



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 341 341**

(51) Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/79 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **04765363 .9**

(96) Fecha de presentación : **17.09.2004**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1664122**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **07.06.2006**

(54)

Título: **Anticuerpos terapéuticos humanizados contra las isoformas CD45.**

(30)

Prioridad: **18.09.2003 US 666332**
25.06.2004 GB 0414309

(45)

Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.06.2010

(45)

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.06.2010

(73)

Titular/es: **Novartis AG.**
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH

(72)

Inventor/es: **Kolbinger, Frank;**
Carballido Herrera, José, M.;
Aszodi, András;
Saldanha, José W.;
Hall, Bruce, M.;
Gregori, Silvia;
Roncarolo, Maria Grazia;
Loux, Véronique;
Aversa, Gregorio y
Jeschke, Margit

(74)

Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 341 341 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos terapéuticos humanizados contra las isoformas CD45.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se relaciona con compuestos orgánicos, tal como moléculas de unión contra las isoformas del antígeno CD45, tal como por ejemplo los anticuerpos monoclonales (mAb) y el uso de los mismos.

10 **Antecedentes de la invención**

Un método en el tratamiento de una variedad de enfermedades es lograr la eliminación o la inactivación de leucocitos patógenos y el potencial para la inducción de la tolerancia para inactivar respuestas inmunes patológicas.

15 El rechazo del trasplante de órgano, célula y tejido y las varias enfermedades autoinmunes se consideran que son principalmente el resultado de la respuesta inmune mediada por célula T activada por las células T auxiliares que son capaces de reconocer antígenos específicos que son capturados, procesados y presentados a las células T auxiliares por el antígeno que presenta la célula (APC) tal como los macrófagos y las células dendríticas, en la forma de un complejo antígeno-MHC, es decir la célula T auxiliar cuando reconoce antígenos específicos se estimula para producir citocinas tales como IL-2 y expresar o regular de forma ascendente algunos receptores de citocina y otras moléculas de activación y proliferar. Algunas de estas células T activadas pueden actuar directa o indirectamente, es decir ayudar a las células T o las células B citotóxicas efectoras, para destruir las células o tejidos que expresan el antígeno seleccionado. Después de la terminación de la respuesta inmune algunas de las células maduras clónicamente seleccionadas permanecen como auxiliares de memoria y células C citotóxicas de memoria, que circulan en el cuerpo y reconocen rápidamente el antígeno si aparece de nuevo. Si el antígeno que activa esta respuesta es un antígeno ambiental inocuo, el resultado es alergia, si el antígeno no es un xenoantígeno, sino que es un autoantígeno, esto puede resultar en una enfermedad autoinmune; si el antígeno es un antígeno de un órgano trasplantado, el resultado puede ser un rechazo de injerto.

30 El sistema inmune se ha desarrollado para autoreconocerse de no autoreconocerse. Esta propiedad le posibilita a otro organismo sobrevivir en un ambiente expuesto a la exposición diaria a los patógenos. Esta especificidad por no autoreconocerse y la tolerancia hacia autoreconocerse se origina durante el desarrollo del repertorio de la célula T en el timo a través de los procesos de selección positiva y negativa, que también comprenden el reconocimiento y la eliminación de las células T autorreactivas. Este tipo de tolerancia se refiere a una tolerancia central. Sin embargo algunas de estas células autorreactivas escapan a este mecanismo selectivo y poseen un riesgo potencial para el desarrollo de enfermedades autoinmunes. Para controlar las células T autorreactivas que han escapado a la periferia, el sistema inmune tiene mecanismos reguladores periféricos que suministran protección contra la autoinmunidad. Estos mecanismos son la base para la tolerancia periférica.

40 Los antígenos de superficie celular reconocidos por los mAb específicos se designan generalmente mediante un número CD (grupo de diferenciación) asignado mediante taller Internacional de Tipificación de Leucocitos y el término CD45 aplicado aquí se refiere a un antígeno común de leucocito de superficie celular CD45; y un mAb para ese antígeno se designa como "anti-CD45".

45 Los anticuerpos contra el antígeno común de leucocito (LCA) o CD45 son un componente principal de la globulina antilinfocito (ALG). El CD45 pertenece a la familia de las fosfatasa tirosina de transmembrana y son tanto un regulador positivo como negativo de la activación celular, dependiendo de la interacción del receptor. La actividad de fosfatasa del CD45 parece requerirse para la activación de las cinasas de la familia Src asociadas con el receptor antígeno de los linfocitos B y T (Trowbridge IS *et al*, Annu Rev Immunol. 1994; 12: 85-116). Así, en la activación de la célula T el CD45 es esencial para la señal 1 y las células deficientes en CD45 tienen profundos defectos en los eventos de activación mediados por TCR.

50 El antígeno CD45 existe en diferentes isoformas que comprenden una familia de glucoproteínas de transmembrana. Distintas isoformas del CD45 difieren en su estructura del dominio extracelular que surge de un empalme alternativo de 3 exones variables que codifican para parte de la región extracelular CD45 (Streuli MF. *et al*, J. Exp. Med. 1987; 166: 1548-1566). Las varias isoformas del CD45 tienen diferentes dominios extracelulares, pero tienen los mismos segmentos citoplasmáticos y de transmembrana que tienen 2 dominios de fosfatasa altamente conservados homólogos de aproximadamente 300 residuos. Diferentes combinaciones de isoforma se expresan de manera diferente sobre las subpoblaciones de linfocitos T y B (Thomas ML. *et al*, Immunol. Today 1988; 9: 320-325). Algunos anticuerpos monoclonales reconocen un epítipo común a todas las diferentes isoformas, aunque otros mAb tienen una especificidad restringida (CD45R), dependiendo de cuál de los exones empalmados alternativamente (A, B o C) reconocen ellos. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que reconocen el producto del exón A son consecuentemente designados CD45RA, aquellos que reconocen las varias isoformas que contienen el exón B se han designado CD45RB (Beverley PCL *et al*, Immunol. Supp. 1988; I: 3-5). Los anticuerpos tales como el UCHL1 se unen selectivamente a la isoforma CD45RO de 180 kDa (sin ninguno de los exones variables A, B o C) que parecen estar restringidos a un subconjunto de células T activadas, células de memoria y timocitos corticales y no se detectan sobre las células B (Terry LA *et al*, Immunol. 1988; 64: 331-336).

La WO 2002/072832 describe anticuerpos monoclonales (mAb), que son específicos para un epítipo tanto el CD45RB como el CD45RO para uso terapéutico contra enfermedades autoinmunes y rechazos de injertos.

El dominio pesado de variable del anticuerpo humano puede ser n-glucosilado (Dunn-Walters D. *et al*, Molecular Immunology 2000; 37: 107-113). La hipermutación somática introduce predominantemente la sustitución de nucleótido único en los genes de región variable con el fin de incrementar la variabilidad de la inmunoglobulina.

La N-glucosilación en la región variable se conoce por afectar la unión de antígeno. Sin embargo se conocen los anticuerpos monoclonales aglucosilados, que, aunque preservan su función biológica, al perder cada glucosilación sus efectos colaterales adversos (Friends P. *et al*, Transplantation 1999, 68; 1632-1687).

Descripción de las figuras

La Figura 1 muestra que la inhibición del MLR primario por el “candidato mAb” es dependiente de dosis en el rango de 0.001 y 10 µg/ml. “Concentración” es la concentración del “candidato mAb”.

Las Figuras muestran el mapa de plásmido del vector de expresión HCMV-G1 HuA6-VHQ que comprende la cadena pesada que tiene la secuencia de nucleótido SEQ ID NO: 12 (3921-4274)- en la secuencia de nucleótido del vector de expresión completa SEQ ID NO: 15.

La Figura 3 muestra el mapa del plásmido del vector de expresión HCMV-G1 HuA6-VHE- que comprende la cadena pesada que tiene la secuencia de nucleótido SEQ ID NO: 11 (3921-4274) en la secuencia de nucleótido del vector de expresión completa SEQ ID NO: 16.

La Figura 4 muestra el mapa del plásmido del vector de expresión HCMV-K HuAb-VL1 humV1 que comprende la cadena liviana que tiene la secuencia de nucleótido SEQ ID NO: 14 (3964-4284) en la secuencia de nucleótido del vector de expresión completa SEQ ID NO: 17.

La Figura 5 muestra el mapa del plásmido del vector de expresión HCMV-K HuAb-VL1 humV2 que comprende la cadena liviana que tiene la secuencia de nucleótido SEQ ID NO: 13 (3926-4246) en la secuencia de nucleótido del vector de expresión completa SEQ ID NO: 18.

La Figura 6 muestra el mapa del plásmido del vector de expresión LCVL1S_p20 que comprende la cadena liviana que tiene la secuencia de nucleótido SEQ ID NO: 33 en la secuencia de nucleótido del vector de expresión completa SEQ ID NO: 36.

La Figura 7 muestra el mapa del plásmido del vector de expresión LCVL2S_p20 que comprende la cadena liviana que tiene la secuencia de nucleótido SEQ ID NO: 13 en la secuencia de nucleótido del vector de expresión completa SEQ ID NO: 39.

La Figura 8 muestra el mapa del plásmido del vector de expresión HCVHEN73D Sp20 que comprende la cadena pesada que tiene la secuencia de nucleótido SEQ ID NO: 34 en la secuencia de nucleótido del vector de expresión completa SEQ ID NO: 37.

La Figura 9 muestra el mapa del plásmido del vector de expresión HCVHQN73D Sp20 que comprende la cadena pesada que tiene la secuencia de nucleótido SEQ ID NO: 35 en la secuencia de nucleótido del vector de expresión completa SEQ ID NO: 38.

La Figura 10 muestra el mapa del plásmido del vector de expresión HCVHESp20 que comprende la cadena pesada que tiene la secuencia de nucleótido SEQ ID NO: 11 en la secuencia de nucleótido del vector de expresión completa SEQ ID NO: 40.

La Figura 11 muestra el mapa del plásmido del vector de expresión HCVHQSp20 que comprende la cadena pesada que tiene la secuencia de nucleótido SEQ ID NO: 12 en la secuencia de nucleótido del vector de expresión completa SEQ ID NO: 41.

La Figura 12 muestra el análisis de Cromatografía de Exclusión de Tamaño de VHE/humV1, VHE/humV2, VHQ/humV1 y VHQ/humV2, y del VHE/humV1 junto con VHE-N73D/humV1.

La Figura 13 muestra la Cromatografía de Intercambio de Catión del VHE/humV2, VHE/humV1, VHQ/humV2, VHQ/humV1 y del VHE/humV2 junto con el VHE-N73D/humV1.

La Figura 14 muestra la Cromatografía de Fase Inversa del VHE/humV2 y VHE-N73D/humV1.

Descripción de la invención

Hemos encontrado un anticuerpo humanizado que tiene especificidad de unión tanto por el CD45RO como por CD45 RB que comprende una región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 31 o 32 y una región variable de cadena liviana de la SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8.

En otro aspecto el anticuerpo humanizado que tiene la especificidad de unión tanto por el CD45RO o por el CD45RB comprende:

- una región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 31 y una región variable de cadena liviana de la SEQ ID NO: 7.
- una región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 31 y una región variable cadena liviana de la SEQ ID NO: 8.
- una región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 32 y una región variable de cadena liviana de la SEQ ID NO: 7.
- una región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 32 y una región variable de cadena liviana de la SEQ ID NO: 8.

El anticuerpo humanizado CD45RB/RO también puede suprimir el proceso inflamatorio que media el rechazo de piel de aloinjerto humano. Además encuentra que el anticuerpo humanizado CD45RO/RB puede suprimir el proceso inflamatorio que media el rechazo de la piel de aloinjerto humano, en particular, puede suprimir el proceso inflamatorio que media el rechazo de piel de aloinjerto humano *in vivo* en ratones SCID trasplantados con piel humana e injertados con esplenocitos mononucleares. Y adicionalmente, se encontró que el anticuerpo humanizado CD45RB/RO puede conducir a la supervivencia del aloinjerto islote humano prolongado al evitar la infiltración del injerto y al inhibir la reacción de rechazo mediada por leucocito *in vivo*.

Los anticuerpos humanizados CD45RO/RB de acuerdo con la invención son capaces de unirse específicamente a las isoformas CD45RB y CD45RO del antígeno CD45 solo o asociado con otras moléculas. La reacción de unión se puede mostrar mediante métodos estándar (ensayo cualitativo) que incluyen por ejemplo cualquier clase de ensayo de unión tal como la inmunofluorescencia directa o indirecta junto con microscopio de fluorescencia o el análisis citofluorimétrico (FACS), el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) o el radioinmunoensayo en el cual la unión de la molécula a las células que expresan una isoforma CD45 particular se pueden visualizar. Además, la unión de esta molécula puede dar como resultado la alteración de la función de las células que expresan estas isoformas. Por ejemplo la inhibición de la respuesta del linfocito mezclado primario o secundario (MLR) se puede determinar, tal como en un ensayo *in vitro* o un bioensayo para determinar la inhibición del MLR primario o secundario en presencia o en ausencia de la molécula de unión CD45RO/RB y determinar las diferencias en la inhibición MLR primaria.

Alternativamente, los efectos moduladores funcionales *in vitro* se pueden determinar al medir la proliferación del PBMC o las células T o las células TCD4⁺, la producción de citocinas, el cambio en la expresión de las moléculas de la superficie celular por ejemplo luego de la activación de la célula en MLR, o luego de la estimulación con un antígeno específico tal como el toxoide del tétano u otros antígenos, o con estimuladores policlonales tales como la fitohemaglutinina (PHA) o los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 o los ésteres de forbol o los ionóforos Ca²⁺. Los cultivos se configuran de manera similar a como se describió para el MLR excepto que en lugar de células alogénicas como estimuladores se utiliza antígeno soluble o estimuladores policlonales, tales como aquellos mencionados anteriormente. La proliferación de células T se mide preferiblemente como se describió anteriormente mediante la incorporación de ³H-timidina.

La producción de citocina se midió preferiblemente mediante ELISA (captura) donde el anticuerpo de captura de citocina recubre la superficie de una placa de 96 pozos, los sobrenadantes de los cultivos se agregan y se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente y se agrega un anticuerpo de detección específico para la citocina particular, luego un anticuerpo de segunda etapa conjugado a una enzima tal como la peroxidasa de rábano seguido por el sustrato correspondiente y se mide la absorbancia en un lector de placa. El cambio en las moléculas de la superficie celular se mide preferiblemente mediante inmunofluorescencia directa o indirecta después de teñir las células objetivo con anticuerpos específicos para una molécula particular de superficie de célula. El anticuerpo se puede marcar directamente con fluorocromo o se puede utilizar un anticuerpo de segunda etapa fluorescentemente marcado específico para el primer anticuerpo, y las células se analizan con un citofluorímetro.

El anticuerpo humanizado de la invención tiene una especificidad de unión tanto para el CD45RO como para el CD45RB ("molécula de unión CD45RB/RO").

Preferiblemente el anticuerpo humanizado se une a la isoforma CD45RO con una constante de disociación (Kd) <20 nM, preferiblemente con un Kd <15 nM o <10 nM, más preferiblemente con un Kd <5 nM. Preferiblemente el anticuerpo humanizado se une a las isoformas CD45RB con un Kd <50 nM, preferiblemente con un Kd <15 nM o <10 nM, más preferiblemente con un Kd <5 nM.

ES 2 341 341 T3

En una realización preferida adicional el anticuerpo humanizado de la invención se une a aquellas isoformas CD45 las cuales

- 1) incluyen los epítomos A y B pero no el epítomo C de la molécula CD45; y/o
- 2) incluye el epítomo B pero no el epítomo A ni el epítomo C de la molécula CD45; y/o
- 3) no incluye ninguno de los epítomos A, B o C de la molécula CD45.

En aún una realización preferida adicional la molécula de unión de la invención no se une a las isoformas CD45 que incluyen

- 1) todos los epítomos A, B y C de la molécula CD45; y/o
- 2) tanto los epítomos B como C pero no el epítomo A de la molécula CD45.

En realizaciones preferidas adicionales la molécula de la invención además

- 1) reconoce la memoria en células T aloactivadas *in vivo*; y/o
- 2) se une a su objetivo sobre células T humanas tales como por ejemplo las células PEER; en donde dicha unión preferiblemente es con Kd <15 nM, más preferiblemente con un Kd <10 nM, más preferiblemente con un Kd <5 nM; y/o
- 3) inhibe la función de la célula T alorreactiva *in vitro*, preferiblemente con un IC₅₀ aproximadamente menos de 100 nM, preferiblemente menos de 50 nM o 30 nM más preferiblemente con un IC₅₀ de aproximadamente 10 o 5 nM, más preferiblemente con un IC₅₀ de aproximadamente 0.5 nM o aún 0.1 nM; y/o
- 4) induce la muerte celular a través de apoptosis en linfocitos T humanos; y/o
- 5) induce la tolerancia de la célula T específica de aloantígeno *in vitro*; y/o
- 6) evita la enfermedad del injerto contra el anfitrión xenogénica letal (GvHD) inducida en ratones SCID mediante inyección del PBMC humano cuando se administra en una cantidad efectiva; y/o
- 7) se une a los linfocitos, monocitos, citoblastos, linfocitos citolíticos naturales y/o granulocitos, pero no a las plaquetas o linfocitos B; y/o
- 8) soportan la diferenciación de células T con un fenotipo de la célula reguladora T característica (Treg); y/o
- 9) induce a las células reguladoras T capaces de suprimir la activación de la célula T indiferenciada; y/o
- 10) suprimir el proceso inflamatorio que media el rechazo de piel de aloinjerto humano, en particular, suprimir el proceso inflamatorio que media el rechazo de piel de aloinjerto, *in vivo* en ratones SCID trasplantados con piel humana e injertados con esplenocitos mononucleares; y/o
- 11) prolonga la supervivencia de aloinjerto de islote humano en un modelo de ratón hu-PBL-NOD/SCID.

En una realización adicional preferida del anticuerpo humanizado de la invención se une al mismo epítomo que el anticuerpo monoclonal "A6" como se describió por Aversa *et al.*, Cellular Immunology 158, 314-328 (1994).

Debido a las propiedades de unión y a las actividades biológicas anteriormente descritas, tal anticuerpo humanizado de la invención es particularmente útil en medicina, para terapia y/o profilaxis. Las enfermedades en la cual el anticuerpo humanizado de la invención es particularmente útil incluyen enfermedades autoinmunes, rechazo por trasplante, dermatitis, enfermedad inflamatoria del intestino y/o alergias, como se establecerá adicionalmente adelante.

Los anticuerpos humanizados se pueden por ejemplo derivar de los anticuerpos producidos mediante células B o hibridomas y cualquier fragmento de los mismos, por ejemplo, los fragmentos F(ab')₂ y FAB así como también anticuerpos monocatenarios o de dominio único. Un anticuerpo monocatenario consiste de las regiones variables de las cadenas pesada y liviana del anticuerpo covalentemente unidas a un ligador de péptido que consiste usualmente de 10 a 30 aminoácidos, preferiblemente de 15 a 25 aminoácidos. Por lo tanto, tal estructura no incluye la parte constante de las cadenas pesada y liviana y se cree que el separador péptido pequeño debe ser menos antigénico que una parte constante completa. Por un anticuerpo humanizado se entiende un anticuerpo en el cual las regiones hipervariables (CDR) son de origen no humano (por ejemplo murino) todas o sustancialmente todas las otras partes, por ejemplo, las regiones constantes y las partes altamente conservadas de las regiones variables son de origen humano. Un anticuerpo

humanizado sin embargo puede retener unos pocos aminoácidos de la secuencia de murino en las partes de las regiones variables adyacentes a las regiones hipervariables.

Las regiones hipervariables, es decir, los CDR de acuerdo con la presente invención se pueden asociar con cualquier clase de regiones de estructura, por ejemplo, partes constantes de las cadenas liviana y pesada de origen humano. Tales regiones de estructura son descritas en “Sequences of proteins of immunological interest”, Kabat, E.A. *et al*, departamento Estadounidense de los servicios de salud y humanos, Servicio público de salud, Instituto Nacional de salud. Preferiblemente la parte constante de la cadena pesada humana puede ser del tipo IgG1, que incluye los subtipos, preferiblemente la parte constante de la cadena liviana humana puede ser del tipo κ o λ , más preferiblemente del tipo κ . Preferiblemente, dicha cadena pesada comprende no más un sitio de glucosilación, más preferiblemente el sitio de glucosilación es un sitio de N-glucosilación, y más preferiblemente el sitio de glucosilación está localizado en la parte constante de la cadena pesada. Más preferiblemente ningún sitio de glucosilación está presente en la región variable, preferiblemente ningún sitio de glucosilación en la región de estructura.

En otro aspecto la presente invención suministra un anticuerpo humanizado que comprende

- un polipéptido de la SEQ ID NO: 31 y un polipéptido de la SEQ ID NO: 7 (tal como VHEN73D/humV2),
- un polipéptido de la SEQ ID NO: 31 y un polipéptido de la SEQ ID NO: 8 (tal como VHEN73D/humV1),
- un polipéptido de la SEQ ID NO: 32 y un polipéptido de la SEQ ID NO: 7 (tal como VHQN73D/humV2),
- un polipéptido de la SEQ ID NO: 32 y un polipéptido de la SEQ ID NO: 8 (tal como VHQN73D/humV1),

“Polipéptido”, sino se especifica de otra manera aquí, incluye cualquier péptido o proteína que comprende aminoácidos unidos uno al otro mediante enlaces peptídicos que tienen una secuencia de aminoácidos que inicia en la extremidad N-terminal y terminan en la extremidad C-terminal. El polipéptido de la presente invención es un anticuerpo monoclonal. Preferiblemente es un anticuerpo monoclonal humanizado (injertado-CDR), el anticuerpo monoclonal humanizado (injertado-CDR) puede o no incluir mutaciones adicionales introducidas en las secuencias de estructura (FR) del anticuerpo aceptador. Preferiblemente el anticuerpo humanizado comprende no más de un sitio de glucosilación. Más preferiblemente dicho un sitio de glucosilación es un sitio de N-glucosilación. Más preferiblemente ningún sitio de glucosilación está presente en la región variable, y aún más preferiblemente ningún sitio de glucosilación está presente en la región variable de la cadena pesada más preferiblemente ningún sitio de glucosilación está presente en las regiones de estructura (FR).

El término “modificación covalente” incluye las modificaciones de un polipéptido de acuerdo con la presente invención, por ejemplo una secuencia especificada; o un fragmento de ésta con un agente de derivación proteínico o no proteínico orgánico, fusiones a secuencias de polipéptido heterólogo, y modificaciones postraduccionales. Los polipéptidos modificados covalentes, por ejemplo, una secuencia especificada, tienen aún la capacidad de unirse al CD45RO o al CD45RB mediante reticulación. Las modificaciones covalentes son tradicionalmente introducidas al hacer reaccionar los residuos de aminoácido objetivo con un agente de derivación orgánico que es capaz de reaccionar con los lados seleccionados o los residuos terminales, o mediante mecanismos de aprovechamiento de las modificaciones postraduccionales que funcionan en las células huéspedes recombinantes seleccionadas. Ciertas modificaciones postraduccionales son el resultado de la acción de células huéspedes recombinantes sobre el polipéptido expresado. Los residuos de glutaminilo y asparaginilo son frecuentemente traduccionalmente desamidados a los correspondientes residuos de glutamilo y aspártico. Alternativamente, estos residuos son desaminados bajo condiciones medianamente ácidas. Otras modificaciones postraduccionales incluyen la hidroxilación de la prolina y la lisina, la fosforilación de los grupos hidroxilo de residuos de serilo, tiroxina y treonilo, la metilación de los grupos α -amino de lisina, arginina, y las cadenas laterales de histidina, ver por ejemplo T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983). Las modificaciones covalentes, por ejemplo incluyen proteínas de fusión que comprenden un polipéptido de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, de una secuencia especificada y sus variantes de secuencia de aminoácidos, tal como las inmunoadesinas, las fusiones N-terminales a las secuencias de señal heteróloga.

“Aminoácido(s)” se refiere a todos los aminoácidos L- α aminoácidos de ocurrencia natural, por ejemplo, e incluyen los D-aminoácidos. Los aminoácidos se identifican por cualquiera de las designaciones de una letra o tres letras bien conocidas.

El término “variante de secuencia de aminoácido” se refiere a moléculas con algunas diferencias en sus secuencias de aminoácidos comparadas con un polipéptido de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, de una secuencia especificada. Las variantes de la secuencia de aminoácido del polipéptido de acuerdo a la presente invención, por ejemplo, de una secuencia especificada, tienen aún la capacidad de unirse al CD45RO y al CD45RB. Las variantes de sustitución son aquellas que tienen por lo menos un residuo de aminoácido removido y un diferente aminoácido insertado en su lugar en la misma posición en un polipéptido de acuerdo con la presente invención, por ejemplo de una secuencia especificada. Estas sustituciones pueden ser únicas, donde solamente un aminoácido de la molécula sea sustituido, o ellas pueden ser múltiples, donde dos o más aminoácidos han sido sustituidos en la misma molécula.

Las variaciones de inserción son aquellas con uno o más aminoácidos insertados inmediatamente adyacentes a un aminoácido en una posición particular en un polipéptido de acuerdo con la presente invención, por ejemplo de una secuencia especificada. Inmediatamente adyacente a un aminoácido significa conectado a cualquiera de los grupos funcionales α -carboxi o α -amino del aminoácido. Las variaciones de eliminación son aquellas con uno o más aminoácidos en un polipéptido de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, de una secuencia especificada, removida. Habitualmente, las variaciones de eliminación tendrán uno o dos aminoácidos suprimidos en una región particular de la molécula.

En otro aspecto la presente invención suministra polinucleótidos aislados que codifican el anticuerpo humanizado de la presente invención.

Los polinucleótidos que comprenden los polinucleótidos que codifican un polipéptido de la SEQ ID NO: 31 y/o de la SEQ ID NO: 32, preferiblemente un polipéptido de la SEQ ID NO: 7 o la SEQ ID NO: 8; por ejemplo que codifican:

- un polipéptido de la SEQ ID NO: 31 y un polipéptido de la SEQ ID NO: 7,
- un polipéptido de la SEQ ID NO: 31 y un polipéptido de la SEQ ID NO: 8,
- un polipéptido de la SEQ ID NO: 32 y un polipéptido de la SEQ ID: 7 o,
- un polipéptido de la SEQ ID NO: 32 y un polipéptido de la SEQ ID: 8.

“Polinucleótido” si no se especifica de otra manera aquí incluye cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN no modificado, o ARN o ADN modificado, que incluye sin limitación ARN mono o bicatenario, y ARN que es una mezcla de regiones mono o bicatenarias.

El anticuerpo humanizado CD45RO/RB por ejemplo que es un anticuerpo quimérico o humanizado, se puede producir mediante técnicas de ADN recombinante. Así, una o más moléculas de ADN que codifican el CD45RO/RB se pueden construir colocadas bajo secuencias de control apropiadas y transferidas a un huésped adecuado (organismo) para expresión mediante un vector apropiado.

En otro aspecto la presente invención, suministra un polinucleótido que codifica una cadena pesada y/o liviana monocatenaria de un anticuerpo humanizado CD45RO/RB de acuerdo con la presente invención; y el uso de un polinucleótido de acuerdo con la presente invención para la producción de un anticuerpo humanizado CD45RO/RB de acuerdo con la presente invención por medios recombinantes.

Se puede obtener una molécula de unión CD45RO/RB de acuerdo, por ejemplo, análogamente a un método convencional junto con la información suministrada, aquí por ejemplo, con el conocimiento de la secuencia de aminoácido de las regiones hipervariables o variables y las secuencias de polinucleótido que codifican estas regiones. Un método para construir un gen de dominio variable es por ejemplo, descrito en la EP 239 400 y se puede resumir brevemente como sigue: se puede clonar un gen que codifica una región variable del mAb de cualquier especificidad. Se determinan los segmentos de ADN que codifican la estructura y las regiones hipervariables y se remueven los segmentos de ADN que codifican las regiones hipervariables. Los casetes de CDR sintéticos bicatenarios se preparan mediante síntesis de ADN de acuerdo con la secuencia CDR y CDR' como se especifica aquí. Estos casetes se suministran con extremos pegajosos de tal manera que ellos se puedan ligar en las uniones de una estructura deseada de origen humano. Los polinucleótidos que codifican los anticuerpos monocatenarios también se pueden preparar de acuerdo a por ejemplo análogamente a un método convencional. Un polinucleótido de acuerdo con la presente invención preparado así puede ser convenientemente transferido en un vector de expresión apropiado.

Las estirpes celulares apropiadas se pueden encontrar de acuerdo con esto, por ejemplo, análogamente, a un método convencional. Los vectores de expresión, por ejemplo, que comprenden promotores y genes adecuados que codifican las partes constantes de una cadena pesada y liviana se conocen, por ejemplo, y están disponibles comercialmente. Los huéspedes apropiados se conocen o se pueden encontrar de acuerdo, por ejemplo, análogamente, a un método convencional e incluir cultivo de célula o animales transgénicos.

En otro aspecto la presente invención suministra un vector de expresión que comprende polinucleótidos de acuerdo con la presente invención, en donde el vector es capaz de producir el anticuerpo humanizado cuando dicho vector está presente en una célula anfitriona compatible.

En otro aspecto, la presente invención suministra una célula anfitriona aislada que comprende un vector de expresión capaz de producir el anticuerpo humanizado. Hemos encontrado adicionalmente que el anticuerpo humanizado CD45RO/RB de acuerdo con la presente invención inhibe las respuestas aloinmunes primarias en una forma dependiente de dosis como se determina mediante el MLR *in vitro*. Los resultados indican que las células que se han aloactivado en la presencia de un anticuerpo humanizado CD45RO/RB de acuerdo con la presente invención están afectadas en sus respuestas a aloantígeno. Esto confirma la indicación de que un anticuerpo humanizado CD45RO/RB de acuerdo con la presente invención puede actuar directamente sobre las células T aloactivas efectoras y modular su

función. Además, las propiedades funcionales de las células T derivadas del MLR primario se estudian adicionalmente en experimentos de reestimulación en MLR secundario; utilizando células estimuladoras específicas o estimuladores de tercera parte para evaluar la especificidad de los efectos funcionales observados. Hemos encontrado que las células derivadas de los MLR primarios en las cuales está presente el anticuerpo humanizado CD45RO/RB de acuerdo con la presente invención, se afectan en su capacidad a responder a estímulos ópticos subsecuentes con células estimuladoras específicas, aunque no se agrega ningún anticuerpo a los cultivos secundarios. La especificidad de la inhibición se demuestra mediante la capacidad de las células tratadas con el anticuerpo humanizado CD45RO/RB de acuerdo con la presente invención para responder normalmente a células estimuladoras de donantes de tercera parte no relacionados. Los experimentos de reestimulación que utilizan células T derivadas de cultivos MLR primarios indican así que las células que habían aloactivado un anticuerpo humanizado CD45RO/RB de acuerdo con la presente invención son hiposensibles, es decir son tolerantes al aloantígeno original. Las actividades biológicas adicionales se describen en los ejemplos 7, y 9 a 13.

