
 - (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
 - 50 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº 7:

55

60

65

ES 2 320 051 T3

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

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

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

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

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

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

Ala Met Pro Tyr Pro Lys His Cys Ser Arg Gly Ser Cys Trp Gly Trp
100 105 110

Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID nº 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 107 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº 8:

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

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

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

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

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

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

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

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID nº 9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 105 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº 9:

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

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

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

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

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

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asp Trp Val Thr Phe
85 90 95

Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

ES 2 320 051 T3

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID nº 10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 107 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº 10:

```

15      Ala Glu Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu
16      1          5          10          15
20      Arg Ala Thr Leu Ser Cys Gly Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Asn Tyr
21          20          25          30
25      Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
26          35          40          45
30      Tyr Gly Val Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly
31          50          55          60
35      Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro
36          65          70          75          80
40      Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Arg
41          85          90          95
45      Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
46          100          105

```

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID nº 11:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 106 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº 11:

ES 2 320 051 T3

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

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

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

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

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

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

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

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID nº 12:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 107 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº 12:

ES 2 320 051 T3

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

Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Ser Gly Tyr
 20 25 30

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

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

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

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

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

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID nº 13:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 106 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº 13:

ES 2 320 051 T3

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

Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Arg Asn Leu
20 25 30

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

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

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Arg Thr
85 90 95

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

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID nº 14:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 106 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº 14:

ES 2 320 051 T3

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

Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Leu Ser Ser Lys Tyr
20 25 30

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

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

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

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

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

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID nº 15:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 318 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº 15:

GAGCTCACGC AGTCTCCAGG CACCCTGTCT TTGTCTCCAG GGGAAAGAGC CACCCTCTCC 60

TGCAGGGCCA GTCAGAGTGT TAGCAGCAAT TACTTAGCCT GGTACCAGCA GAGACCTGGC 120

CAGGCTCCCA GGCTCCTCAT CTATGGTGCA TCCAGCAGGG CCACTGGCAT CCCAGACAGG 180

TTCAGTGGCA GTGGGTCTGG GACAGACTTC ACTCTACCA TCAGCAGACT GGAGCCTGAA 240

GATTTTGCAG TGTATTACTG TCAGCTTTAT GGTAACAC GTTGGACGTT CGGCCAAGGG 300

ACCAAGGTGG AGATCAAA 318

ES 2 320 051 T3

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID nº 16:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 312 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº 16:

15	GAGCTCACTC AGTCTCCAGC CACCCTGTCT TTGTCTCCAG GGGAAAGAGC CACCCTCTCC	60
	TGCAGGGCCA GTCAGAGTGT TAACAAGTAC TTAGCCTGGT ACCAACAGAA ACCTGGCCAG	120
20	GCTCCCAGGC TCCTCATCTA TGATGCATCC AACAGGGCCA CTGGCATCCC AGCCAGGTTC	180
	AGTGGCAGTG GGTCTGGGAC AGACTTCACT CTCACCATCA GCAACCTAGA GCCTGAAGAT	240
25		
	TTTGCAGTTT ATTACTGTCA GCAGCGTAGC GACTGGGTCA CTTTCGGCGG AGGGACCAAG	300
30	GTGGAGATCA AA	312

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID nº 17:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 318 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº 17:

50	GAGCTCACGC AGTCTCCAGG CACCCTGTCT TTGTCTCCAG GGGAAAGAGC CACCCTCTCC	60
	TGCGGGGCCA GTCAGAGTGT TAGGAGCAAC TACTTAGCCT GGTACCAGCA AAAACCTGGC	120
55	CAGGCTCCCA GGCTCCTCAT CTATGGTGTA TCCAGCAGGG CCACTGGCAT CCCAGACAGG	180
	TTCAGTGGCA GTGGGTCTGG GACAGACTTC ACTCTACCA TCAGCAGACT GGAGCCTGAA	240
60	GATTTTGCAG TGTATTACTG TCAGCAGTAT GGTAGCTCAC CTCGGACTTT TGGCCAGGGG	300
	ACCAAGTTGG AGATCAAA	318

ES 2 320 051 T3

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID nº 18:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 315 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº 18:

15	GAGCTCACGC AGTCTCCAGC CACCCTGTCT GTGTCTCCAG GGGAAAGAGC CTCCTCTCC	60
20	TGCAGGGCCA GTCAGAGTGT CGGTAACAAT TTAGCTTGGT ATCAGCAGAA ACCTGGCCAG	120
	GCTCCCAGGC TCCTCATTTA TGGTGGAAC ACCAGAGCCA CTGGTACCCC AGACAGGTTT	180
25	AGTGGCAGTG GGTCTGGGAC AGAATTCCT CTCACCATCA GCAGCCTGCA GTCTGAGGAC	240
	TTTGCAGTTT ATTTCTGTCA AACTATAGT ACCTGGCCGC TACTTTTCGG CGGGGGGACC	300
30	AAGGTCGAGT TCAAG	315

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID nº 19:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 372 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº 19:

50	GAGGTGCAGC TGCTCGAGTC TGGGGGAGGC GTGGTCCAGC CTGGGAGGTC CCTGAGACTC	60
	TCCTGTGCAG CGTCTGGATT CACCTTCAGT GCTTATGGCA TGCACTGGGT CCGCCAGGCT	120
55	CCAGGCAAGG GGCTGGAGTG GGTGGCAGGT ATATGGTTTG ATGGAAGTAA TCAATACTAT	180
	TCAGACTCCG TGAAGGGCCG ATTCACCGTC TCCAGAGACA ATTCCAGGAA CACGCTGTTT	240
60	CTGCAAATGA ACAGCCTGAG ACCCGAGGAC ACGGCTGTCT ATTACTGTGC GACAGAGGTA	300
	CTTTTTGGAT CGATTAAGGG GCGTTACTAC CTTGAAAAC TGGGCCAGGG AACCTGGTC	360
65	ACCGTCTCCT CA	372

ES 2 320 051 T3

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID nº 20:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 318 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº 20:

```

GCGGAGCTCA CCCAGTCTCC ATCGTCCCTG TCTGCATTG TNGGAGACAG AGTCACCATC      60
ACTTGCCGGG CAAGTCAGAG TATTAGCAGG AACTTAAATT GGTATCAGCA GAAACCAGGG      120
ACAGCCCCTA AGGTCCTGAT CTATGCTGCA TCCAGTTTGC AAAGTGGGGT CCCATCGAGG      180
TTCAGTGGCA GTGGATCTGG GACAGATTTC ACTCTACCA TCACCAGTCT GCAACCTGAA      240
GATTTTGCAA CTTACTATTG TCAACAGAGT TACACAACCC CTCGGACGTT CGGCCAAGGG      300
ACCAAGGTGG AAGTCAAA                                     318

```

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID nº 21:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 318 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº 21:

```

GCCGAGCTCA CGCAGTCTCC AGGCACCCTG TCTTTGTCTC CAGGGGAAAG AGCCACCCTC      60
TCCTGCAGGG CCAGTCAGAG TCTTAGCAGC AAATACTTAG CNTGGTACCA ACAGAAACCT      120
GGCCAGGCTC CCAGGCTCTT CATTTATGAT GCATCCAGCA GGGCCACTGG CATCCCAGAC      180
AGGTTTCAGTG GCAGTGGGTC TGGGACAGAC TTCACTCTCA GCATCAGCAG ATTGGAGCCT      240
GAAGATTTTG CAGTGTATTA CTGTCAGCAG TATGGAACAC CTCGCACCTT CGGCCAGGGG      300
ACCAAGGTGG AAATCAAA                                     318

```

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID nº 22:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 384 pares de bases

ES 2 320 051 T3

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº 22:

10	CTCGAGCAGT CTGGGGCTGA GGTGAGGAAG CCTGGGTCCT CGGTGAAGGT CTCCTGCAAG	60
	GCTTCTGGAG GCACCTTCAG CGGCCATGTT ATCACCTGGG TGCACAGGC CCCTGGACAA	120
15	GGACTTGAGT GGATGGGAGA GAGCATCCCT ATCTTTGGTT CCGCAAATA CGCTCAAAAC	180
	TACGCTCAGA AATTCCGGGA CAGAGTCTCG ATTATCGCGG ACGAATCCAC GAGCACGTCG	240
20	TTCATTGAGC TGAGCAACCT GAGATCTGAC GACACGGCCG TCTACTACTG TGCAGAGAC	300
	CCTCCAAGAT ATTGCAGTGC TGGTAGATGC TACCCGGGAT TCTTCCAGCA GTGGGGCCAG	360
25	GGCACCCCTCG TCACCGTCTC CTCA	384

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID nº 23:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 369 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº 23:

45	CTCGAGCAGT CTGGGGCTGA GGTGAAGAAG CCTGGGTCCT CGGTGAAGGT CTCCTGTCAG	60
	GTTTTTGGAG ACACCTTCAG CAGATACACT ATTCAGTGGT TGCACAGGC CCCTGGACAA	120
50	GGGCCTGAGT GGATGGGAAA TATCATCCCT GTCTATAATA CACCAAATA CGCGCAGAAG	180
	TTTCAGGGCA GACTCTCGAT AACCGCCGAC GATTCCACGA GCACAGCCTA CATGGAAGT	240
55	AGTAGCCTCA GATCTGAGGA CACGGCCGTC TATTTCTGTG CGAGAGTCGT AATACCAAAT	300
	GCAATCCGGC ACACGATGGG ATATTACTTT GACTACTGGG GCCAGGGAAC CCTGGTCACC	360
60	GTCTCCTCA	369

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID nº 24:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 372 pares de bases

ES 2 320 051 T3

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

5

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº 24:

10

CTCGAGCAGT CTGGGGCTGA GGTGAAGAAG CCTGGGTCCT CAGTGAAGGT CTCCTGCAAG 60

GCTTCTGGAG GCACCTTCAG CGGCCATGTT ATCAGCTGGG TGCACAGGC CCCTGGACAA 120

15

GGGCTTGAGT GGATGGGGGG GAGTATCTCT TTCTTTGGCA CATCAAATC CGCACAGAAG 180

TTCCAGGGCA GAGTCTCGAT TACCGCGGAC GAATCCGCGA GCACAGCCTA CATGGAGCTG 240

20

AGTAGCCTGA GATCGGAGGA CACGGCCATC TATTACTGTG CGAAAGACCC TCCAAGATTT 300

TGTAGTGGTG GTAACGCTA CCCGGGGTTC TTCCAGCAGT GGGGCCAGGG CACCCTGGTC 360

25

ACCGTCTCCT CA 372

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID nº 25:

30

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 363 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

35

(C) CADENA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

40

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº 25:

CTCGAGTCGG GGGGAGGCGT GGTCCAGCCT GGGAGGTCCC TGAGACTCTC CTGTGCAGCG 60

45

TCTGGATTCA CCTTCAAGAC GTATGGCATG CACTGGGTCC GCCAGGCTCC AGGCAAGGGG 120

CTGGAGTGGG TGGCAGGTAT TTCGTTTGAT GGAAGTAACC AATATTACGC AGACTCCGTG 180

50

AAGGGCCGAT TCATCGTCTC CAGAGACAAT TCCAGGGACA CGGTGTTTCT GCAGATGAGC 240

AGCCTGAGAC TCGAGGACAC GGCTGTCTAT TACTGTGCGA CAGAGGGTTC TCCTTTTGGC 300

55

TCGATTAAGG GGCCTTACTA CCTTGAAAAT TGGGGCCAGG GAACCCTGGT CACCGTCTCC 360

TCA 363

60

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID nº 26:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

65

(A) LONGITUD: 378 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

ES 2 320 051 T3

(C) CADENA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº 26:

10	GAGGTGCAGC TGCTCGAGTC GGGCCCAGGA CTGGTGAAGC CTCGGGGAC CCTGTCCCTC	60
	ACCTGCACTG TCTCTGGTGG CTCCATCAGG AGCAGTCACT GGTGGAGTTG GGTCCGCCAG	120
15	CCCCAGGGA AGGGACTGGA GTGGATTGGA GAAGTCTTTT TTAGTGGAAG CACCATCTAC	180
	AACCCATCCC TCAACGATCG AGTCTTCATG TCTGTAGACA AGTCCAAGGA CCAGGTCTCC	240
20	CTGAGGCTGA GCTCTGTGAC CGCCGCGGAC ACGGCCGTGT ATTACTGTGC GAGATCCCCC	300
	ATAAAAATGA ATCAGGGAAG AATGATGTTG GATGCCTTTG ATATCTGGGG CCAGGGGACA	360
25	CTCGTCATCG TCTCTTCC	378

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID nº 27:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 378 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº 27:

45	GAGGTGCAGC TGCTCGAGTC TGGGTCTGAG GTGAAGAAGC CTGGGTCTTC GGTGAAGGTC	60
	TCCTGCAGGG CCTCTGGAGG CAGCTTCAGA AGCTACAATT TCAATTGGGT GCGACAGGCC	120
50	CCTGGACAAG GTCTTGAGTG GATGGGAGGC ATCATCCCTA TGTTCGGAAC AGCAAACTAC	180
	GCACAGAAGT TTCAGGGCAG AGTCACAATT ACCGCGGACG AATCCACGGC CACAGGCTAC	240
55	ATGGAGTTGA GCAGTCTGAG ATCTGAAGAC ACGGCCGTTT ATTACTGTGC GATGCCCTAT	300
	CCAAAACATT GCAGTCGTGG AAGTTGCTGG GGCTGGTTCG ACCCCTGGGG CCAGGGAACT	360
60	CTGGTCACCG TGTCTTCA	378

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID nº 28:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 47 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

ES 2 320 051 T3

(C) CADENA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº 28:

Val Ala Gly Val Asp Ala Ser Thr Tyr Thr Thr Gly Gly Gln Ser Gly
1 5 10 15

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

Lys Leu Ser Leu Ile Asn Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Arg
35 40 45

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID nº 29:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 22 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº 29:

CAACGCAATT AATGTGAGTT AG

22

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID nº 30:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº 30:

GCCCCCTTAT TAGCGTTTGC CATC

24

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID nº 31:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 21 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

ES 2 320 051 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº 31:

ATAGAAGTTG TTCAGCAGGC A

21

5

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID nº 32:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

10

(A) LONGITUD: 22 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

15

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº 32:

20

AAGACAGCTA TCGCGATTGC AG

22

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID nº 33:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

25

(A) LONGITUD: 21 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: única

30

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº 33:

35

GTCGTTGACC AGGCAGCCCA G

21

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID nº 34:

40

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 21 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

45

(C) CADENA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

50

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº 34:

ACCTATTGCC TACGGCAGCC G

21

55

60

65