Adicionalmente hemos encontrado que la proliferación de células en células pretratadas con un anticuerpo humanizado CD45RO/RB de acuerdo con la presente invención se podría rescatar mediante el IL-2 exógeno. Esto indica que el tratamiento de células T alorreactivas con un anticuerpo humanizado CD45RO/RB de acuerdo con la presente invención induce un estado de tolerancia. De hecho, las respuestas proliferativas reducidas observadas en las células tratadas con un anticuerpo humanizado CD45RO/RB de acuerdo con la presente invención, se deben al daño de la función de la célula T, y estas células son capaces de responder al IL-2 exógeno, indicando que estas células están en un estado de insensible cierto anérgico. La especificidad de esta respuesta se muestra mediante la capacidad de las células tratadas con un anticuerpo humanizado CD45RO/RB de acuerdo a la presente invención para proliferar normalmente a células donantes no relacionadas al nivel de las células tratadas de control.

Adicionalmente los experimentos indican que la unión del anticuerpo humanizado CD45RO/RB de acuerdo con la presente invención al CD45RO y al CD45RB puede inhibir las respuestas de memoria de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes inmunizados al antígeno de memoria específico. La unión de un anticuerpo humanizado CD45RO/RB de acuerdo con la presente invención al CD45RO y al CD45RB es también así efectiva para inhibir las respuestas de memoria al AG soluble. La capacidad de un anticuerpo humanizado CD45RO/RB de acuerdo con la presente invención para inhibir las respuestas de memoria inmunológica del antígeno del tétano en el PMC de los donantes inmunizados indican que una molécula de unión de CD45RO/RB de acuerdo con la presente invención es capaz de apuntar a un objetivo y modular la activación de las células T de memoria. Por ejemplo, estos datos indican que un anticuerpo humanizado CD45RO/RB de acuerdo con la presente invención además de reconocer las células T alorreactivas y activadas es capaz de modular su función, dando como resultado la inducción de la energía de las células T. Esta propiedad puede ser importante en el tratamiento de respuestas inmunes en desarrollo a autoantígenos y alérgenos y posiblemente a aloantígenos como se ve en las enfermedades autoinmunes, alergia y rechazo crónico, y a enfermedades tales como la soriasis, la enfermedad inflamatoria del intestino, donde las respuestas de memoria tienen una función en el mantenimiento del estado de la enfermedad. Se considera que es una característica importante de la situación de la enfermedad, tal como las enfermedades autoinmunes en las que las respuestas de memoria a los autoantígenos pueden tener una función principal para el mantenimiento de la enfermedad.

También hemos encontrado que el anticuerpo humanizado CD45RO/RB de acuerdo con la presente invención puede modular las respuestas proliferativas de las células T en una respuesta de linfocito mezclada (MLR) *in vivo*, es decir un anticuerpo humanizado CD45RO/RB de acuerdo con la presente invención se encuentra que tiene unas propiedades inhibitorias correspondientes en pruebas *in vivo*, tal como por ejemplo, la prevención de la enfermedad del injerto contra el anfitrión xenogénica letal (GVHD) o la supresión del proceso inflamatorio que media el rechazo de piel de aloinjerto humano en modelos de ratones SID, o que prolongan la supervivencia del aloinjerto de islote humano en un modelo de ratón hu-PBL-NOD/SCID.

Un anticuerpo humanizado CD5RO/RB de acuerdo con la presente invención puede tener así propiedades inmuno-supresoras y tolerogénicas y puede ser útil para inducción a tolerancia *in vivo* y *ex vivo* a aloantígenos, autoantígenos, alérgenos y antígenos de flora bacteriana, por ejemplo, un anticuerpo humanizado CD45RO/RB de acuerdo con la presente invención puede ser útil en el tratamiento y profilaxis de enfermedades por ejemplo que incluyen enfermedades autoinmunes tales como, pero no limitadas a artritis reumatoide, artritis psoriásica, tiroiditis autoinmune, enfermedad de Graves, diabetes tipo 1 y tipo 2, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn (CD), colitis ulcerativa (UC), lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjögren, escleroderma, gastritis autoinmune, glomerulonefritis, rechazo por trasplante, tal como, pero no limitado al injerto de órgano y tejido y rechazo de semiinjerto, por ejemplo, para el tratamiento de receptores de por ejemplo trasplante de corazón, pulmón, corazón y pulmón combinado, hígado, riñón, pancreático, de piel o de cornea, enfermedad del injerto contra el anfitrión (GVHD), tal como el que sigue al trasplante de médula ósea, y/o al rechazo de trasplante de célula de islote pancreático, y/o también soriasis, dermatitis tal como dermatitis atópica y de contacto que incluye dermatitis de contacto alérgica, enfermedad inflamatoria del intestino y/o alergias que incluyen asma alérgica.

El otro aspecto de la presente invención suministra el uso del anticuerpo humanizado CD45RO/RB de acuerdo con la presente invención como un fármaco.

En un aspecto adicional la presente invención suministra el anticuerpo humanizado de acuerdo con la presente invención para uso en el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades autoinmunes de las enfermedades autoinmunes: rechazo de trasplante, soriasis, dermatitis, enfermedad inflamatoria del intestino y/o alergias.

En otro aspecto la presente invención suministra un anticuerpo humanizado de acuerdo con la presente invención en el tratamiento y/o profilaxis de la enfermedad del injerto contra el anfitrión (GVHD).

En otro aspecto la presente invención suministra un anticuerpo humanizado de acuerdo con la presente invención para la preparación de un medicamento en el tratamiento de rechazo de trasplante de célula de islote pancreático.

En otro aspecto de la presente invención suministra un método de tratamiento y/o profilaxis de enfermedades asociadas con enfermedades autoinmunes, rechazo de trasplante, soriasis, dermatitis, enfermedad inflamatoria del intestino y/o alergias que comprenden suministrar a un sujeto necesitado del tratamiento y/o profilaxis una cantidad efectiva del anticuerpo humanizado GD45RO/RB de acuerdo con la presente invención, por ejemplo en la forma de una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención.

Una realización de la presente invención suministra un método de tratamiento y/o profilaxis de una enfermedad asociada con el rechazo de trasplante de célula islote, por ejemplo, un rechazo de trasplante de célula islote, que comprende administrar a un sujeto necesitado de tal tratamiento y/o profilaxis una cantidad efectiva de un anticuerpo humanizado de acuerdo con la presente invención.

En las realizaciones preferidas dicho anticuerpo humanizado CD45RO/RB para uso como farmacéutico, para la producción de un medicamento o en un método de tratamiento y/o profilaxis de una enfermedad asociada con enfermedades autoinmunes, rechazo de trasplante, soriasis, dermatitis, enfermedad inflamatoria del intestino y/o alergias comprende un polipéptido de la SEQ ID NO: 31 o de la SEQ ID NO: 32 y/o un polipéptido de la SEQ ID NO: 7 o de la SEQ ID NO: 8. Preferiblemente el anticuerpo humanizado CD45RO/RB comprende un polipéptido de la SEQ ID NO: 31 y un polipéptido de la SEQ ID NO: 8.

Una “cantidad efectiva” de un anticuerpo humanizado CD45RO/RB es una cantidad suficiente para efectuar resultados benéficos o deseados que incluyen resultados clínicos tales como disminuir uno o más síntomas que resultan de la enfermedad autoinmune, rechazo de trasplante, soriasis, dermatitis, enfermedad inflamatoria del intestino y/o alergias, incrementar la calidad de vida, de aquellos que sufren de, disminuir la dosis de otros medicamentos requeridos para tratar tales enfermedades, mejorar el efecto de otra medicación, retrasar la progresión de la enfermedad y/o prolongar la supervivencia de los pacientes, directa o indirectamente.

Una cantidad efectiva se puede suministrar en una o más administraciones y puede o no ser lograda en conjunto con otro fármaco, compuesto o composición farmacéutica. Así, una “cantidad efectiva” se puede considerar en el contexto de administrar uno o más agentes terapéuticos, y se puede considerar un agente simple a ser suministrado en una cantidad efectiva si, en conjunto con uno o más de otros agentes, se puede lograr un resultado deseable.

Adicionalmente se puede administrar un anticuerpo humanizado CD45RO/RB de la invención como un ingrediente activo solo o junto con otros fármacos en regímenes inmunomoduladores u otros agentes antiinflamatorios por ejemplo para el tratamiento o prevención de enfermedades asociadas con enfermedades autoinmunes, rechazo por trasplante, soriasis, dermatitis, enfermedad inflamatoria del intestino y/o alergias. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado CD45RO/RB de la invención se puede utilizar en combinación con un inhibidor de calcineurina, por ejemplo ciclosporina A, ciclosporina G, FK-506, ABT-281, ASM 981; un inhibidor mTOR, por ejemplo rapamicina, 40-O-(2-hidroxi)etil-rapamicina, CCI779, ABT578, AP23573, AP23464, AP23675, AP23841, TAFA-93, biolimus-7 o biolimus-9; un corticoesteroide; una ciclofosfamida; azatioprina; metotrexato; un agonista receptor S1P, por ejemplo FTY 720 un análogo de los mismos; leflunomida o análogos de los mismos mizoribina; ácido micofenólico; micofenolato mofetil; 15-desoxiespergualina o análogos de los mismos; anticuerpos monoclonales inmunosupresores, por ejemplo, anticuerpos monoclonales a los receptores de leucocitos, por ejemplo, MHC, CD2, CDS, CD4, CD11a/CD18, CD7, CD25, CD27, B7, CD40, CD45, CD58, CD137, ICOS, CD150 (SLAM), OX40, 4-1BB o sus ligandos, por ejemplo, CD154; u otros compuestos inmunomoduladores, por ejemplo una molécula de unión recombinante que tiene por lo menos una porción del dominio extracelular del CTLA4 o un mutante de los mismos, por ejemplo, una porción por lo menos extracelular del CTLA4 o un mutante de los mismos unidos a una secuencia de proteínas no CTLA4, por ejemplo CTLA4Ig (designado a ATCC 68629) o un mutante de los mismos, por ejemplo LEA29Y u otros inhibidores de molécula de adhesión, por ejemplo mAb o los inhibidores de bajo peso molecular que incluyen agonistas LFA-1, agonistas de selectina y agonistas VLA-4.

Una cantidad efectiva de un anticuerpo humanizado CD45RO/RB de la invención, solo o en conjunto con otros fármacos, compuestos, o composición farmacéutica se puede administrar mediante cualquier ruta convencional, que incluye inyección o infusión gradual durante el tiempo. La administración, puede por ejemplo, ser oral, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intracavidad, subcutánea, tópica o transdérmica. Por “coadministración” se significa la administración del compuesto de las composiciones de la invención junto con o sustancialmente al mismo tiempo, o en el mismo vehículo o en vehículos separados, de tal manera que luego de la administración, por ejemplo, los compuestos están presentes simultáneamente en el tracto gastrointestinal. Preferiblemente, los compuestos se administran como una combinación fija.

En otro aspecto la presente invención suministra una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo humanizado CD45RO/RB de acuerdo con la presente invención en asocio con un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

El término “portador o diluyente farmacéuticamente aceptable” como se utiliza aquí significa uno o más rellenos sólidos o líquidos compatibles, sustancias diluyentes o encapsulantes que son adecuadas para la administración a los mamíferos que incluyen humanos. El término “portador” denota un ingrediente orgánico o inorgánico, natural o sintético, con el cual el ingrediente activo se combina para facilitar la aplicación.

El término “farmacéuticamente aceptable” significa un material no tóxico que no interfiere con la efectividad de la actividad biológica de los ingredientes activos. Tales preparaciones pueden contener rutinariamente concentraciones farmacéuticamente aceptables de sales, agentes amortiguadores, conservantes, portadores compatibles, agentes potenciadores inmunes suplementarios tales como adyuvantes y citocinas y opcionalmente otros agentes terapéuticos tales como agentes quimioterapéuticos.

Cuando se utilizan en medicina, las sales deben ser farmacéuticamente aceptables, pero las sales no farmacéuticamente aceptables se pueden utilizar convenientemente para preparar sales farmacéuticamente aceptables de estas y no están excluidas del alcance de la invención.

Las composiciones farmacéuticas pueden contener agentes amortiguadores adecuados, que incluyen: ácido acético en una sal; ácido cítrico en una sal; ácido bórico en una sal; ácido fosfórico en una sal. Las composiciones farmacéuticas también pueden contener, opcionalmente, conservantes adecuados, tales como: cloruro de benzalconio; clorobutanol; parabenos y timerosal.

Las dosis del polipéptido o ácido nucleico que codifica dicho polipéptido administrado a un sujeto se pueden seleccionar de acuerdo con diferentes parámetros, en particular de acuerdo con el modo de administración utilizado y el estado del sujeto. Otros factores incluyen el periodo deseado de tratamiento. En el evento de que una respuesta en un sujeto sea insuficiente en las dosis iniciales aplicadas, se pueden emplear mayores dosis (o dosis efectivamente mayores mediante una ruta de suministro diferente, más localizada) en la medida en que la tolerancia del paciente lo permita.

Las composiciones farmacéuticas se pueden presentar convenientemente en una forma de dosis unitarias y se pueden preparar mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de farmacia. Todos los métodos incluyen la etapa de llevar el agente activo en asocio con un portador que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las composiciones se preparan al llevar uniforme e íntimamente el compuesto activo en asocio con un portador líquido, un portador sólido finamente dividido, o ambos y luego si es necesario, conformar el producto.

Las composiciones adecuadas para la administración oral se pueden presentar como unidades discretas tales como cápsulas, comprimidos, pastillas, que contienen cada una cantidad predeterminada del compuesto activo y otras composiciones incluyen suspensiones en líquidos acuosos o líquidos no acuosos tales como un jarabe, elixir o una emulsión.

Las composiciones adecuadas para la administración parenteral comprenden de manera conveniente una preparación acuosa o no acuosa estéril de un polipéptido de ácido nucleico que codifica el polipéptido, que es preferiblemente isotónico con la sangre del receptor. Esta preparación se puede formular de acuerdo con métodos conocidos utilizando agentes de dispersión y humectación adecuados y agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución inyectable estéril o una suspensión en diluyente o disolvente parenteralmente no tóxico aceptable, por ejemplo, como una solución de 1,3-butanediol. Entre los vehículos y los disolventes aceptables que se pueden emplear está el agua, la solución de Ringer, y solución de cloruro de sodio isotónica. Además, los aceites fijos estériles son empleados convencionalmente como un disolvente o un medio de suspensión. Para este propósito cualquier se puede emplear cualquier mezcla de aceite fijo ligero que incluye mono o diglicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos tales como el ácido oleico se pueden utilizar en la preparación de inyectables. La formulación portadora adecuada para administraciones orales subcutáneas, intravenosas, y intramusculares, se pueden encontrar en el Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA.

Una composición farmacéutica puede comprender además, por ejemplo, ingredientes activos, por ejemplo, otros anticuerpos inmunomoduladores tales como, pero no confinados a anti-ICOS, anti-CD154, anti-CD134L o proteínas recombinantes tales como, pero no confinadas a rCTLA-4 (CD152), rOX40 (CD134), o agentes antiinflamatorios o compuestos inmunomoduladores tales como, pero no confinados a ciclosporina, FTY720, RAD, rapamicina, FK506, 15-desoxiespergualina, esteroides; como se describió anteriormente. Tal composición farmacéutica puede comprender un anticuerpo humanizado CD45RO/RB de acuerdo con la invención y fármacos inmunomoduladores y/o agentes antiinflamatorios en forma de dosis unitarias comparadas preferiblemente en donde las formas de dosis unitarias son adecuadas para la administración de los compuestos componentes en cantidades energicamente efectivas, junto con instrucciones para uso, opcionalmente y con medios adicionales para facilitar el cumplimiento de la administración de los compuestos componentes, por ejemplo, una etiqueta o dibujos. Las composiciones de la invención se pueden administrar como una combinación libre, o se pueden formular en una combinación fija. Las dosis absolutas de los compuestos variarán dependiendo de un número de factores, por ejemplo, el individuo, la ruta de administración, la duración deseada, la tasa de liberación del agente activo y la severidad de la afección a ser tratada.

Las enfermedades como se subrayó anteriormente a ser tratadas con el anticuerpo humanizado CD45RO/RB de la presente invención solo o en combinación con otros fármacos incluye, pero no está limitado a enfermedades autoinmunes, que incluye artritis reumatoide, artritis psoriásica, tiroiditis autoinmune, enfermedad de Graves, diabetes

tipo 1 y tipo 2, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn (CD), colitis ulcerativa (UC), lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjögren, escleroderma, gastritis autoinmune, y glomerulonefritis; rechazo por trasplante, tal como, pero no limitado a, aloinjerto de órgano y tejido y rechazo de xenoinjerto, por ejemplo, para el tratamiento de receptores de por ejemplo trasplantes de corazón, pulmón, corazón y un pulmón combinados, hígado, riñón, pancreático, de piel o de cornea, enfermedad del injerto contra el anfitrión (GVHD), tal como lo que sigue al trasplante de médula ósea, y/o rechazo de trasplante de célula islote pancreática, y/o también soriasis, dermatitis tal como dermatitis atópica y de contacto que incluye dermatitis de contacto alérgica, enfermedad inflamatoria del intestino y/o alergias que incluyen asma alérgica.

Ejemplos

La invención será más completamente entendida mediante referencia a los siguientes ejemplos. Ellos no se deben considerar, sin embargo, como limitantes al alcance de la invención. En los siguientes ejemplos todas las temperaturas están en grados Celsius.

El “candidato mAb” o “anticuerpo quimérico” es una molécula de unión CD45RO/RB de acuerdo con la presente invención que comprende la cadena liviana de la SEQ ID NO: 3 y la cadena pesada de la SEQ ID NO: 4.

El “anticuerpo humanizado” es una molécula de unión CD45RO/RB de acuerdo con la presente invención que comprende un polipéptido de la SEQ ID NO: 8 y un polipéptido de la SEQ ID NO: 9 (VHE/humV1, VHE/VL1 o VHE/VLh), un polipéptido de la SEQ ID NO: 8 y un polipéptido de la SEQ ID NO: 10 (VHQ/humV1, VHQ/VL1 o VHQ/VLh); un polipéptido de la SEQ ID NO: 7 y un polipéptido de la SEQ ID NO: 9 (VHE/humV2, VHE/VL2 o VHE/VLm); un polipéptido de la SEQ ID NO: 7 y un polipéptido de la SEQ ID NO: 10 (VHQ/humV2, VHQ/VL2 o VHQ/VLm); un polipéptido de la SEQ ID NO: 8 y un polipéptido de la SEQ ID NO: 31 (VHEN73D/humV1, VHEN73D/VL1 o VHEN73D/VLh); un polipéptido de la SEQ ID NO: 8 y un polipéptido de la SEQ ID NO: 32 (VHQN73D/humV1, VHQN73D/VL1 o VHQN73D/VLh); un polipéptido de la SEQ ID NO: 7 y un polipéptido de la SEQ ID NO: 31 (VHEN73D/humV2, VHEN73D/VL2 o VHEN73D/VLm); o un polipéptido de la SEQ ID NO: 7 y un polipéptido de la SEQ ID NO: 32 (VHQN73D/humV2, VHQN73D/VL2 o VHEN73D/VLm).

Se utilizan las siguientes abreviaturas:

APC	célula que presenta antígeno
CEX	cromatografía de intercambio de catión
c.p.m.	conteos por minuto
dhfr	dihidrolato reductasa
EDTA	ácido etileno dinitrilo tetra acético
ELISA	ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima
ESI-Q-TOF	ionización electrospray-cuadrupolo - tiempo de vuelo
FACS	selección de célula activada por fluorescencia
Fc	fragmento cristizable
F(ab') ₂	unión de antígeno de fragmento; bivalente
FITC	fluoresceína isotiocianato
FBS	suero bovino fetal
GVHD	enfermedad de injerto -vs- huésped
HCMV	promotor de citomegalovirus humano
HPLC	cromatografía líquida de alto desempeño
IFN-γ	interferón gama
IgE	isotipo de inmunoglobulina E

ES 2 341 341 T3

	IgG	isotipo de inmunoglobulina G
	IL-2	interleuquina-2
5	IU	unidades internacionales
	MALDI-TOF	ionización de desorción láser asistida por matriz - tiempo de vuelo
	MLR	reacción de linfocito mezclado
10	MLC	cultivo de linfocito mezclado
	MP1	proteína de matriz 1 del hemófilo de la influenza
15	MTX	metotrexato
	PBS	solución salina amortiguada con fosfato
	PBL	leucocitos de sangre periférica
20	PBMC	células mononucleares de sangre periférica
	PCR	reacción en cadena polimerasa
25	RP	cromatografía de fase inversa
	SEC	cromatografía de exclusión de tamaño
	SCID	inmunodeficiencia combinada severa
30	T _{reg}	células reguladoras T
	xGVHD	enfermedad de xenoinjerto vs huésped

35 Ejemplo 1

Respuesta de linfocito mezclado Primaria (MLR)

40 Células

Las muestras sanguíneas se combinan de donantes humanos saludables. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aíslan mediante centrifugación sobre Ficoll-Hypaque (Pharmacia LKB) de leucocitos de sangre periférica completa, leucoferesis o capas leucocíticas con tipo de sangre conocidos, pero tipo HLA desconocido. En algunos experimentos MLR, los PBMC son directamente utilizados como células estimuladoras después de la irradiación a 40 Gy. En otros experimentos, las células T se agotan de PBMC al utilizar CD2 o CD3 Dynabeads (Dyna, Oslo, Noruega). Los glóbulos y las células contaminantes se remueven mediante campo magnético. El PBMC agotado de célula T se utiliza como células estimuladoras después de la irradiación.

El PBMC, las células T CD3⁺ o células T CD4⁺ se utilizan como las células de respuesta en MLR. Las células se preparan de diferentes donantes a células estimuladoras. Las células T CD3⁺ se purifican mediante selección negativa utilizando anti-CD16 mAb (Zymed, CA), IgG anti-ratón de cabra Dynabeads, anti-CD14 Dynabeads, CD19 Dynabeads. Además los anti-CD8 Dynabeads son utilizados para purificar las células T CD4⁺. Las células obtenidas se analizan mediante FACScan o FACSCalibur (Becton Dickinson & Co., CA) y la pureza de la células obtenidas fue >75%. Las células se suspenden en medio RPMI1640, complementado con 10% de FBS inactivado con calor, penicilina, estreptomycin y L-glutamina.

Reactivos

El anti-CD45R0/RB mAb quimérico “candidato mAb” y un anticuerpo quimérico de control que coincide con isotipo o también se genera. El IgG₁ de control de ratón (Humano) específico de anticuerpo para KLH (hemocianina de lapa hueco de cerradura) o un IL-10 humano recombinante se compra de BD Pharmingen (San Diego, CA). El CD154 anti-humano mAb 5c8 está de acuerdo Lederman *et al* 1992.

65 *Respuesta de Linfocito mezclado Primario (MLR)*

Alícuotas de 1 x 10⁵ PBMC o 5 X 10⁴ de las células CD3⁺ o CD4⁺ se mezclan con 1 x 10⁵ PBMC irradiado o 5 x 10⁴ PBMC irradiado agotado de las Células T (50 Gy) en cada pozo de placas de cultivos de 96-pozos (Costar, Cambridge,

MA) en la presencia de mAb indicado o ausencia de Ab. En algunos experimentos, el fragmento F(ab')₂ del Ig anti-ratón de cabra o el Ig anti-humano de cabra específico para la porción Fc (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) se agrega a 10 µg/ml además del candidato mAb para asegurar la reticulación *in vitro* óptima de las moléculas CD45 objetivo. Las células mezcladas se cultivan durante 4 o 5 días a 37°C en CO₂ al 5% y la proliferación se determina al pulsar las células con ³H-timidina durante las últimas 16-20 horas de cultivo.

Otros experimentos son similares a aquellos descritos anteriormente, pero con Las siguientes excepciones: 1) El medio utilizado es EX-VIVO (Bio-Whittaker) que contiene 10% de FBS y 1% de plasma humano; 2) IgG total Anti-ratón (5 µg/ml) se utiliza como etapa de reticulación secundaria; 3) Irradiación de células estimuladoras es 60 Gy.

El MLR Primario se efectúa en la presencia del “candidato mAb” o el IgG₁ quimérico de control (10 µg/ml) ambos con un reactivo de segunda etapa, el fragmento F(ab')₂ de un Ig anti-humano de cabra específico para la porción Fc (10 µg/ml). La inhibición porcentual del “candidato mAb” se calcula en comparación con proliferación de la célula en la presencia del control IgG₁. Los resultados se muestran en Tabla 1 de adelante:

TABLA 1

Inhibición de MLR primario mediante 10 µg/ml de un mAb candidato de acuerdo con la presente invención		
Respondedor	Estimulador (PBMC Irr.)	% de Inhibición
#211 CD4	#219 CD3	63.51
#220 CD4	#219 CD3 depl.	63.07
#227 CD4	#220 CD3 depl.	65.96
#229 CD4	#219 CD3 depl.	50.76
Promedio ± DE		60.83±6.83*
* Significativamente diferente el valor de control (P<0.001)		

Un mAb candidato de acuerdo con la presente invención inhibe el MLR primario como se puede ver de la Tabla 1. El efecto inhibidor Promedio 60.83 ± 6.83% en cuatro diferentes células T CD4⁺ derivadas de diferentes donantes y estadísticamente significativas.

La inhibición del MLR primario por el “candidato mAb” se muestra por ser dependiente de dosis en el rango de 0.001 y 10 µg/ml del “candidato mAb” como se muestra en la Figura 1.

El IC₅₀ para la Inhibición del MLR primario mediante un “candidato mAb” se determina de los resultados tres experimentos MLR separados utilizando un PBMC donante como célula de respuesta. Así, las células T CD4⁺ de respuesta de Donante #229 y #219 y el PBMC irradiado agotado de células T como estimuladores se mezclan en la presencia de un “candidato mAb” o un control quimérico de Ab con 10 µg/ml de fragmento F(ab')₂ de Ig anti-humano de cabra. Los experimentos son repetidos 3 veces y el porcentaje de proliferación en la presencia de un “candidato mAb” se calcula en comparación con la proliferación de la célula T en la presencia del control Ab. El valor IC₅₀ se determina utilizando Origen (V. 6.0®). El valor IC₅₀ de la actividad celular se calcula por 0.87 ± 0.35 nM (0.13 ± 0.052 µg/ml).

Ejemplo 2

MLR Secundario

Con el fin de evaluar si el “candidato mAb” induce no respuesta de las células T CD4⁺ al aloantígenos específicos, el MLR Secundario se efectúa en ausencia de cualquiera de los anticuerpos después del MLC primario. Las células T CD4⁺ se cultivan con células estimuladoras alogénicas irradiadas (PBMC agotado de células T) en la presencia del anticuerpo indicado en placas de cultivo en 96 pozos durante 10 días (MLC primario). Luego, las células son recolectadas, puestas en placas sobre el gradiente Ficoll-Hypaque para remover las células muertas lavadas dos veces con RPMI, y estimuladas con el mismo estimulador, células estimuladoras de 3ra parte o IL-2 (50 U/ml). Las células se cultivan durante 3 días y se determina la respuesta proliferativa al pulsar las células con ³H-timidina durante las últimas 16-20 horas de cultivo.

Específicamente, las células T CD4⁺ se cultivan e irradiadas con células estimuladoras alogénicas irradiadas (PBMC agotado de células T tomadas de otros donantes) en la presencia de 10 µg/ml del “candidato mAb”, IgG₁ de control quimérico Ab y el fragmento F(ab')₂ de Ig anti-humano de cabra. La proliferación MLR primaria se de-

ES 2 341 341 T3

termina en el día 5. Para MLR Secundario, el respondedor y células estimuladoras se cultivan durante 10 días en la presencia del “candidato mAb”, luego las células son cosechadas, lavadas dos veces en RPMI1640 y reestimuladas con un estimulador específico, estimuladores de tercera parte o IL-2 (50 U/ml) en la ausencia de cualquier Ab. La proliferación de las células se determina en el día 3. Los resultados se establecen en la Tabla 2:

TABLA 2

Donante de células T CD4 ⁺ de respuesta #	% de Inhibición de MLR 2 ^{ry}
#211	49.90*
#220	59.33*
#227	58.68*
* Significativamente diferente del valor de control (p=<0.001 Determinado mediante la prueba t, SigmaStat V.2.03). # p=<0.046	

Con el fin de probar si la proliferación afectada se debe a no respuesta como una consecuencia del tratamiento con un “candidato mAb”, la células derivadas de MLR primario se cultivan en la presencia de IL-2 (50 U/ml). La adición de los resultados IL-2 en el rescate de las respuestas proliferativas de la células T que habían sido tratadas con un “candidato mAb” en el MLR primario, a niveles similares a aquellos observados en la presencia del control Ab IgG₁. Estos datos indican que la respuesta secundaria afectada en las células T tratados con un “candidato mAb” se debe a la alteración funcional de las células T de respuesta que se convierten en células de no respuesta a estimulador específico.

La inhibición porcentual se calcula de acuerdo la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{c.p.m con control Ab} - \text{c.p.m con "candidato mAb"}}{\text{c.p.m con control Ab}} \times 100$$

Se efectúa análisis estadístico utilizando SigmaStat (Vers. 2.03).

Los datos se analizan mediante una ANOVA de dos vías seguidos por un método Dunnett. En todos los procedimientos de prueba las probabilidades <0.05 se consideran como significativas. En algunos experimentos, la prueba t se utiliza (SigmaStat V.2.03).

Ejemplo 3

Estudios de supervivencia in vivo en ratones SCID

Injerto del hu-PBL en ratones SCID

Las células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) se inyectan intraperitonealmente en ratones SCID ratones C.B 17/GbmsTac-Prkdc^{scid} Lyst^{bg} (Taconic, Germantown, NY) en una cantidad suficiente para inducir enfermedad del injerto contra el anfitrión xenogénica letal (xGvHD) en >90% en ratones dentro de las 4 semanas después de la transferencia de célula. Tales ratones SCID tratados son en sucesivo designados como ratones hu-PBL-SCID.

Tratamiento mAb de los ratones hu-PBL-SCID

Los ratones Hu-PBL-SCID se tratan con un “candidato mAb” o ratón o controles mAb ajustados con isotipos quiméricos en el día 0, inmediatamente después de la inyección PBMC, en el día 3, día 7 y a intervalos semanales posteriormente. Los mAb se suministran subcutáneamente en 100 µl de PBS a una concentración final de 5 mg/kg de peso de cuerpo. El tratamiento se detiene cuando todos los ratones de control estuvieron muertos.

Evaluación de los resultados del tratamiento

El criterio principal para evaluar la eficacia de un “candidato mAb” en este estudio fue la supervivencia de los ratones hu-PBL-SCID. La significancia de los resultados se evaluó mediante el método estadístico de análisis de supervivencia utilizando la prueba Log-rank (método de Mantel) con la ayuda del software Systat v9.01. El método de análisis de supervivencia es una prueba no paramétrica, que no solamente considera si un ratón particular está aún vivo sino que también si éste se sacrifica por razones irrelevantes al tratamiento/enfermedad tal como el requisito

de efectuar análisis *in vitro* con sus órganos/células. Las biopsias del hígado, pulmón, riñón y bazo se obtuvieron de ratones muertos para evaluación adicional. Además, los ratones hu-PBL-SCID son pesados al inicio (antes de la transferencia de las células) y durante (cada dos días) El experimento como una estimación indirecta de su estado de salud. Se generan líneas de regresión lineal utilizando el peso del cuerpo versus los días de los valores de transferencia post-PBMC obtenidos de cada ratón y posteriormente, sus pendientes (control versus ratones tratados anti-CD45) se compararon utilizando prueba Mann-Whitney no paramétrica.

Resultados

Todos los ratones hu-PBL-SCID tratados con los controles mAb tuvieron leucocitos humanos infiltrado en el pulmón, hígado y bazo y murieron (4/4) dentro de ca. 2 a 3 semanas después de la transferencia de la célula. La muerte es probablemente consecuencia del xGvHD. Los ratones tratados mAb de control adicionalmente perdieron peso de manera lineal, ca. 10% y más dentro de las 3 semanas.

Todos los ratones hu-PBL-SCID tratados con un “candidato mAb” sobrevivieron (4/4) sin ningún signo aparente de enfermedad más de 4 semanas, aunque el tratamiento el “candidato mAb” se detuvo después de las 3 semanas. Los ratones tratados con el “candidato mAb” incrementaron el peso de manera lineal, hasta un ca. De 5% dentro de las 4 semanas.

Ejemplo 4

Expresión de anticuerpos de la invención

Expresión de anticuerpo humanizado que comprende una SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 SEQ ID NO: 10 SEQ ID NO: 31 o SEQ ID NO: 32

Son construidos los vectores de expresión de acuerdo a los mapas de plásmido mostrados en las Figuras 2 a 11, que comprenden los nucleótidos correspondientes que codifican la secuencia de aminoácido del humV1 de región variable de cadena liviana humanizada (SEQ ID NO: 8; Figuras 4 y 6), región variable de cadena liviana humanizada humV2 (SEQ ID NO: 7; Figuras 5 y 7), región variable de cadena pesada humanizada VHE (SEQ ID NO: 9; Figura 3 y 10), o región variable de cadena pesada humanizada VHQ (SEQ ID NO: 10; Figuras 2 y 11), la región variable de cadena pesada humanizada VHE-N73D (SEQ ID NO: 31; Figura 8) o de región variable de cadena pesada humanizada VHQ-N73D (SEQ ID NO: 32; Figura 9), respectivamente. Estos vectores de expresión tienen las secuencias de ADN (nucleótido) SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 41 (VHQ), SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 40 (VHE), SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 36 (humV1), SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 39 (humV2), o SEQ ID NO 37 (VHEN73D) y SEQ ID NO 38 (VHQ-N73D).

Construcción de los vectores de expresión de cadena pesada y liviana de anticuerpo humanizado para la expresión en células COS

Vectores de expresión de cadena liviana kapa humanos para las versiones VLh y VLm

Con el fin de construir el vector de expresión final para la cadena liviana humanizada completa del isotipo kapa humano, los fragmentos de ADN que codifican las regiones variables de cadena liviana completa (VLh y VLm) se separaron del VLh y VLm que contiene los vectores de clonación PCR-Script (Stratagene) (región VLm) utilizando HindIII y BglIII. Los fragmentos purificados con gel luego se subclonan en los sitios HindIII y BamHI del vector de expresión C21-HCMV kapa el cual se crea durante la construcción del anticuerpo anti-IgE humanizado TESC-21 (Kolbinger *et al* 1993) y que originalmente se recibió de M. Bendig (MRC Collaborative Centre, Londres, RU) (Maeda *et al.* 1991). Los productos de ligación se purifican mediante extracción de fenol/cloroformo, y electroporados en una cepa Coli[®] XL1-Blue Epicurian competente de electroporación (Cat. N° #200228, Stratagene). Después de poner en placas de LB/amp agar durante toda la noche a 37°C, cada una de las 12 colonias se recogieron para preparar ADN de plásmido de un cultivo de 3 ml utilizando BioRobot 9600 (Qiagen). Este produjo los vectores de expresión de cadena liviana para las versiones de anticuerpo humanizado VLh y VLm, respectivamente, como se describe adicionalmente en las Figuras.

Vectores de expresión de cadena pesada gama-1 humano para VHQ

Para la construcción del vector de expresión VHQ, se practica un método en forma de etapas. Primero, la región de variable completa del VHQ se ensambla mediante PCR de acuerdo con la metodología como se describió en Kolbinger *et al* 1993 (Protein Eng. 1993 Nov; 6(8):971-80) y se subclona en la expresión del C21-HCMV-gama-1 de la cual el inserto C21 se habría removido utilizando las mismas enzimas. Un fragmento HindIII/BamHI del clon PCRS-cript que VHQ que contiene la región variable completa se subclona en el vector de expresión C21-HCMV-gama-1 clivado con las mismas enzimas. Este produjo el vector de expresión final para la versión del anticuerpo humanizado VHQ.

Vectores de expresión de cadena pesada gama-1 humanos para VHE

La construcción del vector de expresión VHE final que codifica la cadena pesada humanizada completa del isotipo gama-1 humano se logra al ligar directamente un fragmento de PCR restringido con HindIII y BamHI que codifica la región variable en los sitios HindIII y BamHI del vector de expresión C21-HCMV gama-1 el cual se crea durante la construcción del anticuerpo anti-IgE humanizado TESC-21 (Kolbinger *et al.* 1993) y que también se recibe originalmente de M. Bendig (MRC Collaborative Centre, Londres, RU) (Maeda *et al.* 1991).

Expresión transitoria en células COS

El siguiente protocolo de transfección se adopta para células COS adherentes en platos de cultivos de células de 150 mm, utilizando un reactivo de transfección SuperFect™ (Cat. N°301305, Qiagen). Los cuatro diferentes vectores de expresión descritos anteriormente son utilizados para transfección transitoria de células. Para la expresión del anticuerpo humanizado, cada uno de los dos clones que contienen insertos de cadena pesada (VHE o VHQ, respectivamente) son co-transfectados en células con cada uno de los dos clones que codifican las cadenas livianas (humV1 o humV2, respectivamente), en 4 combinaciones diferentes totales de los vectores de expresión de cadena liviana (VHE/humV1, VHE/humV2, VHQ/humV1 y VHQ/humV2). Antes de la transfección, los plásmidos son linearizados con endonucleasa de restricción PvuI que cliva en la región que codifica el gen de resistencia para ampicilina. El día antes de la transfección, 4×10^6 células COS en 30 ml de medio de cultivo fresco se siembran en platos de 150 mm de cultivos de células. La siembra en esta densidad de célula generalmente produce 80% de confluencia después de 24 horas. En el día de la transfección, cuatro diferentes combinaciones de vectores de expresión ADN de cadena pesada y cadena liviana linearizada ($15 \mu\text{g}$ cada una) son diluidos en un volumen total de $900 \mu\text{l}$ de medio fresco sin suero ni antibiótico. Luego se mezcla $180 \mu\text{l}$ de reactivo de transfección SuperFect completamente con la solución de ADN. La mezcla de ADN se incuba durante 10 min a temperatura ambiente para permitir la formación del complejo. Aunque la formación de complejo tiene lugar, el medio de crecimiento se remueve de los cultivos de célula COS, y las células se lavan una vez con PBS. Luego se agregan 9 ml de un medio de cultivo fresco (que contiene 10% FBS y antibióticos) a cada tubo de reacción que contiene los complejos de reacción y están bien mezclados. La preparación final se transfiere inmediatamente a cada uno de los cuatro cultivos a ser transfectados y se mezclan suavemente. Los cultivos de célula son entonces incubados con complejos de ADN durante 3 horas a 37°C y 5% de CO_2 . Después de la incubación, los complejos de transfección que contienen el medio se remueven y se reemplazan con 30 ml de medio de cultivo fresco. A las 48 hr post transfección, se cosechan los sobrenadantes del cultivo.

Concentración de los sobrenadantes del cultivo

Para el análisis ELISA y FACS, los sobrenadantes del cultivo recolectados de las células COS transfectadas con los plásmidos pesado y ligero son concentrados como siguen. Se agregan 10 ml de cada sobrenadante a dispositivos Centriprep YM-50 Centrifugal Filter (Cat. N° 4310, Millipore) como se describió por el fabricante. Los filtros Centriprep se centrifugan durante 10 min a 3000 rpm a temperatura ambiente. La etapa de centrifugación luego se repite de nuevo con los 20 ml restantes del sobrenadante utilizando solamente 5 min de centrifugación y supervisando la evolución de concentración. Se recuperan los $500 \mu\text{l}$ del intermedio del sobrenadante concentrado, se transfieren a los nuevos dispositivos Microcon Centrifugal Filter (Cat. N° 42412, Microcon) y además se concentran siguiendo el protocolo del fabricante. Los sobrenadantes concentrados se centrifugan cuatro veces durante 24 min a 3000 rpm a temperatura ambiente, un vez durante 10 min a 6000 rpm y luego, tres veces durante 5 min, siempre supervisando la evolución de la concentración. El volumen final del medio acondicionado concentrado logrado es $100\text{--}120 \mu\text{l}$ que corresponde a una concentración de 250 a 300 veces del medio de cultivo original y este se almacena a 4°C hasta uso. Para comparación y control, el medio de cultivo de las células no transfectadas se concentra similarmente, utilizando el mismo protocolo de centrifugación descrito anteriormente.

Generación de anticuerpos anti-CD45RO/RB humanizados que secretan transfectantes de mieloma Sp2/0 estables

La estirpe celular de mieloma de ratón Sp2/0 (ATCC, CRL-1581) se electropora con los vectores de expresión CHO anteriormente descritos que codifican la cadena pesada (VHE o VHQ) y liviana (humV1 o humV2) de los anticuerpos humanizados de unión CD45RO/RB. Cuatro diferentes combinaciones de vectores de expresión de cadena pesada y liviana (VHE/humV1, VHE/humV2, VHQ/humV1 y VHQ/humV2) se utilizan para la transfección de acuerdo al siguiente protocolo: $20 \mu\text{g}$ de ADN superembobinado de cada plásmido se mezclan en una cubeta de electroporación (espacio 0.4 cm) con 8×10^6 células Sp2/0 vivas suspendidas en DMEM/10% de medio de cultivo FCS. Las configuraciones de electroporación son 1500 V, $25 \mu\text{F}$ utilizando un instrumento BioRad GenePulser. Después de la electroporación, las células se cultivan durante 20 h en medio de cultivo (DMEM complementado con 10% de penicilina FCS, estreptomycin y L-glutamina). En el día dos la selección del fármaco G418 (Cat. N° 10131-019, Gibco) se agrega a una concentración final de 1 mg de fármaco activa/ml y las células se distribuyen en una placa de 96-pozos, $200 \mu\text{l}$ de cada pozo con aprox. 10^5 células por pozo. Diez a 15 días más tarde, los clones supervivientes G418 se expanden en un medio que contiene G418. La secreción de los mAbs humanizados de estos transfectantes se evalúa mediante ELISA, utilizando un IgG/Fcy anti-humano de cabra de anticuerpo de recubrimiento (Cat. N° 109-005-098, Jackson Labs) y anticuerpo acoplado a peroxidasa contra cadena liviana kapa humana (Cat. N° A-7164, Sigma). Los transfectantes, con calificación positiva en este ensayo se seleccionan para una comparación de productividad sobre una base por célula por día, de nuevo utilizando ELISA (ver adelante). El mejor clon de cada transfectante se selecciona para su clonación inmediata al limitar la dilución, utilizando una densidad de siembra de 1 célula por pozo. La productividad de los subclones de supervivencia G418 se determina de nuevo como se describió anteriormente.

ES 2 341 341 T3

Los subclones se expanden en medio de selección que contiene G418, hasta que el volumen de cultivo alcanza 150 ml, etapa en la cual el cultivo se continúa sin G418 en matraces destinados a cargar botellas de rodillos.

Después de la primera transfección y selección, los transfectantes estables crecen por fuera de las placas de 96 pozos a una frecuencia de 20.8% para VHE/humV1, 11.5% para VHQ/humV1, 18.8% para VHE/humV2 y 7.3% para VHQ/humV2. Después de dos rondas de subclonación los mejores dos productores son el clon 1.33.25 (3.87 pg/célula/días) y el clon 1.33.26 (3.43 pg/célula/día) para VHE/humV1 y el clon 12.1.4 (1.19 pg/célula/día) y el clon 12.1.20 (1.05 pg/célula/día) para VHQ/humV1. Los transfectantes Sp2/0 estables para VHE/humV1 y VHQ/humV1 son posteriormente expandidos para la producción de anticuerpos y purificación.

Los anticuerpos son purificados de los sobrenadantes de estirpes celulares de mieloma SP2/0 transfectadas establemente que contiene 10% de FCS mediante una combinación de cromatografía de afinidad utilizando una matriz IgGfc anti-humana inmovilizada y cromatografía de exclusión de tamaño. Si se requiere, se remueve la endotoxina utilizando una columna Acticlean Etox (Sterogene Bioseparations).

Construcción de los vectores de expresión de cadena pesada y liviana del anticuerpo humanizado para la expresión en célula Sp2/0

Los vectores de expresión de cadena liviana kapa humana para las versiones VLh y VLm:

El cADN humV1 (= VL1) o humV2 (= VL2) se amplifica mediante PCR del plásmido de expresión CHO SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 18 respectivamente, utilizando los cebadores HuCD45LC-Mlu (5'-AAAACGCGTTGTGA CATTCTGCTGACCCAGTCT-3'; SEQ ID NO: 42) y el HuCD45LC-Hind (5'-AAAAAGCTTGGTCCCCTGGCC GAACGTGAA-3'; SEQ ID NO: 43). Cada fragmento de PCR 321 bp se digiere con MluI y HindIII y ligado directamente en el vector de expresión de cadena liviana chA6Hck.dhfr que se digiere con las mismas enzimas. Los plásmidos resultantes son nombrados LCVL1Sp20 (SEQ ID NO: 36; Figura 6) y LCVL2Sp20 (SEQ ID NO: 39; Figura 7) respectivamente. El LCVL1Sp20 luego se utiliza para la expresión en las células Sp2/0 del anticuerpo humanizado VHE/humV1, VHQ/humV1 o VHE-N73D/humV1; LCVL2Sp20 se puede entonces utilizar para la expresión en células Sp2/0 del anticuerpo humanizado VHE/humV2 VHQ/humV2 o VHE-N73D/humV2.

Vectores de expresión de cadena pesada gama-1 humana para VHQ y para VHE

Las dos regiones cADN V_H humanizada se amplifican mediante PCR de los plásmidos recombinantes HCMV-G1 HuA6-VHE (SEQ ID NO: 16; Figura 3) y HCMV-G1 HuA6-VHQ (SEQ ID NO: 15 Figura 2) respectivamente, utilizando los cebadores de PCR HuCD45HCEup (5'-CAGGCAGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCA-3'; SEQ ID NO: 44) o HuCD45HCQup (5'-CAGGCACAGGTGCAGCTGGTGGAGTCA-3'; SEQ ID NO: 45) y HuCD45HCllo (5'-AAATCCCTTCTAGAACTCACCTGAGGAGAC-3'; SEQ ID NO: 46). Los extremos 3' de los fragmentos de PCR se digieren con BstEII. Cada fragmento PCR luego se clona en un vector de casete de cadena pesada HCcassREAL cortado con BstEII y el cortador de extremo romo HincII. Los plásmidos resultantes son intermedios a las construcciones de expresión final y son denominados HCcassHVESP20 y HCcassHVQSP20, respectivamente. La subclonación también conduce a un cambio en la secuencia líder que está asociada a ambas de las regiones V_H de los vectores originales. Mientras que la secuencia de aminoácido de la secuencia líder vieja es MDWTWRVFCLLAVVAPGAHS (SEQ ID NO: 47), se ha remplazado durante la subclonación con MAWVWTLPLMAAAQSVQA (SEQ ID NO: 48).

Los intermedios HCcassVHESP20 o HCcassVHQSP20 se digieren con ScaI y posteriormente, los plásmidos se digieren con BamHI y EcoRI. Los fragmentos 2.9 kb que contienen el promotor de cadena pesada Ig y la región V_H se purifican y se ligan con el fragmento de 8.7 kb de un fragmento de digerido BamHI y EcoRI de una construcción de cadena pesada. Los plásmidos resultantes se denominan HCVHESP20 (SEQ ID NO: 40; Figura 10) y HCVHQSp20 (SEQ ID NO: 41; 11), respectivamente; y se utiliza para la expresión en células Sp2/0 del anticuerpo humanizado VHE/humV1. VHQ/humV1.

Vector de expresión de cadena pesada gama-1 humano para VHEN73D

Los vectores de expresión HCVHESP20 (SEQ ID NO: 40; Figura 10) y HCVHQSp20 (SEQ ID NO: 41; Figura 11), se utilizan como plantillas para mutagenia dirigida de sitio para lograr una mutación N73D, (intercambio de asparagina aspartato en la posición 73 del aminoácido de la cadena pesada del anticuerpo humanizado) esta mutación elimina un sitio de N-glucosilación putativo. La mutagenia se efectúa con el kit QuikChange® Multi-Site Directed Mutagenesis (Stratagene) y el cebador aCD45H-N73D (5'-fosfo GCCACATAACTGCAGACAAATCCATCAGCACAGC-3'; SEQ ID NO: 49) de acuerdo con el manual del kit. La secuencia de las construcciones resultantes HCVHEN73DSp20 y HCVHQN73DSp20 están confirmadas y se describen como la SEQ NO: 37 y SEQ NO: 38, y las figuras 8 y 9, respectivamente. HCVHEN73DSp20 (SEQ NO: 37) junto con la construcción de expresión de cadena liviana LCVL1Sp20 (SEQ NO: 36) se utilizan para la expresión en las células Sp2/0 del anticuerpo humanizado VHE-N73D/humV1.

Generación del anticuerpo anti-CD45RO/RB humanizado que secreta transfectantes de mieloma Sp2/0 estables VHE-N73D/humV1

La estirpe celular de mieloma de ratones Sp2/0 Ag14.10 se electroporan con vectores que codifican la cadena pesada (HCVHEN73DSp20; SEQ ID NO: 37) y liviana (LCVL1Sp20; SEQ ID NO: 36) del anticuerpo humanizado

ES 2 341 341 T3

VHEN73D/humV1. Para transfección se utilizan células en fase de crecimiento exponencial con una viabilidad mayor del 95%. Las células se lavan dos veces con amortiguador TF frío (272 mM de sacarosa, 1 mM de $MgCl_2$, 7 mM de amortiguador de fosfato pH 7.4) y la concentración de la célula se ajusta a 2×10^7 célula/ml en un amortiguador TF. Se mezcla 0.8 ml de suspensión de célula con 15 μg cada una de la construcción del plásmido de cadena pesada y liviana y se colocan sobre hielo durante 10 minutos. Se hacen 5 transfecciones mediante electroporación utilizando el Biorad Gene Pulser (280 V y 25 μF). Después de la electroporación las células se colocan sobre hielo durante 15 minutos seguido por transferencia en 50 ml de un medio de cultivo frío (medio basado en RPMI sin FCS) y se incuban durante 2 días a 37°C y 57% de CO_2 .

Para la selección de los transfectantes, las células se cultivan en la presencia de 1.1 mg/ml G418 (Geneticin, Gibco lote 3069464) durante aproximadamente 2 a 3 semanas. El marcador de amplificación de dhfr (dihidrofolato reductasa) localizado sobre la construcción de cadena liviana permite la amplificación del gen dhfr así como también el transgén mediante metotrexato de ácido fólico (MTX). Para la amplificación del gen, se cultivan células resistentes G418 en la presencia de 200 nM de MTX durante un periodo de 2-3 semanas seguido por un incremento adicional en la concentración de MTX a 1 μM que resulta un agrupamiento de células heterogéneas amplificadas. La concentración del anticuerpo se determina mediante la proteína A analítica HPLC. Se seleccionan los mejores grupos de producción para clonación mediante dilución limitante, utilizando una densidad de siembra de 0.3 células por pozo para aislar los clones productores altos.

Ejemplo 5

Determinación de la expresión IgG humana recombinante mediante ELISA

Caracterización del VHE/humV1, VHE/humV2, VHQ/humV1 y VHQ/humV2

Para determinar las concentraciones de IgG del anticuerpo humano recombinado expresado en los sobrenadantes de cultivo, se ha desarrollado y utilizado un protocolo de ELISA de captura utilizando el IgG humano como estándar. Las placas microtituladoras de 96 pozos de fondo plano (Cat. N° 4-39454, Nunc Immunoplate Maxisorp) se recubren durante toda la noche a 4°C con 100 μl de IgG anti humano de cabra (molécula completa, Cat. N° I1011, SIGMA) a la concentración final de 0.5 $\mu g/ml$ en PBS. Los pozos son entonces lavados tres veces con un amortiguador de lavado (PBS que contiene 0.05% de Tween 20) y se bloquean durante 1.5 horas a 37°C con un amortiguador de bloqueo (0.5% de BSA en PBS). Después de tres ciclos de lavado, las muestras del anticuerpo y del IgG humano estándar (Cat. No. 14506, SIGMA) se preparan mediante dilución de 1.5 veces en serie en el amortiguador de bloqueo. Se transfieren 100 μl de las muestras diluidas o estándar en duplicado a la placa de cubierta y se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de la incubación las placas se lavan 3 veces con amortiguador de lavado y posteriormente incubadas durante 1 hora con 100 μl de cadena liviana Kapa de IgG antihumano de cabra conjugado con peroxidasa de rábano (Cat. N° A-7164, SIGMA) diluido en 1/4000 en un amortiguador de bloqueo. Los pozos de control reciben 100 μl del amortiguador de bloqueo o medio de cultivo normal concentrado. Después de lavado se efectúa la cuantificación colorimétrica de la peroxidasa unida en la muestra y los pozos estándar, utilizando el kit de TMB Peroxidase EIA Substrate (Cat. N° 172-1067, Bio-Rad) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La mezcla de peroxidasa se agrega a 100 μl por pozo y se incuba durante 30 min a temperatura ambiente en la oscuridad. La reacción colorimétrica se detiene mediante la adición de 100 μl de ácido sulfúrico 1M y la absorbancia de cada pozo se lee a 450 nm utilizando un lector de placa ELISA (Modelo 3350-UV, BioRad).

Con un coeficiente de correlación de 0.998 para la curva estándar IgG, se determinan las siguientes concentraciones para los cuatro diferentes concentrados de cultivo (ca. 250-300 veces concentrado) obtenido de las células COS transfectadas:

Sobrenadante VHE/humV1 = 8.26 $\mu g/ml$

Sobrenadante VHE/humV2 = 6.27 $\mu g/ml$

Sobrenadante VHQ/humV1 = 5.3 $\mu g/ml$

Sobrenadante VHQ/humV2 = 5.56 $\mu g/ml$

Análisis de cromatografía de exclusión de tamaño (SEC)

Los anticuerpos purificados por afinidad VHE/humV1, VHE/humV2, VHQ/humV1 y VHQ/humV2 se analizan mediante cromatografía de exclusión de tamaño (SEC) sobre un TSK gel Super SW3000SWXL con el fin de determinar el contenido de proteína, el porcentaje de agregados pequeños (anticuerpos oligoméricos) así como también subproductos posibles y productos de degradación. Los cromatogramas muestran VHE/humV1, VHE/humV2, VHQ/humV1 y VHQ/humV2 cuyo pico principal se divide y que la separación es más pronunciada para grupos con cadena pesada (figura 12). Los resultados sugieren que existen al menos dos moléculas con un tiempo retención típico para un anticuerpo IgG presente en cada muestra.

Condiciones de reducción bajo SDS-PAGE

El análisis de las moléculas de unión CD45RO/RB humanizadas VHE/humV1, VHE/humV2, VHQ/humV1 y VHQ/humV2 mediante SDS-PAGE bajo condiciones reductoras (gel de gradiente, 4 a 20% de gel Tris-Glicina, Novex) muestran la presencia de una banda adicional no esperada, que migra ligeramente por encima de la banda que corresponde a la banda de cadena pesada en cada muestra.

La diferencia en masa se estimula por estar en el rango de 2 a 4 kDa. El análisis “Western Blot” revela que la banda superior se reconoce por los anticuerpos antihumanos (H + L) que sugieren que la banda adicional es una variante de la cadena pesada.

Cromatografía de intercambio de catión (CEX)

La heterogeneidad de la carga se evalúa mediante la cromatografía de intercambio de cationes (CEX) utilizando una columna polyCatA (PolyLC Inc). Mientras el mAb quimérico está esencialmente libre de heterogeneidad de carga diferente de las variantes de lisina CE-terminales, todas las moléculas de unión CD45RO/RB humanizadas, es decir VHE/humV1, VHE/humV2, VHQ/humV1 y VHQ/humV2, se consideran muy heterogéneas en carga. Una razón común para la heterogeneidad de carga en los anticuerpos en la presencia/ausencia de Lys en el extremo C-terminal de la cadena pesada de un anticuerpo que resulta en tres picos CEX. El alto número de picos visibles en cada cromatograma (>10; figura 13) indica que al menos está presente una modificación adicional en todas las cuatro moléculas de CD45RO/RB.

SDS-PAGE

Con el fin de evaluar las diferencias moleculares entre las dos especies de anticuerpos encontradas en los grupos de proteínas del VHE/humV1, VHE/humV2, VHQ/humV1 y VHQ/humV2, se selecciona para ser adicionalmente analizado. Los dos picos SEC del VHE/humV2 se recolectan en un modo semipreparativo y se reanalizan mediante SEC para confirmar su pureza. Las fracciones recolectadas mediante SEC (Fracción 1 y Fracción 2) luego se analizan mediante SDS-PAGE bajo condiciones reductoras. La proporción de la banda adicional no esperada en aproximadamente 49 kDa es diferente entre las dos fracciones, fracción dos es casi libre de esta banda mayor adicional.

Espectrometría de masa ESI-Q-TOF

Las fracciones SEC F1, F2 y el grupo de proteínas del VHE/humV2 luego se analizan adicionalmente mediante espectrometría de masa ESI-Q-TOF. En los espectrogramas de la agrupación de proteínas y la Fracción 2, se observan los mismos grupos de señales. El primer grupo de señales a aproximadamente 148.000 Da, se encuentra en el grupo de proteínas y la Fracción 2, no se detecta en la fracción 1. En la Fracción 1 un segundo grupo de señales (aproximadamente 150.300 Da) se detectan además de otro grupo de señales aproximadamente 152'500 Da. El segundo grupo de señales aproximadamente 150.320 Da podría no estar correlacionado con ningunas formas de anticuerpo usualmente observadas. Estos hallazgos sugieren que los dos picos del SEC y las dos bandas superiores del SDS-PAGE reducido corresponden cada una a variantes de una proteína esperada.

Cromatografía de fase inversa

Para obtener un patrón menos confiable en espectrometría de masa, las cadenas del anticuerpo se analizan adicionalmente de manera separada. Las fracciones se reducen y alquilan. Con el fin de confirmar la terminación de las reacciones las muestras reducidas y alquiladas se analizan mediante cromatografía de fase inversa (RP) (Sorbax, Poroshell 300SB-C8). Después de la reducción y la alquilación, la forma del pico es casi la misma que después de solo la reducción. Se observa un cambio en el tiempo de retención. Se obtienen patrones similares para la Fracción 1 y la Fracción 2 del SEC reducido y de las muestras alquiladas. La muestra del agrupamiento VHE/humV2, Fracción 1 SEC y Fracción 2 SEC (reducida y alquilada) se analiza con espectrometría de masa ESI-Q-TOF. Varios picos de masa se podrían asignar a formas de anticuerpo esperadas. La mayor muestra de picos se encontró en todas las tres muestras (grupo de proteínas F1 y F2) pero sus intensidades en la Fracción 2 son muy bajas (figura 14).

Análisis de carbohidratos de las variantes de cadena pesada

El anticuerpo reducido y alquilado se inyecta sobre columna de cromatografía de fase inversa (RP) y se recolectan los dos picos que corresponden a las variantes de cadena pesada. Luego se determinan los perfiles de oligosacáridos de estos anticuerpos fraccionados RP. Entre los residuos de oligosacáridos G0 y G1 anticipados encontrados en todas las muestras, varios otros picos se detectan en el cromatograma del Fracción 1 (rastros de aquellos picos también son detectables en los cromatogramas de la Fracción 2 y agrupamientos de proteínas).

Tomados juntos, los resultados sugieren que las especies de anticuerpo mayor que contienen glucosilación adicional, típicamente no encontrados en anticuerpos monoclonales expresados SP2/0, que cuentan para la diferencia de masa. En razón a que la glucosilación compleja larga encontrada mediante análisis de carbohidrato y espectrometría de masa sería muy improbable para el sitio de glucosilación conservado en la región constante del anticuerpo, se hace

una búsqueda para otros sitios posible en la secuencia de aminoácido de los anticuerpos humanizados. Se identifica un sitio de proteína (N73) para N-glucosilación (N-X-S) en el dominio de variable de las dos variantes de cadena pesada.

5 *Fraccionamiento preparativo mediante CEX*

Se efectúan análisis adicionales utilizando material purificado del agrupamiento VHE/humV1. Para reducir la heterogeneidad del material, la lisina -terminal-C removida mediante tratamiento con carboxipeptidasa B. El anticuerpo VHE/humV1 se fracciona mediante cromatografía de intercambio de catión preparativo utilizando SP Sefarosa (Pharmacia). La columna se equilibra con 25 mM de fosfato de sodio, pH 6.0 (= amortiguador A) y la proteína unida se eluye con 250 mM de NaCl en el amortiguador A (= amortiguador B; gradiente de 0-65% B). La pureza de las fracciones se analiza al utilizarse CEX. Las fracciones recolectadas se reinyectan sobre la columna SEC para buscar una correlación entre los resultados obtenidos con las dos técnicas. El cromatograma indica que el primer grupo de picos CEX se correlaciona con el pre-pico en el análisis SEC del anticuerpo, que el segundo grupo de picos en CEX conduce junto con el primer pico de análisis SEC del agrupamiento de proteínas (o Fracción 1), y que el último pico en CEX eluye el último pico en SEC (o Fracción 2).

En conclusión, los resultados descritos anteriormente (perfil de oligosacárido para las Fracciones SEC 1 y 2, patrón CEX obtenido después de descarboxilación, patrón SEC obtenido para las fracciones recolectadas en CEX, espectrometría de masa) sugiere fuertemente la presencia de especies de anticuerpo con oligosacáridos complejos que originan a) heterogeneidad de masa, que conduce a un doble pico en el SEC y b) la banda de cadena pesada doble observada en heterogeneidad de carga SDS-PAGE que conduce al patrón CEX.

25 *Caracterización analítica de las fracciones CEX*

En razón a que las mayores especies de anticuerpo eluyen tempranamente sobre el CEX, que muestra que ellos son menos posiblemente cargados, la presencia de ácido siálico (un componente de la glucosilación de complejo y negativamente cargada) se mide en las fracciones diferentes obtenidas mediante CEX preparativos. El ácido siálico está presente en todas las 4 muestras con grados variantes. El ácido siálico encontrado es más probablemente la forma ácida de N-glicolil-neuramínico (con base en el tiempo de retención más corto comparado con el estándar ácido de N-acetilneuramínico). La muy baja presencia del ácido siálico en una Fracción CEX en contraste a su muy alta abundancia en otra Fracción CEX sugiere fuertemente que el componente de azúcar negativamente cargado contribuye a la heterogeneidad de masa/carga. Las Fracciones CEX se analizan mediante espectrometría de masa ESI-Q-TOF.

35 *SDS-PAGE*

Las mismas fracciones también se analizan mediante SDS-PAGE bajo condiciones reductoras. Se pueden concluir que la banda de la cadena pesada superior corresponde a la porción del anticuerpo con un perfil de oligosacárido complejo que contiene el ácido siálico. La banda de cadena pesada inferior corresponde al anticuerpo esperado que exhibe un perfil oligosacárido convencional.

Separación de la columna Mono-S de las fracciones CEX digeridas con papaína

Con el fin de confirmar el uso del sitio de glucosilación potencial en el dominio de variable la cadena pesada, alrededor de 1 mg de cada Fracción CEX se trata con papaína para separar la parte Fab de la parte Fc del anticuerpo. La cromatografía preparativa se efectúa sobre una columna Mono-S. Cada una de la sub-Fracción recolectada se reinyecta sobre la columna RP para identificar sus contenidos en términos de los dominios Fab y/o Fc. Cada una de la sub-Fracción recolectada luego se analiza con espectrometría de masa ESIQ-TOF. Los resultados obtenidos muestra que a) el sitio de glucosilación conservado en la parte Fc de la cadena pesada está ocupado por formas de oligosacárido bi-antennarias con ninguna (G0), una (G1) o dos unidades de galatosa terminal (G2); b) que encontrarse, el sitio de glucosilación irregular (N73) lleva oligosacáridos complejos que contienen ácido N-glicolil neuramínico.

En conclusión, el residuo de asparagina N73 en el dominio variable de la cadena pesada se encontró que era parcialmente N-glucosilado. Estas especies de azúcar originan heterogeneidad de masa así como también heterogeneidad de carga que son detectadas por la cromatografía de exclusión de tamaño SDS-PAGE, y la cromatografía de intercambio de catión.

60 *Caracterización del VHE-N73D/humV1*

Con el fin de eliminar la heterogenicidad de los anticuerpos VHE/humV1, VHE/humV2, VHQ/humV1 y VHQ/humV2 humanizados el residuo de asparagina en la posición N73 en el dominio variable de la cadena pesada se sustituye por un residuo de ácido aspártico (ver ejemplo 4). El VHE-N73D/humV1 luego se analiza adicionalmente.

Análisis de cromatografía de Exclusión de tamaño (SEC)

El SEC se efectúa como se describió anteriormente. Una diferencia clara entre el VHE/humV1 y VHE-N73D/humV1 se observa en SEC. En contraste con el pico doble obtenido del VHE/humV1, solamente se obtiene un pico para el VHE-N73D/humV1 (Figura 12). Aproximadamente se cuantifican 0.2% de agregados mediante SEC.

SDS-PAGE bajo condiciones reductoras

El VHE/humV2 y VHE-N73D/humV1 se analizan adicionalmente mediante SDS-PAGE bajo condiciones reductoras como se subrayó anteriormente. Solo es visible una banda para el VHE-N73D/humV1 en la posición de cadena pesada esperada (HC) (aproximadamente 50 kDa). La banda HC observada para el VHE-N73D/humV1 corresponde a la banda inferior del doblete observado para el VHE/humV2. La posición de la banda de cadena liviana es la misma para la proteína analizada.

Cromatografía de Intercambio de Catión (CEX)

La cromatografía de intercambio de catión (CEX) se efectúa como se subrayó anteriormente. Los resultados obtenidos para el análisis CEX muestran que la heterogeneidad de carga del VHE-N73D/humV1 se reduce a las variantes de Lisina C-terminal (tres picos) comparadas con la heterogeneidad de carga alta del VHE/humV2 (>10; Figura 13).

Análisis MALDI TOF (espectrometría de masa)

La masa detectada para la cadena pesada y la cadena liviana obtenida mediante análisis MALDI TOF (espectrometría de masa) están en acuerdo cercano con la masa esperada, deducida de la secuencia de aminoácidos del VHE-N73D/humV1.

Cromatografía de Fase Inversa (RP)

Después de la reducción con DDT los dos anticuerpos humanizados VHE/humV2 y VHE-N73D/humV1 se analizan mediante cromatografía de fase inversa (RP). Debido a la glucosilación parcial sobre la asparagina N73, dos “cadenas pesadas” se observan para el VHE/humV2 (doble pico en aproximadamente 18.5 min) entre el pico que corresponde a la cadena liviana (a aproximadamente 17.3 min). Para VHE-N73D/humV1, solo se observa un pico para la cadena pesada (Figura 14).

Ejemplo 6

Análisis de competición FACS (afinidad de unión)

La estirpe de células T humana PEER se escoge como la célula objetivo para el análisis FACS porque ésta expresa el antígeno CD45 sobre su superficie celular. Para analizar la afinidad de unión de los sobrenadantes del anticuerpo humanizado, se efectúan los experimentos de competición que utilizan el anticuerpo quimérico marcado FITC como una referencia y se comparan con la inhibición del anticuerpo de ratón purificado y el anticuerpo quimérico. Los cultivos de células PEER se centrifugan durante 10 segundos a 3000 rpm y el medio se remueve. Las células son resuspendidas en amortiguador FACS (PBS que contiene 1% de FBS y 0.1% de azida sodio) y se siembra en una placa microtituladora con fondo redondo de 96-pozos a una densidad de célula de 1×10^5 células por pozo. La placa se centrifuga y se descarta el sobrenadante. Para estudio de bloqueo, 25 μ l de medio no transfectado concentrado o anticuerpo de control ajustado de isotipo (control negativo), anticuerpo de ratón no marcado, o anticuerpo quimérico (control positivo) así como también sobrenadantes concentrados que contienen las varias combinaciones del anticuerpo humanizado (muestra), se agrega primero en cada pozo a las concentraciones indicadas en el texto. Después de 1 hora de incubación a 4°C, las células PEER se lavan con 200 μ l de amortiguador FACS mediante centrifugación. Las células son posteriormente incubadas durante 1 hora a 4°C con anticuerpo quimérico conjugado con FITC en 25 μ l de amortiguador FACS a una concentración final de 20 μ g/ml. Las células se lavan y se re-suspenden en 300 μ l de amortiguador de FACS que contiene 2 μ g/ml de yoduro de propidio el cual permite la regulación de las células viables. Las preparaciones de células se analizan sobre un citómetro de flujo (FACSCalibur, Becton Dickinson).

Los análisis FACS indican un bloque dependiente de dosis de anticuerpo quimérico marcado con fluorocromo por los sobrenadantes del cultivo de anticuerpo humanizado concentrado. No se ve un bloque dependiente de dosis de la unión del anticuerpo quimérico con el anticuerpo de control ajustado con isotipo, que indica que el efecto de bloqueo por las diferentes combinaciones del anticuerpo humanizado es específico del epítipo y que la especificidad del epítipo parece ser retenida después del proceso de humanización.

El sobrenadante no diluido de los transfectantes SP2/0 anteriormente mencionados o el anticuerpo quimérico (controles positivos) o isotipo o el anticuerpo de control ajustado con isotipo (controles negativos) a 2 μ g/ml en medio de cultivo se incuban con 1.5×10^5 de célula PEER en 100 μ l durante 30 min a 4°C. Luego, 100 μ l de PBS que contienen el anticuerpo quimérico marcado con FITC se agregan a cada muestra y la incubación a 4°C continúa durante otros 30 minutos. Después del lavado, las células se resuspenden en FACS-PBS que contiene 1 μ g/ml de 7-Amino-Actinomicina

ES 2 341 341 T3

D y se analizan mediante citometría de flujo utilizando un instrumento FACSCalibur Becton Dickinson y el software CellQuest Pro. La regulación es sobre células vivas, es decir evento 7-Amino-Actinomicina D - negativo.

Los análisis FACS muestran que las moléculas de unión CD45RB/RO humanizadas no marcadas, por ejemplo VHE/humV1 y VHQ/humV1 pero no el anticuerpo de control ajustado con isotipo compiten con el anticuerpo quimérico marcado con FITC para unir a la estirpe de células T positiva CD45 humana PEER.

Especificidad del VHE-N73D/humV1

Para evaluar si la modificación de la molécula de unión CD45R0/RB humanizada VHE/humV1, es decir el intercambio de la asparagina a aspartato en la posición 73 de aminoácido de la cadena pesada de la molécula de unión CD45R0/RB, modificada la reactividad con el epítipo consanguíneo, la reactividad del VHE N73D/humV1 con una estirpe de células T humana que expresa CD45 de PEER se analiza en un experimento de unión de competición.

Las células PEER se incuban con VHE-N73D/humV1, con su predecesor quimérico o con un anticuerpo IgG1 de control de isotipo de no unión. El anticuerpo no unido se lava y las células se someten a una incubación con anti-CD45R0/RB quimérico marcado con fluorocromo fluoresceína isotiocianato (FITC) o el anticuerpo de control IgG1 del isotipo marcado con FITC. Después de lavado, las células se someten a análisis de citometría de flujo para cuantificar la cantidad de anticuerpo marcado con FITC unido a la célula PEER pre-incubadas: los cultivos de célula PEER se centrifugan durante 10 min a 400 veces la fuerza de gravedad estándar (g) y el medio se remueve. Las células se resuspenden en amortiguador de FACS (PBS que contiene 1% v/v de FBS, 0.1 v/v de EDTA y 0.1% v/v de azida de sodio) y se siembra en placas microtituladoras de fondo en V de 96 pozos a una densidad celular de 1×10^5 células por pozo. La placa se centrifuga y se descarta el sobrenadante. Cada muestra de las células se incuba durante 30 minutos a 4°C en 50 μ l de amortiguador FACS que contiene 20 μ g/ml de anti-CD45R0/RB mAb, VHE-N73D/humV1 o el control IgG1 Ab quimérico. Luego, las células PEER se lavan dos veces con 150 μ l de amortiguador FACS mediante centrifugación. Las células se incuban posteriormente durante 30 minutos a 4°C en 50 μ l de amortiguador FACS que contiene 20 μ g/ml del mAb quimérico conjugado con FITC o del control Ab 3G5 conjugado con FITC. Finalmente, las células se lavan y se resuspenden en 200 μ l de amortiguador FACS que contiene 7-amino Actinomicina D (7-AAD) a 1 μ g/ml, que sigue la identificación de las células viables durante análisis. La preparación de la célula se analiza sobre un Citometría de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson).

Se observa que el VHE-N73D/humV1 no marcado y el anti-CD45R0/RB mAb quimérico no marcado pero no el anticuerpo de control IgG1 evitan que se unieran el anti-CD45R0/RB mAb quimérico marcado con FITC a las células PEER que expresan CD45 tal como se determina por una señal de fluorescencia disminuida. En conclusión, se encontró que la modificación del anticuerpo VHE/humV1 al VHE-N73D/humV1 no cambia la especificidad del epítipo de la molécula de unión anti-CD45R0/RB humanizada.

Afinidad del VHE-N73D/humV1 por CD45 humano o de macaco

Para determinar la afinidad del anticuerpo VHE-N73D/humV1 por su epítipo, la reactividad del VHE-N73D/humV1 con una estirpe de células T que expresa CD45 humano PEER o la estirpe de células T que expresa CD45 del macaco HSC-F se pueden cuantificar en un experimento de unión de competición, similar al procedimiento descrito en Daley *et al.*, 1995; J. Mol. Biol. 253:243.

En resumen, la intensidad de tñido del PEER o las células HSC-F con un anticuerpo marcado con FITC en la presencia de varias concentraciones del anticuerpo competidor no marcado de utiliza para calcular las afinidades de los anticuerpos no marcados. Más precisamente, en una primera etapa, se mide la concentración y la estequiometría que marca el fluorocromo del anticuerpo CD45RB/RO anti-humano derivado de ratón marcado con FITC A6 (mA6). Luego, la concentración de la molécula objetivo, CD45, sobre la superficie del PEER o la estirpe celular HSC-F se determina con la ayuda del anticuerpo mA6 conjugado con FITC anteriormente mencionado (anti-huCD45 derivado de ratón) y utilizando glóbulo fluorescentes con un grado de marcación molecular conocido. Con la concentración de los receptores CD45 celulares y su ligando conjugado a FITC conocido, la afinidad del mA6 conjugado al FITC a los receptores CD45 celulares se determina mediante un procedimiento de titulación de equilibrio a base de FACS. Finalmente, la afinidad del anticuerpo no marcado VHE-N73D/humV1 se determina de las reacciones de tñido de competición con el mA6 conjugado a FITC sobre PEER o las células HSC-F que miden el incremento en la fluorescencia del FITC como una función de la concentración total del VHE-N73D/humV1. Si la ecuación cúbica que representa la descripción algebraicamente explícita de equilibrios de unión en una mezcla de dos ligandos de competición que se unen a un receptor se implementa en el programa Origin 7.5, el programa de software se utiliza para calcular el valor de constante de disociación (Kd) para el VHE-N73D/humV1 luego de los análisis de ajuste de la curva reiterativa.

En un experimento la constante de disociación del VHE-N73D/humV1 para el objetivo celular PEER humano se calcula como 2.44 ± 0.07 nM - para el objetivo de las células HSC-F macaco se calcula como 1.67 ± 0.00 nM, asumiendo la unión del anticuerpo divalente a las moléculas CD45R0/RB objetivo.

Ejemplo 7

Actividades Biológica de las moléculas de unión CD45RB/RO

- 5 En este estudio, hemos considerado si el anticuerpo quimérico de unión CD45RB/RO, cuando está presente en los cultivos de las células T humanas primarias policlionalmente activadas (i) soporta la diferenciación de las células T con un fenotipo Treg característico, (ii) evita o mejora la apoptosis que sigue a la activación de la célula T, y (iii) afecta la expresión de los antígenos y receptores específicos de subconjunto después de la estimulación.

10 *Anticuerpo quimérico de unión CD45RB/RO mejora la muerte celular en celular T policlionalmente activas*

- Células T primarias (mezclas de subconjuntos T de CD4⁺ y CD8⁺) se someten a activación mediante anti-CD3 más anti-CD28 mAb (200 ng/ml cada uno) en la presencia o ausencia (=control) del anticuerpo quimérico que se une a CD45RB/RO. Los anticuerpos de exceso se remueven mediante lavado en el día 2. El 7-amino-Actinomicina D (7-AAD) como un tinte de tñido de ADN tomado por las células apoptóticas y necróticas se utiliza para medir la muerte celular luego de la actividad. Los resultados muestran la activación de las células T en la presencia del anticuerpo quimérico que se une a CD45RB/RO y se incrementa la fracción de las células positivas 7-AAD que dos veces en el día 2 después de la activación. En el día 7, la porción de las células positivas 7-AAD es de nuevo similar en los cultivos tratados con anticuerpo quimérico que se une CD45RB/RO y los cultivos de control.

20 *Anticuerpo quimérico que se une a CD45RB/RO pero no las células T tratadas con mAb exhiben un fenotipo de célula regulador T (Treg)*

- La expresión incrementada de CD25 y la proteína reguladora negativa CTLA-4 (CD152) es un marcador de célula Treg. La supresión funcional de las respuestas de células T primarias y secundarias mediante el anticuerpo quimérico que se une a CD45RB/RO puede ser debido a la inducción de las células Treg. Para manejar este tema, las células T se activan mediante anti-CD3 + CD28 mAbs y cultivadas en la presencia del anticuerpo quimérico que se une a CD45RB/RO o del mAb de control unión anti-LPS. El curso de tiempo de la expresión CTLA-4 y CD25 revela diferencias marcadas entre los controles y las células T tratadas con anticuerpo quimérico que se unen a CD45RB/RO en los días 1 y 3 después de la estimulación secundaria, que indica un fenotipo Treg.

La expresión CTLA-4 intracelular se sostiene en la presencia del anticuerpo quimérico que se une a CD45RB/RO

- Se ha reportado que cantidades sustanciales de CTLA-4 también se pueden encontrar intracelularmente. Por lo tanto, en paralelo al tñido con el CTLA-4 de superficie, se analiza la expresión CTLA-4 intracelular. Se ven diferencias moderadas entre los cultivos de célula T en el día 4 después de la estimulación. Después de un cultivo prolongado, sin embargo, altos niveles de CTLA-4 intracelular se sostienen solamente en las células T tratadas con anticuerpo quimérico que se une a CD45RB/RO pero no a las células T de control.

40 *Células T tratadas con anticuerpo quimérico CD45RB/RO se convierten en positivas dobles CD4 y CD8*

- Luego de la estimulación, las células T inducen y regulan en forma ascendente la expresión de varios receptores de superficie, tal como el CD25, CD152 (CTLA-4), CD154 (ligando CD40) y otros. En contraste, el nivel de expresión de CD4 o CD8 se cree que permanece relativamente constante. Nosotros observamos reproduciblemente un fuerte incremento tanto en el antígeno CD4 y CD8 sobre las células T tratadas con anticuerpo quimérico que se une a CD45RB/RO pero no sobre las células T tratadas con Ab de control después de activación. La emergencia de la población de la célula T positiva doble CD4/CD8 parece ser debida a la regulación en forma ascendente del CD4 sobre el subconjunto CD8⁺ y al contrario, el CD8⁺ sobre el subconjunto CD4⁺. Esto contrasta con un porcentaje moderadamente bajo de células T positivas dobles en los cultivos de control.

50 *Receptor IL-2 alto una cadena Ipha, pero muy baja expresión de cadena beta mediante las célula T tratadas con anticuerpo quimérico que unen CD45RB/RO*

- La células Treg se conocen por ser constitutivamente positivas para el CD25, la cadena alfa receptoria IL-2. La regulación de otras subunidades del receptor IL-2 trimétrico sobre las células Treg no se conoce. Recientemente hemos comparado la expresión de la cadena beta del receptor IL-2, por ejemplo CD122, sobre las células T activadas y propagadas en la presencia o ausencia del anticuerpo quimérico de unión CD45RB/RO. Los resultados muestran que las células T tratadas con anticuerpo quimérico que se une a CD45RB/RO tienen aproximadamente diez veces menos expresión de CD122 comparadas con la células T en los cultivos de control. Esta diferencia puede indicar que las celular Treg requieren otros factores que el IL-2 para proliferar.

ES 2 341 341 T3

Ejemplo 8

Secuencia de la invención (la secuencia CDR de la invención están subrayada)

5 SEQ ID NO: 1

Parte de la secuencia de aminoácido de la cadena liviana quimérica

10 DILLTQSPAILSVSPGERVSFSCRASQNIGTSIQWYQQRTNGSPRLLIRSSSESISGIPSRFSG
SGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQSNTWPFTFGSGTKLEIK

SEQ ID NO: 2

15 Parte de la secuencia de aminoácido de la cadena pesada quimérica

20 EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTNYIIHWVKQEPGQGLEWIGYFNPYNHGTKY
NEKFKGRATLTADKSSNTAYMDLSSLTSEDSAIYYCARSGPYAWFDIWGQGTITVTVSS

SEQ ID NO: 3

25 Secuencia de aminoácidos de la cadena liviana quimérica

30 DILLTQSPAILSVSPGERVSFSCRASQNIGTSIQWYQQRTNGSPRLLIRSSSESISGIPSRFSG
SGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQSNTWPFTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
GTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYE
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

35 SEQ ID NO: 4

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada quimérica

40 EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTNYIIHWVKQEPGQGLEWIGYFNPYNHGTKY
NEKFKGRATLTADKSSNTAYMDLSSLTSEDSAIYYCARSGPYAWFDITWGQGTITVTVSSAS
TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
45 SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPAEKTKSKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNOVS
50 LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

55 SEQ ID NO: 5

Secuencia de nucleótido que codifica un polipéptido de la SEQ ID NO: 1

60 GACATTCTGCTGACCCAGTCTCCAGCCATCCTGTCTGTGAGTCCAGGAGAAAGAGTCA
GTTTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAACATTGGCACAAGCATACAGTGGTATCAACAAAGA
ACAAATGGTTCTCCAAGGCTTCTCATAAGGTCTTCTCTGAGTCTATCTCTGGGATCCCT
TCCAGGTTTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACTCTTAGCATCAACAGTGTGGA
GTCTGAAGATATTGCAGATTACTGTCAACAAAGTAATACCTGGCCATTCAAGTTCGG
65 CTCGGGGACCAAGCTTGAAATCAAA

ES 2 341 341 T3

SEQ ID NO: 6

Secuencia de nucleótido que codifica un polipéptido de la SEQ ID NO: 2

5 GAGGTGCAGCTGCAGCAGTCAGGACCTGAACTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAG
ATGTCCTGCAAGGCCTCTGGATACACATTCACCTAATTATATTATCCACTGGGTGAAGCA
GGAGCCTGGTCAGGGCCTTGAATGGATTGGATATTTAATCCTTACAATCATGGTACTA
10 AGTACAATGAGAAGTTCAAAGGCAGGGCCACACTAACTGCAGACAAATCCTCCAACACA
GCCTACATGGACCTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGATCTACTACTGTGCAA
GATCAGGACCCTATGCCTGGTTTGACACCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTC
CTCA

15 SEQ ID NO: 7

Parte de la secuencia de cadena liviana humanizada designada hum V2 (humV2 = VLm)

20 DILLTQSPAT LSLSPGERAT FSCRASONIG TSIQWYQQKT NGAPRLIRS SSESISGIPS
RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SNTPFTFGQ GTKLEIK

25 SEQ ID NO: 8

Parte de la secuencia de aminoácido de cadena liviana humanizada designada hum V1 (humV1 = Vlh)

30 DILLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASONIG TSIQWYQQKP GQAPRLIRS SSESISGIPS
RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SNTPFTFGQ GTKLEIK

SEQ ID NO: 9

35 Parte de la secuencia de aminoácido de cadena pesada humanizada designada VHE

EVQLVESGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYIIHWVKQE PGQGLEWIGY
40 ENPYNHGTKY NEKFKGRATL TANKSISTAY MELSSLRSED TAVYYCARSG
PYAWFDTWGQ GTTIVTVSS

SEQ ID NO: 10

45 Parte de la secuencia de aminoácido de cadena pesada humanizada designada VHQ

QVQLVESGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYIIHWVKQE PGQGLEWIGY
50 ENPYNHGTKY NEKFKGRATL TANKSISTAY MELSSLRSED TAVYYCARSG
PYAWFDTWGQ GTTIVTVSS

SEQ ID NO: 11

55 Secuencia de nucleótido que codifica la secuencia de aminoácido SEQ ID NO: 9

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCAGGAGCCGAAGTGAAAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAG
GTGTCCTGCAAGGCCTCTGGATACACATTCACCTAATTATATTATCCACTGGGTGAAGCA
60 GGAGCCTGGTCAGGGCCTTGAATGGATTGGATATTTAATCCTTACAATCATGGTACTA
AGTACAATGAGAAGTTCAAAGGCAGGGCCACACTAACTGCAAAACAAATCCATCAGCACA
GCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGCGCTCTGAGGACACTGCGGTCTACTACTGTGCAA
GATCAGGACCCTATGCCTGGTTTGACACCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTC
65 CTCA

ES 2 341 341 T3

SEQ ID NO: 12

Secuencia de nucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 10

5 CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCAGGAGCCGAAGTGAAAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAG
GTGTCCTGCAAGGCCTCTGGATACACATTCACTAATTATATTATCCACTGGGTGAAGCA
GGAGCCTGGTCAGGGCCTTGAATGGATTGGATATTTAATCCTTACAATCATGGTACTA
10 AGTACAATGAGAAGTTCAAAGGCAGGGCCACACTAACTGCAAACAAATCCATCAGCACA
GCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGCGCTCTGAGGACACTGCGGTCTACTACTGTGCAA
GATCAGGACCCTATGCCTGGTTTGACACCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTC
CTCA

15

SEQ ID NO: 13

Secuencia de nucleótido que codifica la secuencia de aminoácido SEQ ID NO: 7

20 GACATTCTGCTGACCCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTCTGAGTCCAGGAGAAAGAGCCA
CTTTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAACATTGGCACAAGCATACAGTGGTATCAACAAAAA
25 ACAAATGGTGCTCCAAGGCTTCTCATAAGGTCTTCTTCTGAGTCTATCTCTGGGATCCC
TTCCAGGTTTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACTCTTACCATCAGCAGTCTGG
AGCCTGAAGATTTTGAGTGTATTACTGTCAACAAAGTAATACCTGGCCATTACGTTT
30 GGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA

35

SEQ ID NO: 14

Secuencia de nucleótido que codifica la secuencia de aminoácido SEQ ID NO: 8

40 GACATTCTGCTGACCCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTCTGAGTCCAGGAGAAAGAGCCA
CTCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAACATTGGCACAAGCATACAGTGGTATCAACAAAAA
CCAGGTCAGGCTCCAAGGCTTCTCATAAGGTCTTCTTCTGAGTCTATCTCTGGGATCCC
45 TTCCAGGTTTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACTCTTACCATCAGCAGTCTGG
AGCCTGAAGATTTTGAGTGTATTACTGTCAACAAAGTAATACCTGGCCATTACGTTT
50 GGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA

55

60

65

70

ES 2 341 341 T3

SEQ ID NO: 15

Secuencia de nucleótido del vector de expresión HCMV-G1 HuA6-VHQ (secuencia de ADN completa de un vector de expresión de cadena pesada humanizada que comprende la SEQ ID NO: 12 (VHQ) de 3921-4274)

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

```

1  AGCTTTTTCG AAAAGCCTAG GCCTCCAAAA AAGCCTCCTC ACTACTTCTG
51 GAATAGCTCA GAGGCCGAGG CGGCCTCGGC CTCTGCATAA ATAAAAAAAA
101 TTAGTCAGCC ATGGGGCGGA GAATGGGCGG AACTGGGCGG AGTTAGGGGC
151 GGGATGGGCG GAGTTAGGGG CGGGACTATG GTTGCTGACT AATTGAGATG
201 CATGCTTTGC ATACTTCTGC CTGCTGGGGA GCCTGGTTGC TGACTAATTG
251 AGATGCATGC TTTGCATACT TCTGCCTGCT GGGGAGCCTG GGGACTTTCC
301 ACACCCTAAC TGACACACAT TCCACAGCTG CCTCGCGCGT TTCGGTGATG
351 ACGGTGAAAA CCTCTGACAC ATGCAGCTCC CGGAGACGGT CACAGCTTGT
401 CTGTAAGCGG ATGCCGGGAG CAGACAAGCC CGTCAGGGCG CGTCAGCGGG
451 TGTTCGGCGG TGTCCGGGCG CAGCCATGAC CCAGTCACGT AGCGATAGCG
501 GAGTGTATAC TGGCTTAACT ATGCGGCATC AGAGCAGATT GTACTGAGAG
551 TGCACCATAT GCGGTGTGAA ATACCGCACA GATGCGTAAG GAGAAAATAC
601 CGCATCAGGC GCTCTTCCGC TTCCTCGCTC ACTGACTCGC TCGGCTCGGT
651 CGTTCGGCTG CGGCGAGCGG TATCAGCTCA CTCAAAGGCG GTAATACGGT
701 TATCCACAGA ATCAGGGGAT AACGCAGGAA AGAACATGTG AGCAAAAGGC
751 CAGCAAAAGG CCAGGAACCG TAAAAAGGCC GCGTTGCTGG CGTTTTTCCA
801 TAGGCTCCGC CCCCTGACG AGCATCACA AAATCGACGC TCAAGTCAGA
851 GGTGGCGAAA CCGACAGGA CTATAAAGAT ACCAGGCGTT TCCCCCTGGA
901 AGCTCCCTCG TCGCTCTCC GTTCCGACC CTGCCGCTTA CCGGATACCT
951 GTCCGCCTTT CTCCCTTCGG GAAGCGTGGC GCTTTCTCAT AGCTCACGCT
1001 GTAGGTATCT CAGTTCGGTG TAGGTCGTTT GCTCCAAGCT GGGCTGTGTG
1051 CACGAACCCC CCGTTCAGCC CGACCGCTGC GCCTTATCCG GTAACTATCG
1101 TCTTGAGTCC AACC CGGTAA GACACGACTT ATCGCCACTG GCAGCAGCCA
1151 CTGGTAACAG GATTAGCAGA GCGAGGTATG TAGGCGGTGC TACAGAGTTC
1201 TTGAAGTGGT GGCCTAACTA CGCTTACACT AGAAGGACAG TATTTGGTAT
1251 CTGCGCTCTG CTGAAGCCAG TTACCTTCGG AAAAAGAGTT GGTAGCTCTT
1301 GATCCGGCAA ACAACCACC GCTGGTAGCG GTGGTTTTTT TGTTCGCAAG

```

ES 2 341 341 T3

1351 CAGCAGATTA CGCGCAGAAA AAAAGGATCT CAAGAAGATC CTTTGATCTT
 1401 TTCTACGGGG TCTGACGCTC AGTGGAAACGA AAACTCACGT TAAGGGATTT
 5 1451 TGGTCATGAG ATTATCAAAA AGGATCTTCA CCTAGATCCT TTTAAATTAA
 1501 AAATGAAGTT TTAAATCAAT CTAAAGTATA TATGAGTAAA CTTGGTCTGA
 1551 CAGTTACCAA TGCTTAATCA GTGAGGCACC TATCTCAGCG ATCTGTCTAT
 10 1601 TTCGTTTCATC CATAGTTGCC TGACTCCCCG TCGTGTAGAT AACTACGATA
 1651 CGGGAGGGCT TACCATCTGG CCCCAGTGCT GCAATGATAC CGCGAGACCC
 1701 ACGCTCACCG GCTCCAGATT TATCAGCAAT AAACCAGCCA GCCGGAAGGG
 15 1751 CCGAGCGCAG AAGTGGTCCT GCAACTTTAT CCGCCTCCAT CCAGTCTATT
 1801 AATTGTTGCC GGGAAGCTAG AGTAAGTAGT TCGCCAGTTA ATAGTTTGCG
 1851 CAACGTTGTT GCCATTGCTG CAGGCATCGT GGTGTCACGC TCGTCGTTTG
 20 1901 GTATGGCTTC ATTCAGCTCC GGTTCCCAAC GATCAAGGCG AGTTACATGA
 1951 TCCCCCATGT TGTGCAAAAA AGCGGTTAGC TCCTTCGGTC CTCCGATCGT
 2001 TGTCAGAAAGT AAGTTGGCCG CAGTGTATC ACTCATGGTT ATGGCAGCAC
 25 2051 TGCATAATTC TCTTACTGTC ATGCCATCCG TAAGATGCTT TTCTGTGACT
 2101 GGTGAGTACT CAACCAAGTC ATTCTGAGAA TAGTGTATGC GCGACCCGAG
 2151 TTGCTCTTGC CCGGCGTCAA CACGGGATAA TACCGCGCCA CATAGCAGAA
 30 2201 CTTTAAAAGT GCTCATCATT GGAAAACGTT CTTGCGGGCG AAAACTCTCA
 2251 AGGATCTTAC CGCTGTTGAG ATCCAGTTGG ATGTAACCCA CTCGTGCACC
 2301 CAACTGATCT TCAGCATCTT TTACTTTTAC CAGCGTTTCT GGGTGAGCAA
 35 2351 AAACAGGAAG GCAAAATGCC GCAAAAAAGG GAATAAGGGC GACACGGAAA
 2401 TGTTGAATAC TCATACTCTT CTTTTTTCAA TATTATFGAA GCATTTATCA
 2451 GGGTTATTGT CTCATGAGCG GATACATAAT TGAATGTATT TAGAAAAATA
 40 2501 AACAAATAGG GGTTCCGGCG ACATTTCCCC GAAAAGTGCC ACCTGACGTC
 2551 TAAGAAACCA TTATTATCAT GACATTAACC TATAAAAATA GGGGTATCAC
 2601 GAGGCCCTTT CGTCTTCAAG AATTGAGCTT GGCTGCAGTG AATAATAAAA
 45 2651 TGTGTGTTTG TCCGAAATAC GCGTTTTGAG ATTTCTGTGG CCGACTAAAT
 2701 TCATGTGCGG CGATAGTGGT GTTTATCGCC GATAGAGATG GCGATATTGG
 2751 AAAAAATCGAT ATTTGAAAAT ATGGCATATT GAAAATGTGG CCGATGTGAG
 50 2801 TTTCTGTGTA ACTGATATCG CCATTTTTC AAAAGTGATT TTTGGGCATA
 2851 CGCGATATCT GGCGATAGCG CTTATATCGT TTACGGGGGA TGGCGATAGA
 55 2901 CGACTTTGGT GACTTGGGCG ATTCTGTGTG TCGCAAATAT CGCAGTTTCG
 2951 ATATAGGTGA CAGACGATAT GAGGCTATAT CGCCGATAGA GGCGACATCA
 3001 AGCTGGCACA TGGCCAATGC ATATCGATCT ATACATTGAA TCAATATTGG
 60 3051 CCATTAGCCA TATTATTGAT TGGTTATATA GCATAAATCA ATATTGGCTA
 3101 TTGGCCATTG CATACGTTGT ATCCATATCA TAATATGTAC ATTTATATTG
 3151 GCTCATGTCC AACATTACCG CCATGTTGAC ATTGATTATT GACTAGTTAT

65

ES 2 341 341 T3

3201 TAATAGTAAT CAATTACGGG GTCATTAGTT CATAGCCCAT ATATGGAGTT
 3251 CCGCGTTACA TAACTTACGG TAAATGGCCC GCCTGGCTGA CCGCCCAACG
 5 3301 ACCCCCGCCC ATTGACGTCA ATAATGACGT ATGTTCCCAT AGTAACGCCA
 3351 ATAGGGACTT TCCATTGACG TCAATGGGTG GAGTATTTAC GGTAAACTGC
 3401 CCACTTGGCA GTACATCAAG TGTATCATAT GCCAAGTACG CCCCTATTG
 10 3451 ACGTCAATGA CGGTAAATGG CCCGCCTGGC ATTATGCCCA GTACATGACC
 3501 TTATGGGACT TTCCTACTTG GCAGTACATC TACGTATTAG TCATCGCTAT
 3551 TACCATGGTG ATGCCGTTTT GGCAGTACAT CAATGGGCGT GGATAGCGGT
 15 3601 TTGACTCACG GGGATTTCCTA AGTCTCCACC CCATTGACGT CAATGGGAGT
 3651 TTGTTTTGGC ACCAAAATCA ACGGGACTTT CCAAAATGTC GTAACAACTC
 3701 CGCCCCATTG ACGCAAATGG GCGGTAGGCG TGTACGGTGG GAGGTCTATA
 20 3751 TAAGCAGAGC TCGTTTAGTG AACCGTCAGA TCGCCTGGAG ACGCCATCCA
 3801 CGCTGTTTTG ACCTCCATAG AAGACACCGG GACCGATCCA GCCTCCGCAA
 3851 GCTTGCCGCC ACCATGGACT GGACCTGGAG GGTGTTCTGC CTGCTGGCCG
 25 3901 TGGCCCCCGG CGCCACAGC CAGGTGCAGC TGGTGGAGTC AGGAGCCGAA
 3951 GTGAAAAAGC CTGGGGCTTC AGTGAAGGTG TCCTGCAAGG CCTCTGGATA
 4001 CACATTCACT AATTATATTA TCCACTGGGT GAAGCAGGAG CCTGGTCAGG
 30 4051 GCCTTGAATG GATTGGATAT TTTAATCCIT ACAATCATGG TACTAAGTAC
 4101 AATGAGAAGT TCAAAGGCAG GGCCACACTA ACTGCAAACA AATCCATCAG
 4151 CACAGCCTAC ATGGAGCTCA GCAGCCTGCG CTCTGAGGAC ACTGCGGTCT
 35 4201 ACTACTGTGC AAGATCAGGA CCCTATGCCT GGTTTGACAC CTGGGGCCAA
 4251 GGGACCACGG TCACCGTCTC CTCAGGTGAG TTCTAGAAGG ATCCCAAGCT
 4301 AGCTTTCTGG GGCAGCCAG GCCTGACCTT GGCTTTGGGG CAGGGAGGGG
 40 4351 GCTAAGGTGA GGCAGGTGGC GCCAGCCAGG TGCACACCCA ATGCCCATGA
 4401 GCCCAGACAC TGGACGCTGA ACCTCGOGGA CAGTTAAGAA CCCAGGGGCC
 4451 TCTGGCCCTT GGGCCAGCT CTGTCCACCA CCGCGGTCAC ATGGCACCAC
 45 4501 CTCTCTTGCA GCCTCCACCA AGGGCCCATC GGTCTTCCCC CTGGCACCCT
 4551 CCTCCAAGAG CACCTCTGGG GGCACAGCGG CCCTGGGCTG CCTGGTCAAG
 50 4601 GACTACTTCC CCGAACCGGT GACGGTGTG TGGAACTCAG GCGCCCTGAC
 4651 CAGCGGCGTG CACACCTTCC CGGCTGTCTT ACAGTCCTCA GGACTCTACT
 4701 CCCTCAGCAG CGTGGTGACC GTGCCCTCCA GCAGCTTGGG CACCCAGACC
 55 4751 TACATCTGCA ACGTGAATCA CAAGCCCAGC AACACCAAGG TGGACAAGAA
 4801 AGTTGGTGAG AGGCCAGCAC AGGGAGGGAG GGTGTCTGCT GGAAGCCAGG
 4851 CTCAGCGCTC CTGCCTGGAC GCATCCCGGC TATGCAGCCC CAGTCCAGGG
 60 4901 CAGCAAGGCA GGCCCCGTCT GCCTCTTCAC CCGGAGGCTT CTGCCCGCCC
 4951 CACTCATGCT CAGGGAGAGG GTCTTCTGGC TTTTTCCTCA GGCTCTGGGC
 5001 AGGCACAGGC TAGGTGCCCC TAACCCAGGC CCTGCACACA AAGGGGCAGG

65

ES 2 341 341 T3

5051 TGCTGGGCTC AGACCTGCCA AGAGCCATAT CCGGGAGGAC COTGCCCCCTG
5101 ACCTAAGCCC ACCCCAAAGG CCAAACCTCTC CACTCCCTCA GCTCGGACAC
5 5151 CTTCTCTCCT CCCAGATTCC AGTAACTCCC AATCTTCTCT CTGCAGAGCC
5201 CAAATCTTGT GACAAAACCTC ACACATGCCC ACCGTGCCCCA GGTAAGCCAG
5251 CCCAGGCCCTC GCCCTCCAGC TCAAGGCGGG ACAGGTGCCC TAGAGTAGCC
10 5301 TGCATCCAGG GACAGGCCCC AGCCGGGTGC TGACAOGTCC ACCTCCATCT
5351 CTTCTCTCAGC ACCTGAACTC CTGGGGGGGAC CGTCAGTCTT CCTCTTCCCC
5401 CCAAAACCCA AGGACACCCCT CATGATCTCC CGGACCCCTG AGGTACATG
15 5451 CGTGGTGGTG GACGTGAGCC ACGAAGACCC TGAGGTCAAG TTCAACTGGT
5501 ACGTGGACGG CGTGGAGGTG CATAATGCCA AGACAAAGCC GCGGGAGGAG
5551 CAGTACAACA GCACGTACCG TGTGGTCAGC GTCTTCACCG TCCTGCACCA
20 5601 GGACTGGCTG AATGGCAAGG AGTACAAAGT CAAGGTCTCC AACAAAGCCC
5651 TCCCAGCCCC CATCGAGAAA ACCATCTCCA AAGCCAAAGG TGGGACCCGT
5701 GGGGTGCGAG GGCCACATGG ACAGAGGCCG GCTCGGCCCA CCTCTGCCC
25 5751 TGAGAGTGAC CGCTGTACCA ACCTCTGTCC CTACAGGGCA GCCCGAGAA
5801 CCACAGGTGT ACACCCTGCC CCCATCCCGG GATGAGCTGA CCAAGAACCA
5851 GGTCAGCCTG ACCTGCCTGG TCAAAGGCTT CTATCCCAGC GACATCGCCG
30 5901 TGGAGTGGGA GAGCAATGGG CAGCCGGAGA ACAACTACAA GACCACGCCCT
5951 CCCGTGCTGG ACTCCGACGG CTCCTTCTTC CTCTACAGCA AGCTCACCGT
6001 GGACAAGAGC AGGTGGCAGC AGGGGAACGT CTTCTCATGC TCGTGATGC
35 6051 ATGAGGCTCT GCACAACCAC TACACGCAGA AGAGCCTCTC CCTGTCTCCG
6101 GGTAATGAG TCGACGGCC GGCAAGCCCC CGCTCCCCGG GCTCTCGCGG
6151 TCGCACGAGG ATGCTTGGCA CGTACCCCT GTACATACTT CCGGGCGCC
40 6201 CAGCATGGAA ATAAAGCACC CAGCGCTGCC CTGGGCCCCCT GCGAGACTGT
6251 GATGGTTCTT TCCACGGGTC AGGCCGAGTC TGAGGCCTGA GTGGCATGAG
6301 ATCTGATATC ATCGATGAAT TCGAGCTCGG TACCCGGGGA TCGATCCAGA
45 6351 CATGATAAGA TACATTGATG AGTTTGGACA AACCACAACT AGAATGCAGT
6401 GAAAAAATG CTTTATTTGT GAAATTTGTG ATGCTATTCC TTTATTTGTA
6451 ACCATTATAA GCTGCAATAA ACAAGTTAAC AACAACAATT GCATTCATTT
50 6501 TATGTTTCAG GTTCAGGGGG AGGTGTGGGA GGTTTTTTAA AGCAAGTAAA
6551 ACCTCTACAA ATGTGGTATG GCTGATTATG ATCTCTAGTC AAGGCACTAT
6601 ACATCAAATA TTCCTTATTA ACCCCTTTAC AAATTAAAAA GCTAAAGGTA
55 6651 CACAATTTTT GAGCATAGTT ATTAATAGCA GACACTCTAT GCCTGTGTGG
6701 AGTAAGAAAA AACAGTATGT TATGATTATA ACTGTTATGC CTACTTATAA
6751 AGGTTACAGA ATATTTTTCC ATAATTTTCT TGTATAGCAG TGCAGCTTTT
60 6801 TCCFTTGTGG TGTAATAGC AAAGCAAGCA AGAGTTCTAT TACTAAACAC
6851 AGCATGACTC AAAAACTTA GCAATTCTGA AGGAAAGTCC TTGGGGTCTT

65

ES 2 341 341 T3

6901 CTACCTTTCT CTTCTTTTTT GGAGGAGTAG AATGTTGAGA GTCAGCAGTA
 6951 GCCTCATCAT CACTAGATGG CATTTCTTCT GAGCAAAACA GGTTTTCCTC
 5 7001 ATTAAAGGCA TTCCACCAC TCTCCCATT C ATCAGTTCCA TAGGTTGGAA
 7051 TCTAAAATAC ACAAAACAATT AGAATCAGTA GTTTAACACA TTATACACTT
 7101 AAAAATTTTA TATTTACCTT AGAGCTTTAA ATCTCTGTAG GTAGTTTGTC
 10 7151 CAATTATGTC ACACCACAGA AGTAAGGTTT C TTCACAAAG ATCCGGGACC
 7201 AAAGCGGCCA TCGTGCTCTC CCACTCCTGC AGTTCGGGGG CATGGATGCG
 7251 CGGATAGCCG CTGCTGGTTT CCTGCGATGCC GACGGATTTG CACTGCCGGT
 15 7301 AGAACTCCGC GAGGTCTCTC AGCCTCAGGC AGCAGCTGAA CCAACTCGCG
 7351 AGGGGATCGA GCGCGGGGTG GCGGAAGAAC TCCAGCATGA GATCCCCGCG
 7401 CTGGAGGATC ATCCAGCCGG CGTCCCGGAA AACGATTCCG AAGCCCAACC
 20 7451 TTTCATAGAA GGCGGCGGTG GAATCGAAAT CTCGTGATGG CAGGTTGGGC
 7501 GTCGCTTGGT CGGTCAATTC GAACCCAGAG GTCCCGCTCA GAAGAACTCG
 7551 TCAAGAAGGC GATAGAAGGC GATGCGCTGC GAATCGGGAG CCGCGATACC
 25 7601 GTAAAGCAGC AGGAAGCGGT CAGCCCATTC GCGGCCAAGC TCTTCAGCAA
 7651 TATCAGGGGT AGCCAACGCT ATGTCCTGAT AGCGGTCCGC CACACCCAGC
 7701 CGGCCACAGT CGATGAATCC AGAAAAGCGG CCATTTTCCA CCATGATATT
 30 7751 CGGCAAGCAG GCATCGCCAT GGGTCACGAC GAGATCCTCG CCGTCGGGCA
 7801 TCGCGCCCTT GAGCCTGGCG AACAGTTCTG CTGGCGCCAG CCCCTGATGC
 35 7851 TCTTCGTCCA GATCATCCTG ATCGACAAGA CCGGCTTCCA TCCGAGTACG
 7901 TGCTCGCTCG ATGCGATGTT TCGCTTGGTG GTCGAATGGG CAGGTAGCCG
 7951 GATCAAGCGT ATGCAGCCGC CGCATTGCAT CAGCCATGAT GGATACTTTC
 40 8001 TCGGCAGGAG CAAGGTGAGA TGACAGGAGA TCCTGCCCCG GCACTTCGCC
 8051 CAATAGCAGC CAGTCCCTTC CCGCTTCAGT GACAACGTCG AGCACAGCTG
 8101 CGCAAGGAAC GCGCGTCGTG GCCAGCCAGC ATAGCCGCGC TGCCTCGTCC
 45 8151 TGCAGTTCAT TCAGGGCACC GGACAGGTCG GTCTTGACAA AAAGAACCGG
 8201 GCGCCCCCTG CTTGACAGCC GGAACACGGC GGCATCAGAG CAGCCGATTG
 8251 TCTGTTGTGC CCAGTCATAG CCGAATAGCC TCTCCACCCA AGCGGCCGGA
 50 8301 GAACCTGCGT GCAATCCATC TTGTTCAATC ATGCGAAACG ATCCTCATCC
 8351 TGTCTCTTGA TCAGATCTTG ATCCCCCTCG CCATCAGATC CTTGGCGGCA
 8401 AGAAAGCCAT CCAGTTTACT TTGCAGGGCT TCCCAACCTT ACCAGAGGGC
 55 8451 GCCCCAGCTG GCAATTCCGG TTCGCTTGCT GTCCATAAAA CCGCCCAGTC
 8501 TAGCTATCGC CATGTAAGCC CACTGCAAGC TACCTGCTTT CTCTTTGCGC
 8551 TTGGGTTTTT CTTTGTCCAG ATAGCCCACT AGCTGACATT CATCCGGGGT
 60 8601 CAGCACCGTT TCTGCGGACT GGCTTTCTAC GTGTTCCGCT TCCTTTAGCA
 8651 GCCCTTGCGC CCTGAGTGCT TSCGGCAGCG TGAAGCT

65

ES 2 341 341 T3

SEQ ID NO: 16

Secuencia de nucleótido del vector de expresión HCMV-G1 HuA6-VHE (secuencia de ADN completa de un vector de expresión de cadena pesada humanizada que comprende la SEQ ID NO: 11 (VHE) de 3921-4274)

```

5
1  AGCTTTTTCG AAAAGCCTAG GCCTCCAAA AAGCCTCCTC ACTACTTCTG
51  GAATAGCTCA GAGGCCGAGG CGGCCTCGGC CTCTGCATAA ATAAAAAAA
10  101  TTAGTCAGCC ATGGGGCGGA GAATGGGCGG AACTGGGCGG AGTTAGGGGC
151  GGGATGGGCG GAGTTAGGGG CGGGACTATG GTTGCTGACT AATTGAGATG
201  CATGCTTTGC ATACTTCTGC CTGCTGGGGA GCCTGGTTGC TGAATAATTG
251  AGATGCATGC TTTGCATACT TCTGCCTGCT GGGGAGCCTG GGGACTTTCC
15  301  ACACCCTAAC TGACACACAT TCCACAGCTG CCTCGCGCGT TTCGGTGATG
351  ACGGTGAAAA CCTCTGACAC ATGCAGCTCC CGGAGACGGT CACAGCTTGT
401  CTGTAAGCGG ATGCCGGGAG CAGACAAGCC CGTCAGGGCG CGTCAGCGGG
20  451  TGTTCGCGGG TGTTCGCGGG CAGCCATGAC CCAGTCACGT AGCGATAGCG
501  GAGTGTATAC TGGCTTAACT ATGCGGCATC AGAGCAGATT GTACTGAGAG
551  TGCACCATAT GCGGTGTGAA ATACCGCACA GATGCGTAAG GAGAAAATAC
601  CGCATCAGGC GCTCTTCCGC TTCTTCGCTC ACTGACTCGC TCGCTCGGT
25  651  CGTTCGGCTG CGGCGAGCGG TATCAGCTCA CTCAAAGGCG GTAATACGGT
701  TATCCACAGA ATCAGGGGAT AACGCAGGAA AGAACATGTG AGCAAAAGGC
751  CAGCAAAAGG CCAGGAACCG TAAAAGGCC GCGTTGCTGG CGTTTTTCCA
801  TAGGCTCCGC CCCCCTGACG AGCATCACA AAATCGACGC TCAAGTCAGA
30  851  GGTGGCGAAA CCGGACAGGA CTATAAAGAT ACCAGGCGTT TCCCCCTGGA
901  AGCTCCCTCG TCGCTCTCC TGTTCGACC CTGCCGCTTA COGGATACCT
951  GTCCGCCTTT CTCCCTTCGG GAAGCGTGGC GCTTTCTCAT AGCTCACGCT
35  1001  GTAGGTATCT CAGTTCGGTG TAGGTCGTTT GCTCCAAGCT GGGCTGTGTG
1051  CACGAACCCC CCGTTCAGCC CGACCGCTGC GCCTTATCCG GTAACTATCG
1101  TCTTGAGTCC AACCCGGTAA GACACGACTT ATCGCCACTG GCAGCAGCCA
1151  CTGGTAACAG GATTAGCAGA GCGAGGTATG TAGGCGGTGC TACAGAGTTC
40  1201  TTGAAGTGGT GGCCTAACTA CGGCTACACT AGAAGGACAG TATTTGGTAT
1251  CTGCGCTCTG CTGAAGCCAG TTACCTTCGG AAAAAGAGTT GGTAGCTCTT
1301  GATCCGGCAA ACAAAACCAC GCTGGTAGCG GTGGTTTTTT TGTTTGCAAG
1351  CAGCAGATTA CGCGCAGAAA AAAAGGATCT CAAGAAGATC CTTTGATCTT
45  1401  TTCTACGGGG TCTGACGCTC AGTGAACGA AACTCACGT TAAGGGATTT
1451  TGGTCATGAG ATTATCAAAA AGGATCTTCA CCTAGATCCT TTTAAATTAA
1501  AAATGAAGTT TTAAATCAAT CTAAAGTATA TATGAGTAAA CTTGGTCTGA
50
55
60
65

```


ES 2 341 341 T3

1551 CAGTTACCAA TGCTTAATCA GTGAGGCACC TATCTCAGCG ATCTGTCTAT
 1601 TTCGTTTCATC CATAGTTGCC TGACTCCCOG TCGTGTAGAT AACTACGATA
 5 1651 CGGGAGGGCT TACCATCTGG CCCCAGTGCT GCAATGATAC CGCGAGACCC
 1701 ACGCTCACCG GCTCCAGATT TATCAGCAAT AAACCAGCCA GCCGGAAGGG
 1751 CCGAGCGCAG AAGTGGTCCT GCAACTTTAT CCGCCTCCAT CCAGTCTATT
 10 1801 AATTGTTGCC GGGAAGCTAG AGTAAGTAGT TCGCCAGTTA ATAGTTTGCG
 1851 CAACGTTGTT GCCATTGCTG CAGGCATCGT GGTGTCAAGC TCGTCGTTTG
 1901 GTATGGCTTC ATTACAGCTCC GGTTCCCAAC GATCAAGGCG AGTTACATGA
 15 1951 TCCCCCATGT TGTGCAAAAA AGCGGTTAGC TCCTTCGGTC CTCCGATCGT
 2001 TGTCAGAAGT AAGTTGGCCG CAGTGTATC ACTCATGGTT ATGGCAGCAC
 2051 TGCAATAATC TCTTACTGTC ATGCCATCCG TAAGATGCTT TTCTGTGACT
 20 2101 GGTGAGTACT CAACCAAGTC ATTCTGAGAA TAGTGTATGC GGCGACCGAG
 2151 TTGCTCTTGC CCGGCGTCAA CACGGGATAA TACCGCGCCA CATAGCAGAA
 2201 CTTTAAAAGT GCTCATCATT GGAAAACGTT CTTGGGGGCG AAAACTCTCA
 25 2251 AGGATCTTAC CGCTGTTGAG ATCCAGTTCC ATGTAACCCA CTCGTGCACC
 2301 CAACTGATCT TCAGCATCTT TTACTTTTAC CAGCGTTTCT GGGTGAGCAA
 2351 AAACAGGAAG GCAAAATGCC GCAAAAAGG GAATAAGGGC GACACGGAAA
 30 2401 TGTTGAATAC TCATACTCTT CCTTTTCAA TATTATTGAA GCATTTATCA
 2451 GGGTTATTGT CTCATGAGCG GATACATATT TGAATGTATT TAGAAAAATA
 2501 AACAAATAGG GGTTCCGCGC ACATTTCCCC GAAAAGTGCC ACCTGACGTC
 35 2551 TAAGAAACCA TTATTATCAT GACATTAACC TATAAAAATA GGCGTATCAC
 2601 GAGGCCCTTT CSTCTTCAAG AATTCAGCTT GGCTGCAGTG AATAATAAAA
 2651 TGTGTGTTTG TCCGAAATAC GCGTTTTGAG ATTTCTGTCC CCGACTAAAT
 40 2701 TCATGTGCGC CGATAGTGGT GTTTATCGCC GATAGAGATG GCGATATTGG
 2751 AAAAATCGAT ATTTGAAAAT ATGGCATATT GAAAATGTCC CCGATGTGAG
 2801 TTTCTGTGTA ACTGATATCG CCATTTTCC AAAAGTGATT TTTGGGCATA
 45 2851 CGCGATATCT GCGGATAGCG CTTATATCGT TTACGGGGGA TGGCGATAGA
 2901 CGACTTTGGT GACTTGGGCG ATTCTGTGTG TCGCAAATAT CGCAGTTTCC
 2951 ATATAGGTGA CAGACCATAT GAGGCTATAT CGCCGATAGA GGCGACATCA
 50 3001 AGCTGGCACA TGGCCAATGC ATATCGATCT ATACATTGAA TCAATATTGG
 3051 CCATTAGCCA TATTATTCAT TGGTTATATA GCATAAATCA ATATTGGCTA
 55 3101 TTGGCCATTG CATACGTTGT ATCCATATCA TAATATGTAC ATTTATATTG
 3151 GCTCATGTCC AACATTACCG CCATGTTGAC ATTGATTATT GACTAGTTAT
 3201 TAATAGTAAT CAATTACGGG GTCATTAGTT CATAGCCCAT ATATGGAGTT
 60 3251 CCGCGTTACA TAACCTACGG TAAATGGCCC GCCTGGCTGA CCGCCCAACG
 3301 ACCCCCGCCC ATTGACGTCA ATAATGACGT ATGTTCCCAT AGTAACGCCA
 3351 ATAGGGACTT TCCATTGACG TCAATGGGTG GAGTATTTAC GGTAAACTGC

ES 2 341 341 T3

3401 CCACCTGGCA GTACATCAAG TGTATCATAT GCCAAGTACG CCCCCTATTG
 3451 ACGTCAATGA CGGTAAATGG CCCGCCTGGC ATTATGCCCA GTACATGACC
 5 3501 TTATGGGACT TTCCTACTTG GCAGTACATC TACGTATTAG TCATCGCTAT
 3551 TACCATGGTG ATGCGGTTTT GGCAGTACAT CAATGGGCGT GGATAGCGGT
 3601 TTGACTCAGG GGGATTTOCA AGTCTCCACC CCATTGACGT CAATGGGAGT
 10 3651 TTGTTTTGGC ACCAAAATCA ACGGGACTTT CCAAAATGTC GTAACAATC
 3701 CGCCCCATTG ACGCAAATGG GCGGTAGGCG TGTACGGTGG GAGGTCTATA
 3751 TAAGCAGAGC TCGTTTAGTG AACCCTCAGA TCGCCTGGAG ACCCCATCCA
 15 3801 CGCTGTTTTG ACCTCCATAG AAGACACCGG GACCGATCCA GCCTCCGCAA
 3851 GCTTGCCGCC ACCATGGACT GGACCTGGAG GGTGTTCTGC CTGCTGGCCG
 3901 TGGCCCCCGG CGCCACAGC GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC AGGAGCCGAA
 20 3951 GTGAAAAAGC CTGGGGCTTC AGTGAAGGTG TCCTGCAAGG CCTCTGGATA
 4001 CACATTCACT AATTATATTA TCCACTGGGT GAAGCAGGAG CCTGGTCAGG
 4051 GCCTTGAATG GATTGGATAT TTTAATCCTT ACAATCATGG TACTAAGTAC
 25 4101 AATGAGAAGT TCAAAGGCAG GGCCACACTA ACTGCABAACA AATCCATCAG
 4151 CACAGCCTAC ATGGAGCTCA GCAGCCTGCG CTCTGAGGAC ACTGCGGTCT
 4201 ACTACTGTGC AAGATCAGGA CCCTATGCCT GGTTTGACAC CTGGGGCCAA
 30 4251 GGGACCACGG TCACCGTCTC CTCAGGTGAG TTCTAGAAGG ATCCCAAGCT
 4301 AGCTTTCTGG GGCAGGCCAG GCCTGACCTT GGCTTTGGGG CAGGGAGGGG
 4351 GCTAAGGTGA GGCAGGTGGC GCCAGCCAGG TGCACACCCA ATGCCCATGA
 35 4401 GCCCAGACAC TGGACGCTGA ACCTCGCGGA CAGTTAAGAA CCCAGGGGCC
 4451 TGTGCGCCCT GGGCCCAGCT CTGTCCCACA CCGCGGTCAC ATGGCACCAC
 40 4501 CTCTCTTGCA GCCTCCACCA AGGGCCCATC GGTCTTCCCC CTGGCACCTT
 4551 CCTCCAAGAG CACCTCTGGG GGCACAGCGG CCCTGGGCTG CCTGGTCAAG
 4601 GACTACTTCC CCGAACCAGT GACGGTGTGG TGGAACTCAG GCGCCTGAC
 45 4651 CAGCGGCGTG CACACCTTCC CGGCTGTCTT ACAGTCTTCA GGACTCTACT
 4701 CCCTCAGCAG CGTGGTGACC GTGCCCTCCA GCAGCTTGGG CACCCAGACC
 4751 TACATCTGCA ACGTGAATCA CAAGCCCAGC AACACCAAGG TGGACAAGAA
 50 4801 AGTTGGTGAG AGGCCAGCAC AGGGAGGGAG GGTGTCTGCT GGAAGCCAGG
 4851 CTCAGCGCTC CTGCCTGGAC GCATCCCGGC TATGCAGCCC CAGTCCAGGG
 4901 CAGCAAGGCA GGCCCCGTCT GCCTCTTCAC CCGGAGGCCT CTGCCCCCCC
 55 4951 CACTCATGCT CAGGGAGAGG GTCTTCTGGC TTTTCCCCA GGCTCTGGGC
 5001 AGGCACAGGC TAGGTGCCCC TAACCCAGGC CCTGCACACA AAGGGGCAGG
 5051 TGCTGGGCTC AGACCTGCCA AGAGCCATAT CCGGGAGGAC CCTGCCCCTG
 60 5101 ACCTAAGCCC ACCCCAAAGG CCAAACCTCT CACTCCCTCA GCTCGGACAC
 5151 CTTCTCTCCT CCCAGATTCC AGTAACTCCC AATCTTCTCT CTGCAGAGCC
 5201 CAAATCTTGT GACAAAATC ACACATGCCC ACGTGCCCA GGTAAGCCAG
 65

ES 2 341 341 T3

5251 CCCAGGCCTC GCCCTCCAGC TCAAGGCGGG ACAGGTGCCC TAGAGTAGCC
5301 TGCATCCAGG GACAGGCCCC AGCCGGGTGC TGACACGTCC ACCTCCATCT
5 5351 CTTCCCTCAGC ACCTGAACTC CTGGGGGGAC CGTCAGTCTT CCTCTTCCCC
5401 CCAAAACCCA AGGACACCCT CATGATCTCC CGGACCCCTG AGGTCACATG
5451 CGTGGTGGTG GACGTGAGCC ACGAAGACCC TGAGGTCAAG TTCAACTGGT
10 5501 ACGTGGACGG CGTGGAGGTG CATAATGCCA AGACAAAGCC GCGGGAGGAG
5551 CAGTACAACA GCACGTACCG TGTGGTCAGC GTCCTCACCG TCCTGCACCA
5601 GGACTGGCTG AATGGCAAGG AGTACAAGTG CAAGGTCTCC AACAAAGCCC
15 5651 TCCCAGCCCC CATCGAGAAA ACCATCTCCA AAGCCAAAGG TGGGACCCGT
5701 GGGGTGCGAG GGCCACATGG ACAGAGGCCG GCTCGGCCCC CCTCTGCCCC
5751 TGAGAGTGAC CGCTGTACCA ACCTCTGTCC CTACAGGGCA GCCCCGAGAA
20 5801 CCACAGGTGT ACACCCTGCC CCCATCCCGG GATGAGCTGA CCAAGAACCA
5851 GGTCAGCCTG ACCTGCCTGG TCAAAGGCTT CTATCCCAGC GACATCGCCG
5901 TGGAGTGGGA GAGCAATGGG CAGCCGGAGA ACAACTACAA GACCACGCCT
25 5951 CCCGTGCTGG ACTCCGACGG CTCCTTCTTC CTCTACAGCA AGCTCACCGT
6001 GGACAAGAGC AGGTGGCAGC AGGGGAACGT CTTCTCATGC TCCGTGATGC
6051 ATGAGGCTCT GCACAACCAC TACACGCAGA AGAGCCTCTC CCTGTCTCCG
30 6101 GGTAATGAG TGGACGGCC GCAAGCCCC CGCTCCCCGG GCTCTCGCGG
6151 TCGCACGAGG ATGCTTGGCA CGTACCCCT GTACATACTT CCCGGGCGCC
6201 CAGCATGGAA ATAAAGCACC CAGCGCTGCC CTGGGCCCCCT GCGAGACTGT
35 6251 GATGGTTCTT TCCACGGGTC AGGCCGAGTC TGAGGCCTGA GTGGCATGAG
6301 ATCTGATATC ATCGATGAAT TCGAGCTCGG TACCCGGGGA TCGATCCAGA
40 6351 CATGATAAGA TACATTGATG AGTTTGGACA AACCACAAT AGAATGCAGT
6401 GAAAAAATG CTTTATTTGT GAAATTTGTG ATGCTATTGC TTTATTTGTA
6451 ACCATTATAA GCTGCAATAA ACAAGTTAAC AACACAATT GCATTCAATT
45 6501 TATGTTTCAG GTTCAGGGGG AGGTGTGGGA GGTTTTTTAA AGCAAGTAAA
6551 ACCTCTACAA ATGTGGTATG GCTGATTATG ATCTCTAGTC AAGGCACTAT
6601 ACATCAAATA TTCCTTATTA ACCCCTTTAC AAATTAAAAA GCTAAAGGTA
50 6651 CACAATTTTT GAGCATAGTT ATTAATAGCA GACACTCTAT GCCTGTGTGG
6701 AGTAAGAAAA AACAGTATGT TATGATTATA ACTGTTATGC CTAATTATAA
6751 AGGTTACAGA ATATTTTCC ATAATTTTCT TGTATAGCAG TGCAGCTTTT
55 6801 TCCTTTGTGG TGTAAATAGC AAAGCAAGCA AGAGTTCTAT TACTAAACAC
6851 AGCATGACTC AAAAACTTA GCAATTCTGA AGGAAAGTCC TTGGGGTCTT
6901 CTACCTTTCT CTTCTTTTTT GGAGGAGTAG AATGTTGAGA GTCAGCAGTA
60 6951 GCCTCATCAT CACTAGATGG CATTTCTTCT GAGCAAAACA GGTTTTCCTC
7001 ATTAAAGGCA TTCCACCACT GCTCCCATTG ATCAGTTCCA TAGGTTGGAA
7051 TCTAAATAC ACAAACAATT AGAATCAGTA GTTTAACACA TTATACACTT
65

ES 2 341 341 T3

7101 AAAAATTTTA TATTTACCTT AGAGCTTTAA ATCTCTGTAG GTAGTTTGTC
 7151 CAATTATGTC ACACCACAGA AGTAAGGTTT CTTCAAAAG ATCCGGGACC
 7201 AAAGCGGCCA TCGTGCCTCC CCACTCCTGC AGTTCCGGGG CATGGATGCG
 7251 CGGATAGCCG CTGCTGGTTT CCTGGATGCC GACGGATTTC CACTGCCGGT
 7301 AGAACTCCGC GAGGTGCTCC AGCCTCAGGC AGCAGCTGAA CCAACTCGCG
 7351 AGGGGATCGA GCCCGGGGTG GGCGAAGAAC TCCAGCATGA GATCCCCGCG
 7401 CTGCGAGGATC ATCCAGCCGG CGTCCCGGAA AACGATTCCG AAGCCCAACC
 7451 TTTCATAGAA GGCGGCGGTG GAATCGAAAT CTCGTGATGG CAGGTTGGGC
 7501 GTCGCTTGGT CGGTCATTTT GAACCCCAAG GTCCCGCTCA GAAGAACTCG
 7551 TCAAGAAGGC GATAGAAGGC GATGCGCTGC GAATCGGGAG CGGCGATACC
 7601 GTAAAGCAGC AGGAAGCGGT CAGCCCATTC GCCGCCAAGC TCTTCAGCAA
 7651 TATCACGGGT AGCCAACGCT ATGTCTTGAT AGCGGTCCGC CACACCCAGC
 7701 CGGCCACAGT CGATGAATCC AGAAAAGCGG CCATTTTCCA CCATGATATT
 7751 CGGCAAGCAG GCATCGCCAT GGGTCACGAC GAGATCCTCG CCGTCGGGCA
 7801 TGCGCGCCTT GAGCCTGGCG AACAGTTCCG CTGGCGCGAG CCCCTGATGC
 7851 TCTTCGTCCA GATCATCTG ATCGACAAGA CCGGCTTCCA TCCGAGTACG
 7901 TGCTCGCTCG ATGCGATGTT TCGCTTGGTG GTCGAATGGG CAGGTAGCCG
 7951 GATCAAGCGT ATGCAGCCGC CGCATTCGAT CAGCCATGAT GGATACTTTC
 8001 TCGGCAGGAG CAAGGTGAGA TGACAGGAGA TCCTGCCCCG GCACTTGGCC
 8051 CAATAGCAGC CAGTCCCTTC CCGCTTCAGT GACAACGTGG AGCACAGCTG
 8101 CGCAAGGAAC GCCCGTCTGT GCCAGCCACG ATAGCCCGCG TGCCCTCGTCC
 8151 TGCAGTTCAT TCAGGGCACC GGACAGGTGG GTCTTGACAA AAAGAACCGG
 8201 GCGCCCCCTG GCTGACAGCC GGAACACGGC GGCATCAGAG CAGCCGATTG
 8251 TCTGTGTGTC CCAGTCATAG CCGAATAGCC TCTCCACCCA AGCGGCCGGA
 8301 GAACCTGCGT GCAATCCATC TTGTTCAATC ATGCCGAAAG ATCCTCATCC
 8351 TGTCTCTTGA TCAGATCTTG ATCCCCTGCG CCATCAGATC CTTGGCGGCA
 8401 AGAAAGCCAT CCAGTTTACT TTGCAGGGCT TCCCAACCTT ACCAGAGGGC
 8451 GCCCCAGCTG GCAATTCGGT TTCGCTTGCT GTCCATAAAA CCGCCCAGTC
 8501 TAGCTATCGC CATGTAAGCC CACTGCAAGC TACCTGCTTT CTCTTTGCGC
 8551 TTGCGTTTTT CCTTGTCCAG ATAGCCCAAG AGCTGACATT CATCCGGGGT
 8601 CAGCACCGTT TCTGCGGACT GGCTTTCTAC GTGTTCCGCT TCCTTACGCA
 8651 GCCCTTGCGC CCTGAGTGCT TGCGGCAGCG TGAAGCT

ES 2 341 341 T3

SEQ ID NO: 17

Secuencia de nucleótido del vector de expresión HCMV-K HuAb-VL1 hum V1 (secuencia de ADN completa de un vector de expresión de cadena liviana humanizada que comprende la SEQ ID NO: 14 (hum V1 = VLh) de 3964-4284)

```

1  CTAGCTTTT GCAAAAGCCT AGGCCTCCAA AAAAGCCTCC TCACTACTTC
51  TGAATAGCT CAGAGGCCGA GCGGCCTCG GCCTCTGCAT AAATAAAAAA
101 AATTAGTCAG CCATGGGGCG GAGAATGGGC GGAAGTGGGC GGAGTTAGGG
151 GCGGGATGGG CGGAGTTAGG GCGGGGACTA TGGTTGCTGA CTAATTGAGA
201 TGCATGCTTT GCATACTTCT GCCTGCTGGG GAGCCTGGTT GCTGACTAAT
251 TGAGATGCAT GCTTTGCATA CTTCTGCCTG CTGGGGAGCC TGGGGACTTT
301 CCACACCCTA ACTGACACAC ATTCCACAGC TGCCTCGCGC GTTTCGGTGA
351 TGACGGTGAA AACCTCTGAC ACATGCAGCT CCCGGAGACG GTCACAGCTT
401 GTCGTGAAGC GGATGCCGGG AGCAGACAAG CCCGTCAGGG CGCGTCAGCG
451 GGTGTTGGCG GGTGTCGGGG CGCAGCCATG ACCCAGTCAC GTAGCGATAG
501 CGGAGTGTAT ACTGGCTTAA CTATGCGGCA TCAGAGCAGA TTGTAAGTGA
551 AGTGCACCAT ATGCGGTGTG AAATACCGCA CAGATGCGTA AGGAGAAAAA
601 ACCGCATCAG GCGCTCTTCC GCTTCCTCGC TCACTGACTC GCTGCGCTCG
651 GTCGTTGCGC TGCGGCGAGC GGTATCAGCT CACTCAAAGG CGGTAATACG
701 GTTATCCACA GAATCAGGGG ATAACGCAGG AAAGAACATG TGAGCAAAAG
751 GCCAGCAAAA GGCCAGGAAC CGTAAAAAGG CCGCGTTGCT GGCGTTTTTC
801 CATAGGCTCC GCCCCCTGA CGAGCATCAC AAAAATCGAC GCTCAAGTCA
851 GAGGTGGCGA AACCAGACAG GACTATAAAG ATACCAGGCG TTCCCCCTG
901 GAAGCTCCCT CGTGCGCTCT CCGTTCCGA CCCTGCCGCT TACCGGATAC
951 CTGTCCGCTT TCCTCCCTTC GCGAAGCGTG GCGCTTTCTC ATAGCTCACG
1001 CTGTAGGTAT CTCAGTTGGG TGTAGGTCGT TCGCTCCAAG CTGGGCTGTG
1051 TGCACGAACC CCCCGTTCAG CCCGACCGCT GCGCCTTATC CGGTAAGTAT
1101 CGTCTTGAGT CCAACCCGGT AAGACACGAC TTATCGCCAC TGGCAGCAGC
1151 CACTGGTAAC AGGATTAGCA GAGCGAGGTA TGTAGGCGGT GCTACAGAGT
1201 TCTTGAAGTG GTGGCCTAAC TACGGCTACA CTAGAAGGAC AGTATTTGGT
1251 ATCTGCGCTC TGCTGAAGCC AGTTACCTTC GGAAAAAGAG TTGGTAGCTC
1301 TTGATCCGCC AAACAAACCA CCGCTGGTAG CCGTGGTTTT TTGTTTGCA
1351 AGCAGCAGAT TACGCGCAGA AAAAAAGGAT CTCAAGAAGA TCCTTTGATC
1401 TTTTCTACGG GGTCTGACGC TCAGTGGAAC GAAACTCAC GTTAAGGGAT
1451 TTTGGTCATG AGAATTCAA AAAGGATCTT CACCTAGATC CTTTTAAATT
1501 AAAAATGAAG TTTTAAATCA ATCTAAAGTA TATATGAGTA AACTTGGTCT

```

ES 2 341 341 T3

1551 GACAGTTACC AATGCTTAAT CAGTGAGGCA CCTATCTCAG CGATCTGTCT
 1601 AATTTCGTTCA TCCATAGTTG CCTGACTCCC CGTCGTGTAG ATAACCTACGA
 5 1651 TACGGGAGGG CTTACCATCT GGGCCCAGTG CTGCAATGAT ACCGCGAGAC
 1701 CCACGCTCAC CGGCTCCAGA TTTATCAGCA ATAAACCAGC CAGCCGGAAG
 1751 GGCCGAGCGC AGAAGTGGTC CTGCAACTTT ATCCGCCTCC ATCCAGTCTA
 10 1801 TTAATTGTTG CCGGGAAGCT AGAGTAAGTA GTTCGCCAGT TAATAGTTTG
 1851 CGCAACGTTG TTGCCATTGC TGCAGGCATC GTGGTGTAC GCTCGTCGTT
 1901 TGGTATGGCT TCATTCAGCT CCGGTTCCCA ACGATCAAGG CGAGTTACAT
 15 1951 GATCCCCCAT GTTGTGCAAA AAAGCGGTTA GCTCCTTCGG TCCTCCGATC
 2001 GTTGTGAGAA GTAAGTTGGC CGCAGTGTTA TCACTCATGG TTATGGCAGC
 2051 ACTGCATAAT TCTCTTACTG TCATGCCATC CGTAAGATGC TTTTCTGTGA
 20 2101 CTGGTGAGTA CTCAACCAAG TCATTCTGAG AATAGTGTAT GCGGCGACCG
 2151 AGTTGCTCTT GCGCGGCGTC AACACGGGAT AATACGCGC CACATAGCAG
 2201 AACTTTAAAA GTGCTCATCA TTGGAAAACG TTCTTCGGGG CGAAAACCTCT
 25 2251 CAAGGATCTT ACCGCTGTTG AGATCCAGTT CGATGTAACC CACTCGTGCA
 2301 CCCAACTGAT CTTCAGCATC TTTTACTTTC ACCAGCGTTT CTGGGTGAGC
 2351 AAAAACAGGA AGGCAAAATG CCGCAAAAAA GGGAATAAGG GCGACACGGA
 30 2401 AATGTTGAAT ACTCATACTC TTCCTTTTTT AATATTATTG AAGCATTTAT
 2451 CAGGGTTATT GTCTCATGAG CGGATACATA TTTGAATGTA TTTAGAAAAA
 2501 TAAACAAATA GGGGTTCCGC GCACATTTC CCGAAAAGTG CCACCTGACG
 35 2551 TCTAAGAAAC CATTATTATC ATGACATTAA CCTATAAAAA TAGGCGTATC
 2601 ACGAGGCCCT TTCGTCTTCA AGAATTGAGC TTGGCTGCAG TGAATAATAA
 2651 AATGTGTGTT TGTCGGAAAT ACSCGTTTTG AGATTTCTGT CGCCGACTAA
 40 2701 ATTCATGTCG CGCGATAGTG GTGTTTATCG CCGATAGAGA TGGCGATATT
 2751 GGAAAAATCG ATATTTGAAA ATATGGCATA TTGAAAATGT CGCCGATGTG
 2801 AGTTTCTGTG TAACTGATAT CGCCATTTTT CCAAAAGTGA TTTTGGGCA
 45 2851 TACCGGATAT CTGGCGATAG CGCTTATATC GTTTACGGGG GATGGCGATA
 2901 GACGACTTTG GTGACTTGGG CGATTCTGTG TGTCGCAAAT ATCGCAGTTT
 2951 CGATATAGGT GACAGACGAT ATGAGGCTAT ATCGCCGATA GAGGCGACAT
 50 3001 CAAGCTGGCA CATGGCCAAT GCATATCGAT CTATACATTG AATCAATATT
 3051 CGCCATTAGC CATATTATTC ATTGGTTATA TAGCATAAAT CAATATTGGC
 3101 TATTGGCCAT TGCATACGTT GTATCCATAT CATAATATGT ACATTTATAT
 55 3151 TGGCTCATGT CCAACATTAC CGCCATGTTG ACATTGATTA TTGACTAGTT
 3201 ATTAATAGTA ATCAATTACG GGGTCATTAG TTCATAGCCC ATATATGGAG
 3251 TTCCGCGTTA CATAACTTAC GGTAAATGGC CCGCCTGGCT GACCGCCCAA
 60 3301 CGACCCCCGC CCATTGACGT CAATAATGAC GTATGTTCCC ATAGTAACGC
 3351 CAATAGGGAC TTTCCATTGA CGTCAATGGG TGGAGTATTT ACGGTAAACT

65

ES 2 341 341 T3

3401 GCCCACTTGG CAGTACATCA AGTSTATCAT ATGCCAAGTA CGCCCCCTAT
 3451 TGACGTCAAT GACGGTAAAT GGCCCGCCTG GCATTATGCC CAGTACATGA
 5 3501 CCTTATGGGA CTTCCTACT TGGCAGTACA TCTACGTATT AGTCATCGCT
 3551 ATTACCATGG TGATGCGGTT TTGGCAGTAC ATCAATGGGC GTGGATAGCG
 3601 GTTTGACTCA CGGGGATTTC CAAGTCTCCA CCCCATTGAC GTCAATGGGA
 10 3651 GTTTGTTTTG GCACCAAAT CAACGGGACT TTCCAAAATG TCGTAACAAC
 3701 TCCGCCCCAT TGACGCAAAT GGGCGGTAGG CGTGTACGGT GGGAGGTCTA
 3751 TATAAGCAGA GCTCGTTTAG TGAACCGTCA GATCGCCTGG AGACGCCATC
 15 3801 CACGCTGTTT TGACCTCCAT AGAAGACACC GGGACCGATC CAGCCTCCGC
 3851 AAGCTTGATA TCGAATTCTT GCAGCCCGGG GGATCCGCCC GCTTGCCCGC
 3901 ACCATGGAGA CCCCCGCCCA GCTGCTGTTT CTGCTGCTGC TGTGGCTGCC
 20 3951 CGACACCACC GCGGACATTC TGCTGACCCA GTCTCCAGCC ACCCTGTCTC
 4001 TGAGTCCAGG AGAAAGAGCC ACTCTCTCTT GCAGGGCCAG TCAGAACATT
 4051 GGCACAAGCA TACAGTGGTA TCAACAAAAA CCAGGTCAGG CTCCAAGGCT
 25 4101 TCTCATAAGG TCTTCTTCTG AGTCTATCTC TGGGATCCCT TCCAGGTTTA
 4151 GTGGCAGTGG ATCAGGGACA GATTTTACTC TTACCATCAG CAGTCTGGAG
 4201 CCTGAAGATT TTGCAGTGTA TTAAGTCAA CAAAGTAATA CCTGGCCATT
 4251 CACGTTCCGC CAGGGGACCA AGCTGGAGAT CAAACGTGAG TATTCTAGAA
 30 4301 AGATCCTAGA ATTCTAAACT CTGAGGGGGT CGGATGACGT GGCCATTCTT
 4351 TGCCTAAAGC ATTGAGTTTA CTGCAAGGTC AGAAAAGCAT GCAAAGCCCT
 4401 CAGAATGGCT GCAAAGAGCT CCAACAAAAC AATTTAGAAC TTTATTAAAG
 35 4451 AATAGGGGGA AGCTAGGAAG AAACCAAAA CATCAAGATT TTAAATACGC
 4501 TTCTTGGTCT CCTTGCTATA ATTATCTGGG ATAAGCATGC TGTTTTCTGT
 4551 CTGTCCCTAA CATGCCCTGT GATTATCCGC AAACAACACA CCAAGGGCA
 40 4601 GAACTTTGTT ACTTAAACAC CATCCTGTTT GCTTCTTTCC TCAGGAACTG
 4651 TGGCTGCACC ATCTGTCTTC ATCTTCCCGC CATCTGATGA GCAGTTGAAA
 4701 TCTGGAACTG CCTCTGTTGT GTGCCTGCTG AATAACTTCT ATCCAGAGA
 45 4751 GGCCAAAGTA CAGTGAAGG TGGATAACGC CCTCCAATCG GGTAAGTCCC
 4801 AGGAGAGTGT CACAGAGCAG GACAGCAAGG ACAGCACCTA CAGCCTCAGC
 4851 AGCACCTTGA CGCTGAGCAA AGCAGACTAC GAGAAACACA AAGTCTACGC
 50 4901 CTGCGAAGTC ACCCATCAGG GCCTGAGCTC GCGCGTCACA AAGAGCTTCA
 4951 ACAGGGGAGA GTGTTAGAGG GAGAAGTGCC CCCACCTGCT CCTCAGTTCC
 5001 AGCCTGACCC CCTCCCATCC TTTGGCCTCT GACCCTTTTT CCACAGGGGA
 55 5051 CCTACCCCTA TTGCGGTCCT CCAGCTCATC TTTCACCTCA CCCCCCTCCT
 5101 CCTCCTTGGC TTTAATTATG CTAATGTTGG AGGAGAATGA ATAAATAAAG
 5151 TGAATCTTTG CACCTGTGGT TTCTCTCTTT CCTCATTTAA TAATTATTAT
 60 5201 CTGTTGTTTA CCAACTACTC AATTTCTCTT ATAAGGGACT AAATATGTAG

ES 2 341 341 T3

5251 TCATCCTAAG GCGCATAACC ATTTATAAAA ATCATCCTTC ATTCTATTTT
 5301 ACCCTATCAT CCTCTGCAAG ACAGTCCTCC CTCAAACCCA CAAGCCTTCT
 5 5351 GTCCTCACAG TCCCCTGGGC CATGGTAGGA GAGACTTGCT TCCTTGTTTT
 5401 CCCCTCCTCA GCAAGCCCTC ATAGTCCTTT TTAAGGGTGA CAGGTCTTAC
 5451 AGTCATATAT CCTTTGATTC AATTCCCTGA GAATCAACCA AAGCAAATTT
 10 5501 TTCAAAGAA GAAACCTGCT ATAAAGAGAA TCATTCATTG CAACATGATA
 5551 TAAAATAACA ACACAATAAA AGCAATTAAA TAAACAAACA ATAGGGAAAT
 5601 GTTTAAGTTC ATCATGGTAC TTAGACTTAA TGGAATGTCA TGCCTTATTT
 15 5651 ACATTTTTAA ACAGGTACTG AGGGACTCCT GTCTGCCAAG GGCCGTATTG
 5701 AGTACTTTCC ACAACCTAAT TTAATCCACA CTATACTGTG AGATTAAAAA
 5751 CATTCATTAA AATGTTGCAA AGGTTCTATA AAGCTGAGAG ACAAATATAT
 20 5801 TCTATAACTC AGCAATCCCA CTTCTAGATG ACTGAGTGTC CCCACCCACC
 5851 AAAAACTAT GCAAGAATGT TCAAAGCAGC TTTATTTACA AAAGCCAAAA
 5901 ATTGGAAATA GCCCGATTGT CCAACAATAG AATGAGTTAT TAAACTGTGG
 25 5951 TATGTTTATA CATTAGAATA CCCAATGAGG AGAATTAACA AGCTACAAC
 6001 ATACCTACTC ACACAGATGA ATCTCATAAA AATAATGTTA CATAAGAGAA
 6051 ACTCAATGCA AAAGATATGT TCTGTATGTT TTCATCCATA TAAAGTTCAA
 30 6101 AACCAGGTAA AAATAAAGTT AGAAATTTGG ATGGAAATTA CTCTTAGCTG
 6151 GGGGTGGGCG AGTTAGTGCC TGGGAGAAGA CAAGAAGGGG CTTCTGGGGT
 6201 CTTGGTAATG TTCTGTTTCT CGTGTGGGGT TGTGCAGTTA TGATCTGTGC
 35 6251 ACTGTTCTGT ATACACATTA TGCTTCAAAA TAACTTCACA TAAAGAACAT
 6301 CTTATACCCA GTTAATAGAT AGAAGAGGAA TAAGTAATAG GTCAAGACCA
 6351 CGCAGCTGGT AAGTGGGGGG GCGTGGGATC AAATAGCTAC CTGCCAATC
 40 6401 CTGCCCTCTT GAGCCCTGAA TGAGTCTGCC TTCCAGGGCT CAAGGTGCTC
 6451 AACAAAACAA CAGGCCTGCT ATTTTCTTGG CATCTGTGCC CTGTTTGGCT
 6501 AGCTAGGAGC ACACATACAT AGAAATTAAA TGAAACAGAC CTTCAGCAAG
 45 6551 GGGACAGAGG ACAGAATTAA CCTTGCCCAG ACACTGGAAA CCCATGTATG
 6601 AACACTCACA TGTTTGGGAA GGGGGAAGGG CACATGTAAA TGAGGACTCT
 6651 TCCTCATTCT ATGGGGCACT CTGGCCCTGC CCCTCTCAGC TACTCATCCA
 50 6701 TCCAACACAC CTTTCTAAGT ACCTCTCTCT GCCTACACTC TGAAGGGGTT
 6751 CAGGAGTAAC TAACACAGCA TCCCTTCCCT CAAATGACTG ACAATCCCTT
 55 6801 TGTCTTGCTT TGTTTTTCTT TCCAGTCAGT ACTGGGAAAG TGGGGAAGGA
 6851 CAGTCATGGA GAAACTACAT AAGGAAGCAC CTTGCCCTTC TGCCCTCTGA
 6901 GAATGTTGAT GAGTATCAAA TCTTTCAAAC TTTGGAGGTT TGAGTAGGGG
 60 6951 TGAGACTCAG TAATGTCCCT TCCAATGACA TGAACCTGCT CACTCATCCC
 7001 TGGGGGCCAA ATTGAACAAT CAAAGGCAGG CATAATCCAG CTATGAATTC
 7051 TAGGATCGAT CCAGACATGA TAAGATACAT TGATGAGTTT GGACAAACCA

ES 2 341 341 T3

7101 CAACTAGAAT GCAGTGAAAA AAATGCTTTA TTTGTGAAAT TTGTGATGCT
 7151 ATTGCTTTAT TTGTAACCAT TATAAGCTGC AATAACAAG TTAACAACAA
 5 7201 CAATTGCATT CATTTTATGT TTCAGGTTCA GGGGGAGGTG TGGGAGGTTT
 7251 TTTAAAGCAA GTAAAACCTC TACAAATGTG GTATGGCTGA TTATGATCTC
 7301 TAGTCAAGGC ACTATACATC AAATATTCCT TATTAACCCC TTTACAAATT
 10 7351 AAAAAGCTAA AGGTACACAA TTTTGTAGCA TAGTTATTAA TAGCAGACAC
 7401 TCTATGCCTG TGTGGAGTAA GAAAAAACAG TATGTTATGA TTATAACTGT
 7451 TATGCCTACT TATAAAGGTT ACAGAATATT TTTCCATAAT TTTCTTGTAT
 15 7501 AGCAGTGCAG CTTTTTCCTT TGTGGTGTAA ATAGCAAAGC AAGCAAGAGT
 7551 TCTATTACTA AACACAGCAT GACTCAAAAA ACTTAGCAAT TCTGAAGGAA
 7601 AGTCCTTGGG GTCTTCTACC TTTCTCTTCT TTTTGTGAGG AGTAGAATGT
 20 7651 TGAGAGTCAG CAGTAGCCTC ATCATCACTA GATGGCATT TTTCTGAGCA
 7701 AAACAGGTTT TCCTCATTAAGGCAATCCA CCACTGCTCC CATTTCATCAG
 7751 TTCCATAGGT TGGAACTTAA AATACACAAA CAATTAGAAT CAGTAGTTTA
 25 7801 ACACATTATA CACTTAAAAA TTTTATATTT ACCTTAGAGC TTTAAATCTC
 7851 TGTAGGTAGT TTGTCCAATT ATGTCACACC ACAGAAGTAA GGTTCCTTCA
 7901 CAAAGATCCG GGACCAAAGC GGCCATCGTG CCTCCCCACT CCTGCAGTTC
 30 7951 GGGGGCATGG ATGCGCGGAT AGCCGCTGCT GGTTCCTTGG ATGCCGACGG
 8001 ATTTGCACTG CCGGTAGAAC TCCGCGAGGT CGTCCAGCCT CAGGCAGCAG
 8051 CTGAACCAAC TCGCGAGGGG ATCGAGCCCG GGGTGGGCGA AGAACTCCAG
 35 8101 CATGAGATCC CCGCGCTGGA GGATCATCCA GCCGGCGTCC CGGAAAACGA
 8151 TTCCGAAGCC CAACCTTTCA TAGAAGGCGG CCGTGGAATC GAAATCTCGT
 8201 GATGGCAGGT TGGGCGTCCG TTGGTCCGTC ATTTCGAACC CCAGAGTCCC
 40 8251 GCTCAGAAGA ACTCGTCAAG AAGGCGATAG AAGGCGATGC GCTGCGAATC
 8301 GGGAGCGGCG ATACCGTAAA GCACGAGGAA GCGGTCAGCC CATTGCGCGC
 8351 CAAGCTCTTC AGCAATATCA CGGGTAGCCA ACGCTATGTC CTGATAGCGG
 45 8401 TCCGCCACAC CCAGCCGGCC ACAGTCGATG AATCCAGAAA AGCGGCCATT
 8451 TTCCACCATG ATATTCGGCA AGCAGGCATC GCCATGGGTC ACGACGAGAT
 8501 CCTCGCCGTC GGGCATGCGC GCCTTGAGCC TGGCGAACAG TTGGGCTGGC
 50 8551 GCGAGCCCTT GATGCTCTTC GTCCAGATCA TCCTGATCGA CAAGACCGGC
 8601 TTCCATCCGA GTACGTGCTC GCTCGATGCG ATGTTTCGCT TGGTGGTCCA
 8651 ATGGGCAGGT AGCCGGATCA AGCGTATGCA GCGGCCGCAT TGCATCAGCC
 55 8701 ATGATGGATA CTTTCTCGGC AGGAGCAAGG TGAGATGACA GGAGATCCTG
 8751 CCCCAGGCACT TCGCCCAATA GCAGCCAGTC CCTTCCCGCT TCAGTGACAA
 8801 CGTCGAGCAC AGCTGCGCAA GGAACGCCCG TCGTGGCCAG CCAAGATAGC
 60 8851 CGCGCTGCCT CGTCTGCGAG TTCATTGAGG GCACCGGACA GGTGCGTCTT
 8901 GACAAAAAGA ACCGGGCGCC CCTGCGCTGA CAGCCGAAC ACGGCGGCAT

65

ES 2 341 341 T3

```

8951 CAGAGCAGCC GATTGTCTGT TGTGCCCACT CATAGCCGAA TAGCCTCTCC
9001 ACCCAAGCGG CCGGAGAACC TGGGTGCAAT CCATCTTGTT CAATCATGCG
9051 AAACGATCCT CATCTGTCT CTTGATCAGA TCTTGATCCC CTGCGCCATC
9101 AGATCCFTGG CCGCAAGAAA GCCATCCAGT TTAATTTGCA GGGCTTCCCA
9151 ACCTTACCAG AGGGCGCCCC AGCTGGCAAT TCCGGTTCGC TTGCTGTCCA
9201 TAAAACCGCC CAGTCTAGCT ATCGCCATGT AAGCCCACTG CAAGCTACCT
9251 GCTTTCTCTT TCGCCTTGCG TTTTCCCTTG TCCAGATAGC CCAGTAGCTG
9301 ACATTTCATCC GGGGTCAGCA CCGTTTCTGC GGAATGGCTT TCTACGTGTT
9351 CCGCTTCCTT TAGCAGCCCT TCGGCCCTGA GTGCTTGCGG CAGCGTGAAG

```

SEQ ID NO: 18

Secuencia de nucleótido del vector de expresión HCMV-K HuAb-VL1 hum V2 (secuencia de ADN completa de un vector de expresión de cadena liviana humanizada que comprende la SEQ ID NO: 13 (hum V2 = VLm) de 3926-4246)

```

1 CTAGCTTTTT GCAAAAGCCT AGGCCTCCAA AAAAGCCTCC TCACTACTTC
51 TGGAAATAGCT CAGAGGCCGA GCGGCCCTCG GCCTCTGCAT AAATAAAAAA
101 AATTAGTCAG CCATGGGGCG GAGAATGGGC GGAAGTGGGC GGAGTTAGGG
151 GCGGGATGGG CCGAGTTAGG GCGGGGACTA TGGTTGCTGA CTAATTGAGA
201 TGCATGCTTT GCATACTTCT GCCTGCTGGG GAGCCTGGTT GCTGACTAAT
251 TGAGATGCAT GCTTTGCATA CTTCTGCCTG CTGGGGAGCC TGGGGACTTT
301 CCACACCCTA ACTGACACAC ATTCCACAGC TGCCTCGCGC GTTTCGGTGA
351 TGACGGTGAA AACCTCTGAC ACATGCAGCT CCGGGAGACG GTCACAGCTT
401 GTCTGTAAGC GGATGCGGGG AGCAGACAAG CCGGTCAGGG CGCGTCAGCG
451 GGTGTTGGCG GGTGTCGGGG CCGAGCCATG ACCCAGTCAC GTAGCGATAG
501 CGGAGTGTAT ACTGGCTTAA CTATGCGGCA TCAGAGCAGA TTGTACTGAG
551 AGTGACCCAT ATGCGGTGTG AAATACCGCA CAGATGCGTA AGGAGAAAAT
601 ACCGCATCAG GCGCTCTTCC GCTTCCTCGC TCACTGACTC GCTGCGCTCG
651 GTCGTTCCGC TCGGCGGAGC GGTATCAGCT CACTCAAAGG CGGTAATACG
701 GTTATCCACA GAATCAGGGG ATAACGCAGG AAAGAACATG TGAGCAAAAG
751 GCCAGCAAAA GGCCAGGAAC CGTAAAAAGG CCGCGTTGCT GCGGTTTTTC
801 CATAGGCTCC GCGCCCTGTA CGAGCATCAC AAAAATCGAC GCTCAAGTCA
851 GAGGTGGCGA AACCCGACAG GACTATAAAG ATACCAGGCG TTTCCCGCTG
901 GAAGCTCCCT CGTGCGCTCT CCTGTTCCGA CCGTCCCGCT TACCGGATAC
951 CTGTCCGCCT TTCTCCCTTC GGGAAAGCGT GCGCTTTCTC ATAGCTCAGC
1001 CTGTAGGTAT CTCAGTTCCG TGTAGGTCGT TCGCTCCAAG CTGGGCTGTG

```

ES 2 341 341 T3

1051 TGCACGAACC CCCCGTTGAG CCGGACCGCT GCGCCTTATC CGGTAACATAT
 1101 CGTCTTGAGT CCAACCCCGT AAGACACGAC TTATCGCCAC TGGCAGCAGC
 5 1151 CACTGGTAAC AGGATTAGCA GAGCGAGGTA TGTAGGCGGT GCTACAGAGT
 1201 TCTTGAAGTG GTGGCCTAAC TACGGCTACA CTAGAAGGAC AGTATTTGGT
 1251 ATCTGCGCTC TGCTGAAGCC AGTTACCTTC GGAAAAAGAG TTGGTAGCTC
 10 1301 TTGATCCGGC AAACAAACCA CCGCTGGTAG CCGTGGTTTT TTTGTTTGCA
 1351 AGCAGCAGAT TACGCGCAGA AAAAAAGGAT CTCAAGAAGA TCCTTTGATC
 1401 TTTTCTACGG GGTCTGACGC TCAGTGGAAC GAAAACTCAC GTTAAGGGAT
 15 1451 TTTGGTCATG AGATTATCAA AAAGGATCTT CACCTAGATC CTTTAAATT
 1501 AAAAATGAAG TTTTAAATCA ATCTAAAGTA TATATGAGTA AACTTGGTCT
 1551 GACAGTTACC AATGCTTAAT CAGTGAGGCA CCTATCTCAG CGATCTGTCT
 20 1601 ATTTGCTTCA TCCATAGTTG CCTGACTCCC CGTCGTGTAG ATAACTACGA
 1651 TACGGGAGGG CTTACCATCT GGGCCAGTG CTGCAATGAT ACCGCGAGAC
 1701 CCACGCTCAC CGGCTCCAGA TTTATCAGCA ATAAACCAGC CAGCCGGAAG
 25 1751 GGCCGAGCGC AGAAGTGGTC CTGCAACTTT ATCCGCCTCC ATCCAGTCTA
 1801 TTAATTGTTG CCGGGAAGCT AGAGTAAGTA GTTCGCCAGT TAATAGTTTG
 1851 CGCAACGTTG TTGCCATTGC TGCAGGCATC GTGGTGTAC GCTCGTCGTT
 30 1901 TGGTATGGCT TCATTGAGCT CCGGTTCCCA ACGATCAAGG CGAGTTACAT
 1951 GATCCCCCAT GTTGTGCAAA AAAGCGGTTA GCTCCTTCGG TCCTCCGATC
 2001 GTTGTGAGAA GTAAGTTGGC CGCAGTGTTA TCACTCATGG TTATGGCAGC
 35 2051 ACTGCATAAT TCTCTTACTG TCATGCCATC CGTAAGATGC TTTTCTGTGA
 2101 CTGGTGAGTA CTCAACCAAG TCATTCTGAG AATAGTGTAT GCGGCGACCG
 2151 AGTTGCTCTT GCGCGGCGTC AACACGGGAT AATACCGCGC CACATAGCAG
 40 2201 AACTTTAAAA GTGCTCATCA TTGGAAAACG TTCTTCGGGG CGAAAACTCT
 2251 CAAGGATCTT ACCGCTGTTG AGATCCAGTT CGATGTAACC CACTCGTGCA
 2301 CCCAACTGAT CTTGAGCATC TTTTACTTTC ACCAGCGTTT CTGGGTGAGC
 45 2351 AAAACAGGA AGGCAAAATG CCGCAAAAAA GGAATAAGG GCGACACGGA
 2401 AATGTTGAAT ACTCATACTC TTCTTTTTTC AATATTATTG AAGCATTAT
 2451 CAGGGTTATT GTCTCATGAG CGGATACATA TTTGAATGTA TTTAGAAAAA
 50 2501 TAAACAAATA GGGGTTCCGC GCACATTTCC CCGAAAAGTG CCACCTGACG
 2551 TCTAAGAAAC CATTATTATC ATGACATTAA CCTATAAAA TAGGCGTATC
 2601 ACGAGGCCCT TTCGTCTTCA AGAATTCAGC TTGGCTGCAG TGAATAATAA
 55 2651 AATGTGIGTT TGTCCGAAAT ACGCGTTTTG AGATTTCTGT CGCCGACTAA
 2701 ATTCATGTCG CGCGATAGTG GTGTTTATCG CCGATAGAGA TGGCGATATT
 2751 GGAAAAATCG ATATTTGAAA ATATGGCATA TTGAAAATGT CGCCGATGTG
 60 2801 AGTTTCTGTG TAACTGATAT CGCCATTTTT CCAAAAGTGA TTTTGGGCA
 2851 TACGCGATAT CTGGCGATAG CGCTTATATC GTTTACGGGG GATGGCGATA

65

ES 2 341 341 T3

2901 GACGACTTTG GTGACTTGGG CGATCTCTGTG TGTGCGAAAT ATCGCAGTTT
 2951 CGATATAGGT GACAGACGAT ATGAGGCTAT ATCGCCGATA GAGGCGACAT
 5 3001 CAAGCTGGCA CATGGCCAAT GCATATCGAT CTATACATTG AATCAATATT
 3051 GGCCATTAGC CATATTATTG ATTGCTTATA TAGCATAAAT CAATATTGGC
 3101 TATTGGCCAT TGCATACGTT GTATCCATAT CATAATATGT ACATTTATAT
 10 3151 TGGCTCATGT CCAACATTAC CGCCATGTTG ACATTGATTA TTGACTAGTT
 3201 APTAATAGTA ATCAATTACG GGGTCATTAG TTCATAGCCC ATATATGGAG
 3251 TTCCGCGTTA CATAACTTAC GGTAAATGGC CCGCCTGGCT GACCGCCCAA
 15 3301 CGACCCCCGC CCATTGACGT CAATAATGAC GTATGTTCCC ATAGTAACGC
 3351 CAATAGGGAC TTTCATTGA CGTCAATGGG TGGAGTATTT ACGGTAAACT
 3401 GCCCACTTGG CAGTACATCA AGTGTATCAT ATGCCAAGTA CGCCCCCTAT
 20 3451 TGACGTCAAT GACGGTAAAT GGCCCGCCTG GCATTATGCC CAGTACATGA
 3501 CCTTATGGGA CTTTCCTACT TGGCAGTACA TCTACGTATT AGTCATCGCT
 3551 ATTACCATGG TGATGCGGTT TTGGCAGTAC ATCAATGGGC GTGGATAGCG
 25 3601 GTTTGACTCA CGGGGATTTG CAAGTCTCCA CCCCATTGAC GTCAATGGGA
 3651 GTTTGTTTTG GCACCAAAT CAACGGGACT TTCCAAAATG TCGTAACAAC
 3701 TCCGCCCCAT TGACGCAAAT GGGCGGTAGG CGTGTACGGT GGGAGGTCTA
 30 3751 TATAAGCAGA GCTCGTTTAG TGAACCGTCA GATCGCCTGG AGACGCCATC
 3801 CACGCTGTTT TGACCTCCAT AGAAGACACC GGGACCGATC CAGCCTCCGC
 3851 AAGCTTGCCG CCACCATGGA GACCCCGGCC CAGCTGCTGT TCCTGCTGCT
 35 3901 GCTGTGGCTG CCGACACCA CCGCGGACAT TCTGCTGACC CAGTCTCCAG
 3951 CCACCCCTGTC TCTGAGTCCA GGAGAAAGAG CCACTTTCTC CTGCAGGGCC
 4001 AGTCAGAAAC TTGGCACAAG CATAAGTGG TATCAACAAA AAACAAATGG
 40 4051 TGCTCCAAGG CTTCTCATAA GGTCTTCTTC TGAGTCTATC TCTGGGATCC
 4101 CTTCCAGGTT TAGTGGCAGT GGATCAGGGA CAGATTTTAC TCTTACCATC
 4151 AGCAGTCTGG AGCCTGAAGA TTTTGCAGTG TATTACTGTC AACAAAGTAA
 45 4201 TACCTGGCCA TTCACGTTG GCCAGGGGAC CAAGCTGGAG ATCAAACGTG
 4251 AGTATTCTAG AAAGATCCTA GAATTCCTAA CTCTGAGGGG GTCGGATGAC
 4301 GTGGCCATTG TTGCCTAAA GCATTGAGTT TACTGCAAGG TCAGAAAAGC
 50 4351 ATGCAAAGCC CTCAGAATGG CTGCAAAGAG CTCCAACAAA ACAATTTAGA
 4401 ACTTTATTAA GGAATAGGGG GAAGCTAGGA AGAAACTCAA AACATCAAGA
 4451 TTTTAAATAC GCTTCTTGGT CTCCTTGCTA TAATTATCTG GGATAAGCAT
 55 4501 GCTGTTTTCT GTCTGTCCCT AACATGCCCT GTGATTATCC GCAAACAACA
 4551 CACCCAAGGG CAGAACTTTG TTAATTAAAC ACCATCCTGT TTGCTTCTTT
 4601 CCTCAGGAAC TGTGGCTGCA CCATCTGTCT TCATCTTCCC GCCATCTGAT
 60 4651 GAGCAGTTGA AATCTGGAAC TGCTCTGTGT GTGTGCCTGC TGAATAACTT
 4701 CTATCCCAGA GAGGCCAAAG TACAGTGGAA GGTGGATAAC GCCCTCCAAT

65

ES 2 341 341 T3

4751 CCGGTAAGTC CCAGGAGAGT GTCACAGAGC AGGACAGCAA GGACAGCACC
 4801 TACAGCCTCA GCAGCACCCT GACGCTGAGC AAAGCAGACT ACGAGAAACA
 5 4851 CAAAGTCTAC GCCTGCGAAG TCACCCATCA GGGCCTGAGC TCGCCCGTCA
 4901 CAAAGAGCTT CAACAGGGGA GAGTGTTAGA GGGAGAAGTG CCCCCACCTG
 4951 CTCCTCAGTT CCAGCCTGAC CCCCTCCCAT CCTTTGGCCT CTGACCCITT
 10 5001 TTCCACAGGG GACCTACCCC TATTGCGGTC CTCCAGCTCA TCTTTCACCT
 5051 CACCCCCCTC CTCCTCCTTG GCTTTAATTA TGCTAATGTT GGAGGAGAAT
 5101 GAATAAATAA AGTGAATCTT TGCACCTGTG GTTTCTCTCT TTCTCATTT
 15 5151 AATAATTATT ATCTGTTGTT TACCAACTAC TCAATTTCTC TTATAAGGGA
 5201 CTAAATATGT AGTCATCCTA AGGCGCATAA CCATTTATAA AAATCATCCT
 5251 TCATTCTATT TTACCCCTATC ATCCTCTGCA AGACAGTCCT CCCTCAAACC
 20 5301 CACAAGCCTT CTGTCCTCAC AGTCCCCTGG GCCATGGTAG GAGAGACTTG
 5351 CTTCCCTTGT TTCCCCCTCT CAGCAAGCCC TCATAGTCCT TTTTAAGGGT
 5401 GACAGGTCTT ACAGTCATAT ATCCTTTGAT TCAATTCCCT GAGAATCAAC
 25 5451 CAAAGCAAAT TTTTCAAAAG AAGAAACCTG CTATAAAGAG AATCATTCAT
 5501 TGCAACATGA TATAAAATAA CAACACAATA AAAGCAATTA AATAAACAAA
 5551 CAATAGGGAA ATGTTTAAGT TCATCATGGT ACTTAGACTT AATGGAATGT
 30 5601 CATGCCTTAT TTACATTTTT AAACAGGTAC TGAGGGACTC CTGTCTGCCA
 5651 AGGECCTGAT TGAGTACTTT CCACAACCTA ATTTAATCCA CACTATACTG
 5701 TGAGATTAAA AACATTCAAT AAAATGTTGC AAAGGTTCTA TAAAGCTGAG
 35 5751 AGACAAATAT ATTCTATAAC TCAGCAATCC CACTTCTAGA TGACTGAGTG
 5801 TCCCCACCCA CCAAAAAACT ATGCAAGAAT GTTCAAAGCA GCTTTATTTA
 5851 CAAAAGCCAA AAATTGGAAA TAGCCCGATT GTCCAACAAT AGAATGAGTT
 40 5901 ATTAAACTGT GGTATGTTTA TACATTAGAA TACCCAATGA GGAGAATTAA
 5951 CAAGCTACAA CTATACCTAC TCACACAGAT GAATCTCATA AAAATAATGT
 6001 TACATAAGAG AAACTCATG CAAAAGATAT GTTCTGTATG TTTTCATCCA
 45 6051 TATAAAGTTC AAAACCAGGT AAAAATAAAG TTAGAAATTT GGATGGAAAT
 6101 TACTCTTAGC TGGGGGTGGG CGAGTTAGTG CCTGGGAGAA GACAAGAAGG
 6151 GGCTTCTGGG GTCTTGSTAA TGTTCTGTTC CTCGTGTGGG GTTGTGCAGT
 50 6201 TATGATCTGT GCACTGTTCT GTATACACAT TATGCTTCAA AATAACTTCA
 6251 CATAAAGAAC ATCTTATACC CAGTTAATAG ATAGAAGAGG AATAAGTAAT
 6301 AGGTCAAGAC CACGCAGCTG GTAAGTGGGG GGGCCTGGGA TCAAATAGCT
 55 6351 ACCTGCCCTA TCCTGCCCTC TTGAGCCCTG AATGAGTCTG CCTTCCAGGG
 6401 CTCAAGGTGC TCAACAAAAC AACAGGCCTG CTATTTTCCT GGCATCTGTG
 6451 CCCTGTTTGG CTAGCTAGGA GCACACATAC ATAGAAATTA AATGAAACAG
 60 6501 ACCTTCAGCA AGGGGACAGA GGACAGAATT AACCTTGCCC AGACACTGGA
 6551 AACCCATGTA TGAACACTCA CATGTTTGGG AAGGGGGAAG GGCACATGTA

65

ES 2 341 341 T3

6601 AATGAGGACT CTTCTTCATT CTATGGGGCA CTCTGGCCCT GCCCCTCTCA
 6651 GCTACTCATC CATCCAACAC ACCTTTCTAA GTACCTCTCT CTGCCTACAC
 5 6701 TCTGAAGGGG TTCAGGAGTA ACTAACACAG CATCCCTTCC CTCAAATGAC
 6751 TGACAATCCC TTTGTCTGTC TTTGTTTTTC TTTCCAGTCA GTACTGGGAA
 6801 AGTGGGGAAG GACAGTCATG GAGAACTAC ATAAGGAAGC ACCTTGGCCCT
 10 6851 TCTGCCTCTT GAGAATGTTG ATGAGTATCA AATCTTTCAA ACTTTGGAGG
 6901 TTTGAGTAGG GGTGAGACTC AGTAATGTCC CTTCCAATGA CATGAACTTG
 6951 CTCCTCATC CCTGGGGGCC AAATTGAACA ATCAAAGGCA GGCATAATCC
 15 7001 AGCTATGAAT TCTAGGATCG ATCCAGACAT GATAAGATAC ATTGATGAGT
 7051 TTGGACAAAC CACAAC TAGA ATGCAGTGAA AAAAATGCTT TATTTGTGAA
 7101 ATTTGTGATG CTATTGCTTT ATTTGTAACC ATTATAAGCT GCAATAAACA
 20 7151 AGTTAACAAC AACAATTGCA TTCATTTTAT GTTTCAGGTT CAGGGGGAGG
 7201 TGTGGGAGGT TTTTTAAAGC AAGTAAACC TCTACAAATG TGGTATGGCT
 7251 GATTATGATC TCTAGTCAAG GCACTATACA TCAAATATTC CTTATTAACC
 25 7301 CCTTTACAAA TAAAAAGCT AAAGGTACAC AATTTTGTAG CATAGTTATT
 7351 AATAGCAGAC ACTCTATGCC TGTGTGGAGT AAGAAAAAAC AGTATGTTAT
 7401 GATTATAACT GTTATGCCTA CTTATAAAGG TTACAGAATA TTTTCCATA
 30 7451 ATTTTCTTGT ATAGCAGTGC AGCTTTTTCC TTTGTGGTGT AAATAGCAAA
 7501 GCAAGCAAGA GTTCTATTAC TAAACACAGC ATGACTCAAA AAACCTAGCA
 7551 ATTCTGAAGC AAAGTCCTTG GGGTCTTCTA CCTTCTCTT CTTTTTTGGA
 35 7601 GGAGTAGAAT GTTGAGAGTC AGCAGTAGCC TCATCATCAC TAGATGGCAF
 7651 TTCTTCTGAG CAAAACAGGT TTTCTTCATT AAAGGCATTC CACCACTGCT
 7701 CCCATTCTATC AGTTCCATAG GTTGGAACTT AAAATACACA AACCAATTAGA
 40 7751 ATCAGTAGTT TAACACATTA TACACTTAAA AATTTTATAT TTACCTTAGA
 7801 GCTTTAAATC TCTGTAGGTA GTTTGTCCAA TTATGTCACA CCACAGAAGT
 7851 AAGGTTCTCT CACAAAGATC CGGGACCAAA GCGGCCATCG TGCCTCCCCA
 45 7901 CTCCTGCAGT TCGGGGGCAT GGATGCGCGG ATAGCCGCTG CTGTTTCTCT
 7951 GGATGCCGAC GGATTTGCAC TGCCGGTAGA ACTCCGCGAG GTCGTCCAGC
 8001 CTCAGGCAGC AGCTGAACCA ACTCGCGAGG GGATCGAGCC CGGGGTGGGC
 50 8051 GAAGAACTCC AGCATGAGAT CCGCGCGCTG GAGGATCATC CAGCCGGCGT
 8101 CCGGGAAC GATTCCGAAG CCAACCTTT CATAGAAGGC GCGGTGGAA
 8151 TCGAAATCTC GTGATGGCAG GTTGGGCGTC GCTTGGTCGG TCATTTGAA
 55 8201 CCCCAGAGTC CCGCTCAGAA GAACTCGTCA AGAAGGCGAT AGAAGGCGAT
 8251 GCGCTGCCAA TCGGGAGCGG CGATACCGTA AAGCACGAGG AAGCGGTCAG
 8301 CCCATTGCGC GCCAAGCTCT TCAGCAATAT CACGGGTAGC CAACGCTATG
 60 8351 TCCTGATAGC GGTCCGCCAC ACCCAGCCGG CCACAGTCGA TGAATCCAGA
 8401 AAAGCGGCCA TTTTCCACCA TGATATTCGG CAAGCAGGCA TCGCCATGGG

65

ES 2 341 341 T3

8451 TCACGACGAG ATCCTCGCCG TCGGGCATGC GCGCCTTGAG CCTGGCGAAC
 8501 AGTTCGGCTG GCGCGAGCCC CTGATGCTCT TCGTCCAGAT CATCCTGATC
 8551 GACAAGACCG GCTTCCATCC GAGTACGTGC TCGCTCGATG CGATGTTTCG
 8601 CTTGGTGGTC GAATGGGCAG GTAGCCGGAT CAAGCGTATG CAGCCGCGCG
 8651 ATTGCATCAG CCATGATGGA TACTTTCTCG GCAGGAGCAA GGTGAGATGA
 8701 CAGGAGATCC TGCCCCGGCA CTTCCGCCAA TAGCAGCCAG TCCCTTCCCC
 8751 CTTCACTGAC AACGTCGAGC ACAGCTGCGC AAGGAACGCC CGTCGTGGCC
 8801 AGCCACGATA GCGCGCTGC CTCGTCTGCG AGTTCATTCA GGGCACCCGA
 8851 CAGGTCCGTC TTGACAAAAA GAACCGGGCG CCCCTGCGCT GACAGCCGGA
 8901 ACACGGCGGC ATCAGAGCAG CCGATTGTCT GTTGTGCCCC GTCATAGCCG
 8951 AATAGCCTCT CCACCCAAGC GGCCGGAGAA CCTGCGTGCA ATCCATCTTG
 9001 TTCAATCATG CGAAACGATC CTCATCCTGT CTCTTGATCA GATCTTGATC
 9051 CCCTGCGCCA TCAGATCCTT GCGGGCAAGA AAGCCATCCA GTTTACTTTG
 9101 CAGGGCTTCC CAACCTTACC AGAGGGCGCC CCAGCTGGCA ATTCCGGTTC
 9151 GCTTGTCTGT CATAAAACCG CCCAGTCTAG CTATCGCCAT GTAAGCCAC
 9201 TGCAAGCTAC CTGCTTTCTC TTTGCGCTTG CGTTTTCCCT TGTCCAGATA
 9251 GCCCAGTAGC TGACATTCAT CCGGGGTGAG CACCGTTTCT GCGSACTGGC
 9301 TTTCTACGTG TTCCGCTTCC TTTAGCAGCC CTTGCGCCCT GAGTGCTTGC
 9351 GGCAGCGTGA AG

SEQ ID NO: 31

Parte de la secuencia de cadena pesada humanizada designada VHE-N37D

EVQLVESGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYIIHWVKQE PGQGLEWIGY
ENFPYNHGTKY NEKFKGRATL TADKSISTAY MELSSLRSED TAVYYCARSG
PYAWFDTWGQ GTTVTVSS

SEQ ID NO: 32

Parte de la secuencia de cadena pesada humanizada designada VHQ-N73D

QVQLVESGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYIIHWVKQE PGQGLEWIGY
ENFPYNHGTKY NEKFKGRATL TADKSISTAY MELSSLRSED TAVYYCARSG
PYAWFDTWGQ GTTVTVSS

SEQ ID NO: 33

Secuencia de nucleótido que codifica una aminoácido de la SEQ ID NO: 8

GACATTCTGCTGACCCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTCTGAGTCCAGGAGAAAGAGCCA
 CTCTCTCCTGCAGGGGCCAGTCAGAACATTGGCACAAGCATACAGTGGTATCAACAAAA
 CCAGGTCAGGCTCCAAGGCTTCTCATAAGGTCTTCTCTGAGTCTATCTCTGGGATCCC
 TTCCAGGTTTGTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACTCTTACCATCAGCAGTCTGG
 AGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTAAGTGTCAACAAAGTAATACCTGGCCATTACAGTTC
 GGCCAGGGGACCAAGCTTGAAATCAAA

ES 2 341 341 T3

SEQ ID NO: 34

Secuencia de nucleótido que codifica un aminoácido de la SEQ ID NO: 31

5 GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCAGGAGCCGAAGTGAAAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAG
 GTGTCCTGCAAGGCCTCTGGATACACATTCACTAATTATATTATCCACTGGGTGAAGCA
 10 GGAGCCTGGTCAGGGCCTTGAATGGATTGGATATTTTAATCCTTACAATCATGGTACTA
 AGTACAATGAGAAGTTCAAAGGCAGGGCCACACTAACTGCAGACAAATCCATCAGCACA
 GCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGCGCTCTGAGGACACTGCGGTCTACTACTGTGCAA
 15 GATCAGGACCCTATGCCTGGTTTGACACCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTC
 CTCA

20 SEQ ID NO: 35

Secuencia de nucleótido que codifica un aminoácido de la SEQ ID NO: 32

25 CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCAGGAGCCGAAGTGAAAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAG
 GTGTCCTGCAAGGCCTCTGGATACACATTCACTAATTATATTATCCACTGGGTGAAGCA
 GGAGCCTGGTCAGGGCCTTGAATGGATTGGATATTTTAATCCTTACAATCATGGTACTA
 30 AGTACAATGAGAAGTTCAAAGGCAGGGCCACACTAACTGCAGACAAATCCATCAGCACA
 GCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGCGCTCTGAGGACACTGCGGTCTACTACTGTGCAA
 GATCAGGACCCTATGCCTGGTTTGACACCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTC
 CTCA

35 SEQ ID NO: 36

40 Secuencia de nucleótido de la expresión del vector LCVL1Sp20

1 CTAGAGTCCT AGAGAGGTCT GGTGGAGCCT GCAAAAGTCC AGCTTTCAA
 45 51 GGAACACAGA AGTATGTGTA TGAATATTA GAAGATGTTG CTTTTACTCT
 101 TAAGTTGGTT CCTAGGAAAA ATAGTTAAAT ACTGTGACTT TAAAATGTGA

50

55

60

65

ES 2 341 341 T3

151 GAGGGTTTTTC AAGTACTCAT TTTTTTAAAT GTCCAAAATT TTTGTCAATC
 201 AATTTGAGGT CTTGTTTGTG TAGAACTGAC ATTACTTAAA GTTTAACCGA
 5 251 GGAATGGGAG TGAGGCTCTC TCATACCCTA TTCAGAACTG ACTTTTAAACA
 301 ATAATAAATT AAGTTTAAAA TATTTTTTAAA TGAATTGAGC AATGTTGAGT
 351 TGGAGTCAAG ATGGCCGATC AGAACCAGAA CACCTGCAGC AGCTGGCAGG
 10 401 AAGCAGGTCA TGTGGCAAGG CTATTTGGGG AAGGGAAAAT AAAACCACTA
 451 GGTAAACTTG TAGCTGTGGT TTGAAGAAGT GGTTTTGAAA CACTCTGTCC
 501 AGCCCCACCA AACCGAAAGT CCAGGCTGAG CAAAACACCA CCTGGGTAAT
 15 551 TTGCATTTCT AAAATAAGTT GAGGATTGAG CCGAAACTGG AGAGGTCCTC
 601 TTTTAACTTA TTGAGTTCAA CCTTTTAATT TTAGCTTGAG TAGTTCTAGT
 651 TTCCCCAAAC TTAAGTTTAT CGACTTCTAA AATGTATTTA GAACCTCATTT
 20 701 TCAAAATTAG GTTATGTAAG AAATTGAAGG ACTTTAGTGT CTTTAATTTT
 751 TAATATATTT AGAAAACTTC TTAAAAATTAC TCTATTATTC TTCCCTCTGA
 801 TTATTGGTCT CCATTCAATT CTTTTCCAAT ACCCGAAGCA TTTACAGTGA
 25 851 CTTTGTTCAT GATCTTTTTT AGTTGTTTGT TTTGCCTTAC TATTAAGACT
 901 TTGACATTCT GGTCAAAACG GCTTCACAAA TCTTTTTCAA GACCACCTTC
 951 TGAGTATTCA TTTTAGGAGA AATACTTTTT TTTTAAATGA ATGCAATTAT
 30 1001 CTAGGACCTG CAGGCATGCT GTTTTCTGTC TGTCCCTAAC ATGCCCTGTG
 1051 ATTATCCGCA AACAAACACAC CCAAGGGCAG AACTTTGTTA CTTAAACACC
 1101 ATCCTGTTTG CTTCTTTCTT CAGGAACTGT GGCTGCACCA TCTGTCTTCA
 35 1151 TCTTCCCGCC ATCTGATGAG CAGTTGAAAT CTGGAAGTGC CTCTGTTGTG
 1201 TGCTGCTGA ATAACTTCTA TCCCAGAGAG GCCAAAGTAC AGTGAAGGT
 1251 GGATAACGCC CTCCAATCGG GTAACCTCCA GGAGAGTGTG ACAGAGCAGG
 40 1301 ACAGCAAGGA CAGCACCTAC AGCCTCAGCA GCACCCTGAC GCTGAGCAAA
 1351 GCAGACTACG AGAAACACAA AGTCTACGCC TGCGAAGTCA CCCATCAGGG
 1401 CCTGAGCTCG CCCGTCACAA AGAGCTTCAA CAGGGGAGAG TGTTAGAGGG
 45 1451 AGAAGTGCCC CCACCTGCTC CTCAGTTCCA GCCTGACCCC CTCCCATCCT
 1501 TTGGCCTCTG ACCCTTTTTT CACAGGGGAC CTACCCCTAT TGCGGTCCCTC
 1551 CAGCTCATCT TTCACCTCAC CCCCCTCCTC CTCCTTGGCT TTAATTATGC
 50 1601 TAATGTTGGA GGAGAATGAA TAAATAAAGT GAATCTTTGC ACCTGTGGTT
 1651 TCTCTCTTTC CTCATTTAAT AATTATTATC TGTGTTTTTA CCAACTACTC
 1701 AATTTCTCTT ATAAGGGACT AAATATGTAG TCATCCTAAG GCGGGATATC
 55 1751 GAGATCTGAA GCTGATCCAG ACATGATAAG ATACATTGAT GAGTTTGGAC
 1801 AAACCACAAC TAGAATGCAG TGAAAAAAAT GCTTTATTTG TGAAATTTGT
 1851 GATGCTATTG CTTTATTTGT AACCAATTATA AGCTGCAATA AACAAGTTAA
 1901 CAACAACAAT TGCATTCAAT TTATGTTTCA GGTTCAGGGG GAGGTGTGGG
 60 1951 AGGTTTTTTA AAGCAAGTAA AACCTCTACA AATGTGGTAT GGCTGATTAT

65

ES 2 341 341 T3

2001 GATCTCTAGT CAAGGCACTA TACATCAAAT ATTCCTTATT ACCCCCTTTA
 2051 CAAATTAAAA AGCTAAAGGT ACACAATTTT TGAGCATAGT TATTAATAGC
 2101 AGACACTCTA TGCCTGTGTG GAGTAAGAAA AAACAGTATG TTATGATTAT
 2151 AACTGTTATG CCTACTTATA AAGGTTACAG AATATTTTTC CATAATTTTC
 2201 TTGTATAGCA GTGCAGCTTT TTCCTTTGTG GTGTAAATAG CAAAGCAAGC
 2251 AAGAGTTCTA TTACTAAACA CAGCATGACT CAAAAAACTT AGCAATPCTG
 2301 AAGGAAAGTC CTTGGGGTCT TCTACCTTTC TCTTCTTTT TGGAGGAGTA
 2351 GAATGTTGAG AGTCAGCAGT AGCCTCATCA TCACTAGATG GCATTTCTTC
 2401 TGAGCAAAAC AGGTTTTTCT CATTAAAGGC ATTCCACCAC TGCTCCCATT
 2451 CATCAGTTCC ATAGGTTGGA ATCTAAAATA CACAAACAAT TAGAATCAGT
 2501 AGTTTAAACAC ATTATACACT TAAAAATTTT ATATTTACCT TAGAGCTTTA
 2551 AATCTCTGTA GGTAGTTTGT CCAATTATGT CACACCACAG AAGTAAGGTT
 2601 CCTTCACAAA GATCCGGACC AAAGCGGCCA TCGTGCTCC CCACTCCTGC
 2651 AGTTGGGGGG CATGGATGCG CGGATAGCCG CTGCTGGTTT CCTGGATGCC
 2701 GACGGATTTG CACTGCCGGT AGAACTCCGC GAGGTCGTCC AGCCTCAGGC
 2751 AGCAGCTGAA CCAACTCGCG AGGGGATCGA GCATCCCCCA TGGTCTTATA
 2801 AAAATGCATA GCTTTAGGAG GGGAGCAGAG AACTTGAAAG CATCTTCCTG
 2851 TTAGTCTTTC TTCTCGTAGA CTTCAAACCT ATACTTGATG CCTTTTTCCT
 2901 CCTGGACCTC AGAGAGGACG CCTGGGTATT CTGGGAGAAG TTTATATTTT
 2951 CCCAAATCAA TTTCTGGGAA AATCGTGTCA CTTTCAAATT CCTGCATGAT
 3001 CCTTGTCA CAAGAGTCTGA GGTGGCCTGG TTGATTGATG GCTTCCTGGT
 3051 AAACAGAACT GCCTCCGACT ATCCAAACCA TGTCTACTTT ACTTGCCAAT
 3101 TCCGGTTGTT CAATAAGTCT TAAGGCATCA TCCAAACTTT TGGCAAGAAA
 3151 ATGAGCTCCT CGTGGTGGTT CTTGAGTTC TCTACTGAGA ACTATATTAA
 3201 TTCTGTCTTT TAAAGGTGGA TTCTTCTCAG GAATGGAGAA CCAGGTTTTT
 3251 CTACCCATAA TCACCAGATT CTGTTTACCT TCCACTGAAG AGGTTGTGGT
 3301 CATTTTGTGG AAGTACTTGA ACTCGTTCCT GAGCGGAGGC CAGGGTCCGT
 3351 CTCCGTTCCT GCCAATCCCC ATATTTTGGG ACACGGCGAC GATGCAGTTC
 3401 AATGGTGGAA CCATGATGGC AGCGGGGATA AAATCCTACC AGCCTTCACG
 3451 CTAGGATTGC CGTCAAGTTT GGGGGTACCG AGCTCGAATT AGCTTTTTCG
 3501 AAAAGCCTAG GCCTCCAAA AAGCCTCCTC ACTACTTCTG GAATAGCTCA
 3551 GAGGGCCGAG GCGGCCTCGG CCTCTGCATA AATAAAAAAA ATTAGTCAGC
 3601 CATGGGGCGG AGAATGGGCG GAACTGGGCG GAGTTAGGGG CGGGATGGGC
 3651 GGAGTTAGGG GCGGGACTAT GGTGCTGAC TAATTGAGAT GCATGCTTTG
 3701 CATACTTCTG CCTGCTGGGG AGCCTGGGGA CTTTCCACAC CTGGTTGCTG
 3751 ACTAATTGAG ATGCATGCTT TGCATACTTC TGCCTGCTGG GGAGCCTGGG
 3801 GACTTTCCAC ACCCTAACTG ACACACATTC CACAGCTGCC TCGCGCGTTT

ES 2 341 341 T3

3851 CCGTGATGAC GGTGAAAACC TCTGACACAT GCAGCTCCCG GAGACGGTCA
 3901 CAGCTTGTCT GTAAGCGGAT GCCGGGAGCA GACAAGCCCG TCAGGGCGCG
 5 3951 TCAGCGGGTG TTGGCGGGTG TCGGGGCGCA GCCATGACCC AGTCACGTAG
 4001 CGATAGCGGA GTGTATACTG GCTTAACTAT GGGGCATCAG AGCAGATTGT
 4051 ACTGAGAGTG CACCATATGC GGCCGCATAT GCGGTGTGAA ATACCGCACA
 10 4101 GATGCGTAAG GAGAAAATAC CGCATCAGGC GCTCTTCCGC TTCCTCGCTC
 4151 ACTGACTCGC TGGGCTCGGT CGTTCGGCTG CGGCGAGCGG TATCAGCTCA
 4201 CTCAAAGGCG GTAATACGGT TATCCACAGA ATCAGGGGAT AACGCAGGAA
 15 4251 AGAACATGTG AGCAAAAGGC CAGCAAAAGG CCAGGAACCG TAAAAAGGCC
 4301 GCGTTGCTGC CGTTTTTCCA TAGGCTCCGC CCCCTGACG AGCATCACAA
 4351 AAATCGACGC TCAAGTCAGA GGTGGCGAAA CCGACAGGA CTATAAAGAT
 20 4401 ACCAGGCGTT TCCCCCTGGA AGCTCCCTCG TCGGCTCTCC TGTTCGGACC
 4451 CTGCCGCTTA CCGGATACCT GTCCGCCTTT CTCCCTTCGG GAAGCGTGGC
 4501 GCTTTCTCAT AGCTCACGCT GTAGGTATCT CAGTTCGGTG TAGGTCGTTT
 25 4551 GCTCCAAGCT GGGCTGTGTG CACGAACCCC CCGTTCAGCC CGACCGCTGC
 4601 GCCTTATCCG GTAACATATG TCTTGAGTCC AATCCGGTAA GACACGACTT
 4651 ATCGCCACTG GCAGCAGCCA CTGGTAACAG GATTAGCAGA GCGAGGTATG
 30 4701 TAGGCGGTGC TACAGAGTTC TTGAAGTGGT GGCCTAACTA CGGCTACACT
 4751 AGAAGGACAG TATTTGGTAT CTGCGCTCTG CTGAAGCCAG TTACCTTCGG
 4801 AAAAAGAGTT GGTAGCTCTT GATCCGGCAA ACAAACCACC GCTGGTAGCG
 35 4851 GTGGTTTTTT TGTTTGCAAG CAGCAGATTA CGCGCAGAAA AAAAGGATCT
 4901 CAAGAAGATC CTTTGATCTT TTCTACGGGG TCTGACGCTC AGTGGAAACGA
 4951 AAATTCACGT TAAGGGATTT TGGTCATGAG ATTATCAAAA AGGATCTTCA
 40 5001 CCTAGATCCT TTTAAATTAA AAATGAAGTT TTAAATCAAT CTAAAGTATA
 5051 TATGAGTAAA CTTGGTCTGA CAGTTACCAA TGCTTAATCA GTGAGGCACC
 5101 TATCTCAGCG ATCTGTCTAT TTCGTTTATC CATAGTTGCC TGACTCCCCG
 45 5151 TCGTGTAGAT AACTACGATA CGGGAGGGCT TACCATCTGG CCCAGTGTCT
 5201 GCAATGATAC CGGAGAGCCC ACGCTCACC GCTCCAGATT TATCAGCAAT
 5251 AAACCAGCCA GCGGAAGGG CCGAGCGCAG AAGTGGTCTT GCAACTTTAT
 50 5301 CCGCCTCCAT CCAGTCTATT AATTGTTGCC GGGAAAGCTAG AGTAAGTAGT
 5351 TCGCCAGTTA ATAGTTTGGC CAACGTTGTT GCCATTGCTG CAGGCATCGT
 5401 GGTGTCACGC TCGTCGTTTG GTATGGCTTC ATTCAGCTCC GGTCCCAAC
 55 5451 GATCAAGGCG AGTTACATGA TCCCCATGT TGTGCAAAA AGCGGTTAGC
 5501 TCCTTCGGTC CTCCGATCGT TGTCAGAAGT AAGTTGGCCC CAGTGTATC
 5551 ACTCATGGTT ATGGCAGCAC TGCATAATC TCTTACTGTC ATGCCATCCG
 60 5601 TAAGATGCTT TTCTGTGACT GGTGAGTACT CAACCAAGTC ATTCTGAGAA
 5651 TAGTGTATGC GCGGACCGAG TTGCTCTTGC CCGGCGTCAA CACGGGATAA

65

ES 2 341 341 T3

5701 TACCGCGCCA CATAGCAGAA CTTTAAAAGT GCTCATCATT GGAAAACGTT
5751 CTTCGGGGCG AAAACTCTCA AGGATCTTAC CGCTGTTGAG ATCCAGTTOG
5 5801 ATGTAACCCA CTCGTGCACC CAACTGATCT TCAGCATCTT TTACTTTTCA
5851 CAGCGTTTCT GGGTGAGCAA AAACAGGAAG GCAAAATGCC GCAAAAAAGG
5901 GAATAAGGGC GACACGGAAA TGTGAATAC TCATACTCTT CCTTTTTC
10 5951 TATTATTGAA GCATTTATCA GGGTTATTGT CTCATGAGCG GATACATATT
6001 TGAATGTATT TAGAAAAATA AACAAATAGG GGTTCGCGC ACATTTCCCC
6051 GAAAAGTGCC ACCTGACGTC TAAGAAACCA TTATTATCAT GACATTAAAC
15 6101 TATAAAAATA GCGGTATCAC GAGGCCCTTT CGTCTTCAAG AATTCAGCTG
6151 CTCGAGGAAG AGCTCAAACC CATGCTACTC TCTGGCTTGA TGGAAAGCAAC
6201 GCTTTCATAG CTGAGCTGTC ATAAATAATA AAGAGATTTT TTTATTAATA
20 6251 TTGAAAAGAT GGGTTATTTA TGTAAGACTC TGTCTTCATT TTA AAAACCA
6301 CACCTTCCAG TAGTATTCTG TTACTGTTCT GGCAATCACT GTGATCAAGA
6351 AGCTACACGG TGAGTTGTGC TTCTCAGTCC TAAGGGATAC ATCTACAAGA
25 6401 GGCTCCCATATA CTCGAAGCTC AGGAAACATT GTAGAAAAGG AGGC AAAAGA
6451 CTGACAGAGC CAGAGGACCA AGAAATTTGT TGTGAGGTTG TGTCTCTAC
6501 TAACAATATA AGCAATATCT ATAAATTGTT GATATCATGG CTACTAAAT
30 6551 GTGAGTTGAA CGAGGAGGAC ACAAATGAAC ATGACAATCA GAATGAGGCC
6601 TCTCACCTGC AAAAAACACT ATAGAGAAGC AGATAAAGCT GTCAGCAGAA
6651 GAGGCGCACC TCCTTATAGA AGAAGCCTAC CAGGTTTGAT ATATCAGCCT
35 6701 TGAAAACCTA CATAGTATTT ACATTATATC GAGTCTATGA GACATATTTA
6751 GTAATGCATA TGTATGTGTG TGTGTGCATG TATGTGTGTA AATACATATG
6801 TTCATAGAAA AATGTGTAAA AAGAGATCAT GAATTTAAGA GAGAACTGGG
40 6851 ACAATTTTTT TCAGGGAGTT GTAATCAGGA AAGTTAAGG AAAATGTTG
6901 TAATTTAAAT TCAGGCTCAG AAACAAACAA AGGAAAAGAA AAAAAACAA
6951 CAACAACAAC AAAAAACAA AACAAAGGAG AAGCTGTATG GCCACAATAG
45 7001 CATCTACAGC TAACTGTGAA AGGATAATGG AACAAAGTTAT GTACTGCCTA
7051 GAGCAGTATG ATGCCTAAAT CATCTCGACA TGGAGGAAAA TAGAACAAAG
7101 ACACTCTACA TAGACTATGA TAGAAATCAA AATAAGGTGT AAGACATAGA
50 7151 ACATTAGTTT TGTGTTGTGT TCAAAGAGAC TCACATTCCC AAAAAAAT
7201 CTGTGGGATT TTACAGGTCT GCAATAAGCT GCTGACCTGA TGATTTCTGC
7251 AGCTGTGCCT ACCCTTTGCT GATTGTCATG TACCCAAAGC ATAGCTTACT
55 7301 GACATGAGGA TTTCTTCATA GTCAGGTCAC ACCCTTTGCT GGAGTCAGAA
7351 TCACACTGAT CACACACAGT CATGAGTGTG CTCACTCAGG TCCTGGCGTT
7401 GCTGCTGCTG TGGCTTACAG GTAATGAAGA CAGCACTAGA ATTTTATTGA
60 7451 GCTTCCTGTA CACTGYGCTG CTTGTCTCTG TGAAAATTCT CTTGTGAATT
7501 AATCATGTGG GGATCTGTTT TCAATTTTTC AATTGTAGGT ACGCGTTGTG

65

ES 2 341 341 T3

```

7551 ACATTCTGCT GACCCAGTCT CCAGCCACCC TGTCTCTGAG TCCAGGAGAA
7601 AGAGCCACTC TCTCCTGCAG GGCCAGTCAG AACATTGGCA CAAGCATACA
5 7651 GTGGTATCAA CAAAAACCAG GTCAGGCTCC AAGGCTTCTC ATAAGGTCTT
7701 CTTCTGAGTC TATCTCTGGG ATCCCTTCCA GGTTTAGTGG CAGTGGATCA
7751 GGGACAGATT TTA CTCTTAC CATCAGCAGT CTGGAGCCTG AAGATTTTGC
10 7801 AGTGTATTAC TGTCAACAAA GTAATACCTG GCCATTCAAG TTCGGCCAGG
7851 GGACCAAGCT TGAAATCAAA CGTAAGTAGA ATCCAAAGTC TCTTTCTTCC
7901 GTTGTCTATG TCTGTGGCTT CTAIGTCTAA AAATGATGTA TAAAATCTTA
7951 CTCTGAAACC AGATTCTGGC ACTCTCCAAG GCAAAGATAC AGAGTAACTC
15 8001 CGTAAGCAAA GCTGGGAATA GGCTAGACAT GTTCTCTGGA GAATGAATGC
8051 CAGTGTAAATA ATTAACACAA GTGATAGTTT CAGAAATGCT CTAGTT

```

SEQ ID NO: 37

Secuencia de nucleótido de la expresión del vector HCVHEN73DSp20

```

1 ctagagaggt ctggtggagc ctgcaaaagt ccagctttca aaggaacaca gaagtatgtg
61 tatggaatat tagaagatgt tgcttttact cttaagttgg ttectaggaa aaatagttaa
30 121 atactgtgac tttaaaatgt gagagggttt tcaagtactc atttttttaa atgtocaaaa
181 tttttgtcaa tcaatttgag gtcttggttg tgtagaactg acattactta aagtttaacc
241 gaggaatggg agtgaggctc tctcataccc tattcagaac tgacttttaa caataataaa
35 301 ttaagtttaa aatattttta aatgaattga gcaatgttga gttggagtca agatggccga
361 tcagaaccag aacacctgca gcagctggca ggaagcaggt catgtggcaa ggctatttgg
421 ggaaggga aaataaaacc taggtaaact tgtagctgtg gtttgaagaa gtggttttga
481 aacactctgt ccagccccac caaacgaaa gtccaggctg agcaaaacac cacctgggta
40 541 atttgcatth ctaaaataag ttgaggatth agccgaaact ggagaggtcc tcttttaact
601 tattgagttc aaccttttaa ttttagcttg agtagttcta gtttcccaa acttaagttt
661 atcagcttct aaaatgtatt taagctttct ggggcaggcc aggcctgacc ttggttttgg
721 ggcaggaggg gggctaaggt gaggcagggt ggcacagcca ggtgcacacc caatgcccac
45 781 gagcccagac actggacgct gaacctgcg gacagttaag aaccagggg cctctgcgcc
841 ctgggcccag ctctgtccca caccgggtc acatggcacc acctctcttg cagcctccac
901 caagggccca tgggtcttcc cctggcacc ctcttocaag agcacctctg ggggcacagc
50 961 ggccctgggc tgccctggtc aggaactact cccgaaccg gtgacgggtg cgtggaaactc
1021 aggggccctg accagcgggc tgcacacct cccggctgtc ctacagtcct caggactcta
1081 ctccctcagc agcgtggtga cgtgcccctc cagcagcttg ggcacccaga cctacatctg
1141 caacgtgaat cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag agagtgtgtg agaggccagc
55 1201 acaggaggag aggggtgtct ctggaagcca ggctcagcgc tctgacctgg aagcatcccg
1261 gctatgcagt cccagtcagc ggcagcaagg caggcccgct ctgcctcttc acccgagggc
1321 ctctgcccgc cccactcatg ctgagggaga gggctctctg gctttttccc caggctcttg
60 1381 gcaggcacag gctaggtgac cctaaccag gccctgcaca caaaggggca ggtgctgggc
1441 tcagacctgc caagagccat atccgggagg acctgcctcc tgacctaacg ccaccccaaa

```

ES 2 341 341 T3

1501 ggccaaactc tccactccct cagctcggac accttctctc ctcccagatt ccagtaactc
 1561 ccaatcttct ctctgcagag ccaaatctt gtgacaaaac tccacatgc ccaccgtgc
 1621 caggtaagcc agcccaggcc tcgcccctca gctcaaggcg ggacagggtgc cctagagtag
 1681 cctgcattca gggacaggcc ccagctcgggt gctgacacgt ccacctccat ctcttctctc
 1741 gcacctgaac tcttgggggg accgtcagtc ttctcttctc ccccaaaacc caaggacacc
 1801 ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtgggtg tggacgtgag ccacgaagac
 1861 cctgagggtc agttcaactg gtacgtggac ggctggagg tgcataatgc caagacaaag
 1921 ccgctggagg agcagtacaa cagcagctac cgtgtggtca gctcctcac cgtcctgcac
 1981 caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggctc ccaacaaagc cctcccagcc
 2041 cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa ggtgggaccc gtgggggtgc agggccacat
 2101 ggacagaggc cggctcggcc caccctctgc cctgagagtg accgtgttac caacctctgt
 2161 cctacaggcg cagccccgag aaccacaggt gtacacctg ccccatccc gggaggagat
 2221 gaccaagaac caggtcagcc tgacctgctt ggtcaaagc ttctatccc ggcacatgc
 2281 cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaaacta aagaccacgc ctcccgtgt
 2341 ggactccgac ggctccttct tctctatag caagctcacc gtggacaaga gcagggtgga
 2401 gcagggggaa gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaaac actacacgca
 2461 gaagagcttc tctctgtccc cgggtaaatg agtgcgacgg ccggcaagcc cccgtctccc
 2521 gggtctctgc ggtcgcacga ggtatgcttg caactacccc gtctacatac tcccaggca
 2581 cccagcatgg aaataaagca cccaccactg ccttgggccc ctgcgagact gtgatgggtc
 2641 tttccacggg ccaggccgag tctgaggcct gagtggcatg agggaggcag agcgggtccc
 2701 actgtcccca cactggccca ggtgtgtag gtgtgcttgg ggcgcctagg gtggggctca
 2761 gccaggggct gccctcggca ggttggggga tttgccagcg tggccctccc tccagcagca
 2821 gctgccctgg gctgggccac gagaagccct aggagccctt ggggacagac acacagcccc
 2881 tgctctctga ggagactgtc ctgtctctgt agcgccctgt cctccgacct ccatgcccc
 2941 tcgggggcat gcctagtcca tgcgcttagg gacaggccct cctcaccca tctaccccca
 3001 cggcactaac cctggcagc cctgccacgc ctgcacccc catggggaca caaccgactc
 3061 cggggacatg cactctcggg cctgttggag ggaactgggt agatgcccc acacacactc
 3121 agcccagacc cgttcaacaa accccgcact gaggttggtc gagcgggagt ggggccagag
 3181 cctgcccctg ccgtcaggga ggaactcccg gctcactcga aggaggtgcc accatttcag
 3241 ctttggtagc ttttcttctt cttttaaatt ttctaaagct catttaattgt ctttgatgtt
 3301 tcttttgtga tgacaataaa atatcctttt taagtcttgt acttctgtat gggagccgcc
 3361 tctctgtgtc cagcgcctc ctgcccccg tgggaagcac ggtcaggagg aggtctgtcc
 3421 agctgcacct cgggggctcc ctgcactgc ccccgccctc ctgcagccac acgcattgcc
 3481 cgagcgacct tccctggccc ctgtcactac atggacccct ggggtctctc ctcttttcta
 3541 catggatgca gtttctcttc ctgctgggca cgggtctgcc tgccctggtc actctgcggg
 3601 ggacagggcc tccagggaaa gctgggtcga ggttgggagc tggctcagga tggccaggca
 3661 gagccacagg gagggccttc cagaaccaac catggtccga agcgagaggt ggggtgtcga
 3721 tccagacatg ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc acaactagaa tgcagtga
 3781 aaaatgctt atttgtgaaa tttgtgatgc tattgtctta tttgtaacca ttataagctg
 3841 caataaacia gtttaacaca acaattgcat tcatcttatg tttcagggtc agggggagg
 3901 gtgggaggtt ttttaagca agtaaacct ctacaaatgt ggtatggctg attatgatct

ES 2 341 341 T3

3961 ctagtcaagg cactatacat caaatattcc ttattaaacc ctttacaaat taaaaagcta
 4021 aaggtaacaca atttttgagc atagttatta atagcagaca ctctatgect gtgtggagta
 4081 agaaaaaaca gtatgttatg attataactg ttatgocac ttataaagggt tacagaatat
 5 4141 ttttccataa ttttcttgta tagcagtga gctttttcct ttgtggtgta aatagcaaaag
 4201 caagcaagag ttctattact aaacacagca tgactcaaaa aacttagcaa ttctgaaggga
 4261 aagtccttgg ggctctctac ctttctcttc ttttttggag gagtagaatg ttgagagtca
 10 4321 gcagttagcct catcatcact agatggcatt tcttctgagc aaaacagggt ttctcatta
 4381 aaggcattcc accactgctc ccattcatca gtcccatagg ttggaatcta aaatacacia
 4441 acaattagaa tcagttagttt nacacattat acacttaaaa attttatatt taacttagag
 15 4501 ctttaaatct ctgttaggtag tttgtccaat tatgtcacac cacagaagta aggttctctc
 4561 acaaagatcc ggaccaaage ggccatcggt cctccccact cctgcagttc gggggcatgg
 4621 atgcgcggat agccgctgct ggtttctggt atgcgcagg atttgcactg ccggtagaac
 4681 tccgcgaggt cgtccagcct caggcagcag ctgaaccaac tcgcgagggg atcgagcccg
 20 4741 gggtagggga agaactccag catgagatcc ccgcgctgga ggatcatcca gccggcgctc
 4801 cggaaaacga ttccgaagcc caacctttca tagaaggcgg cggtaggaatc gaaatctcgt
 4861 gatggcaggt tgggcgtcgc ttggtcggtc atttgcgaac ccagagtccc gctcagaaga
 25 4921 actcgtcaag aaggcgatag aaggcgatgc gctgcgaatc gggagcggcg ataccgtaaa
 4981 gcacgaggaa gcggtcagcc catcgcgcgc caagctcttc agcaatatca cgggtagcca
 5041 acgctatgtc ctgatagcgg tccgccacac ccagccggcc acagtgcgatg aatccagaaa
 5101 agcggccatt ttccaccatg atattcggca agcaggcatc gccatgggtc acgacgagat
 30 5161 cctcgcgctc gggcatgcgc gccttgagcc tggcgaacag ttccgctggtc gcgagccct
 5221 gatgctcttc gtccagatca tctgatcga caagaccggc ttccatccga gtacgtgctc
 5281 gctcgatgag atgtttcgtc ttggtggtcga atgggcagggt agccggatca agcgtatgca
 35 5341 gccgcgcgat tgcacagcc atgatggata ctttctcggc aggagcaagg tgagatgaca
 5401 ggagatcctg ccccgccact tcgccaata gcagccagtc ccttcccgct tcagtacaa
 5461 cgtcgagcac agctgcgcaa ggaacgcccg tcgtggccag ccacgatagc cgcgctgect
 5521 cgtcctgcag ttcatkcagg gcaccggaca ggtcgggtct gacaaaaaga accggggcgc
 40 5581 cctgcgctga cagccggaac acggcgccat cagagcagcc gattgtctgt tgtgcccagt
 5641 catagccgaa tagcctctcc acccaagcgg ccggagaacc tgcgtgcaat ccctcttgtt
 5701 caatcatgag aaacgatcct catcctgtct cttgatcaga tcttgatccc ctgcgccatc
 45 5761 agatccttgg cggcaagaaa gccatccagt ttactttgca gggcttccca acctaccag
 5821 agggcgcccc agctggcaat tccggttcgc ttgctgtcca taaaaccgcc cagtctagct
 5881 atcgccatgt aagccactg caagctacct gctttctctt tgcgcttgcg ttttccctg
 5941 tccagatage ccagttagct acattcctcc ggggtcagca ccgtttctgc ggaactggctt
 50 6001 tctacgtgtt ccgcttcttt tagcagccct tgcgcccga gtgcttgagg cagcgtgaag
 6061 cttttttgcaa aagcctaggc ctccaaaaaa gcctcctcac taottctgga atagctcaga
 6121 ggccgaggcg gctcggcct ctgcataaat aaaaaaaatt agtcagccat ggggaggaga
 55 6181 atgggaggaa ctgggcggag ttaggggggg gatgggggga gttaggggcg ggactatggt
 6241 tgctgaacta ttgagatgca tgccttgcat acttctgctt gctggggagc ctggggactt
 6301 tccacacctg gttgctgact aattgagatg catgctttgc atacttctgc ctgctgggga
 6361 gcctggggac tttccacacc ctaactgaca cacattccac agctgocctc cgcgttctgg

ES 2 341 341 T3

6421 tgatgacggg gaaaacctct gacacatgca gctcccgag acggtcacag cttgtctgta
 6481 agcggatgcc gggagcagac aagcccgta gggcgctca gggggtgtg ggggtgtcg
 6541 gggcgagcc atgacccagt cagctagcga tagcggagtg tatactggct taactatgog
 5 6601 gcatcagagc agattgtact gagagtgcac catatgcggg gtgaaatacc gcacagatgc
 6661 gtaaggagaa aataccgcac caggcgctct tcgccttctt cgctcactga ctgcctgcgc
 6723 tcggtcgttc ggctgcggcg agcggtatca gctcactcaa agggcgtaat acggttatcc
 10 6781 acagaatcag gggataacgc aggaagaac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg
 6841 aaccgtaaaa aggcgcggtt gctggcgctt ttccataggg tcggccccc tgacgagcat
 6901 cacaaaaatc gacgctcaag tcagaggtgg cgaaacccga caggactata aagataccag
 6961 gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc cgacctgoc gcttaccgga
 15 7021 tacctgtcgg cctttctccc ttcggaagc gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg
 7081 tatctcagtt cgggtgtagg ctctgcctcc aagctgggct gtgtgcacga acccccggtt
 7141 cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac
 20 7201 gacttatcgc cactggcagc agccactggt aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc
 7261 ggtgctacag agttcttgaa gtgggtggct aactacggct acactagaag gacagtatct
 7321 ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc ttgggaaaa gagttggtag ctcttgatcc
 25 7381 ggcaaacaaa ccacgcctgg tagcgggtgt tttttgttt gcaagcagca gattacgcgc
 7441 agaaaaaaag gatctcaaga agatcctttg atcttttcta cggggtctga cgtcagtggt
 7501 aacgaaaact cagcttaagg gatttttggt atgagattat caaaaaggat ctccacctag
 7561 atccttttaa attaaaaatg aagtttttaa tcaatctaaa gtatatatga gtaaacctgg
 30 7621 tctgacagtt accaatgctt aatcagtgag gcacctatct cagcgatctg tctatctcgt
 7681 tcacccatag ttgcctgact ccccgctgtg tagataacta cgatacggga gggttacca
 7741 tctggcccca gtgctgcaat gatcccgoga gacccacgt caccggctcc agatttatca
 35 7801 gcaataaac ccagcagccg agggcgag cgcagaagt gtctgcaac tttatccgoc
 7861 tccatccagt ctattaattg ttgccgggaa gctagagtaa gtagtccgc agttaatagt
 7921 ttgcgcaacg ttgttgccat tgcgcaggc atcgtggtgt cagctcgtc gtttggtatg
 7981 gcttcattca gctccggttc ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc catgttggtc
 40 8041 aaaaaagcgg ttagctcctt cggctcctcg atcgttgta gaagtaagtt ggccgcagtg
 8101 ttatcactca tggttatggc agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga
 8161 tgcctttctg tgactggtga gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg tatgcggcga
 45 8221 ccgagttgct cttgcccggc gtcaacacgg gataataccg cgcacatag cagaacttta
 8281 aaagtgtca tcattggaaa acgttcttcg gggcgaaaac tctcaaggat ctaccgctg
 8341 ttgagatcca gttcgatgta acccactcgt gcacccaact gatcttcage atcttttact
 8401 ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaa ggaaggcaa atgccgcaa aaagggaata
 50 8461 agggcgacac ggaaatggtg aatactcata ctcttcttt ttcaatatta ttgaagcatt
 8521 tatcagggtt attgtctcat gagcggatc atatttgaat gtatttagaa aaataaaca
 8581 ataggggttc cgcgcacatt tcccgaana gtgccacctg acgtctaaga aaccattatt
 55 8641 atcatgacat taacctataa aaataggcgt atcacgagg cctttcgtct tcaagaatc
 8701 gagctcggta cccatcagcc aaaaagcat cctgccacac aacatcaatt tctggaaaac
 8761 gctacactta attatctcta gtagaacagc tctttggtt gccaaaaa atcacctata
 60 8821 gtggcatota agcacaanaa ggagaaaaa atcacanaa aatgattgag aggcataata

ES 2 341 341 T3

8881 aaaattatca aaaaattatg agttttacga ttccatcttt ttccaagtgc aaatcatagg
 8941 gtggctttta cacagtgcac aggaatgtgc atgctgccat tatgggtgctc tgcctaaaaat
 9001 ggttggagcc ttgtcatgct acagagaaac tgtcatcacg caggggggtgc caaatttcca
 5 9061 tattttttta tatcattgag caggtgcaca gaagaccaga aagcactttc tatcaggctg
 9121 gccttccctct tcccttccag tatgaagcaa aaactgccaa tgaaactagc aattgtttaa
 9181 ttcctttttc aaacagtatt tgtgctatca gaacatagtg cattcaaaag tctagcctga
 9241 gagaacaacc cagttttatt cactcctcct actacctctc tcattcccaac tgtttgtgtt
 10 9301 ctccttccca ttttaattgt ctatctagtc caaactaagc acacgatcca gtccacatta
 9361 aacaacatgt tttcacttta agtcaaatac aagacacctt taatatcagc ccttgttcat
 9421 aatcgtgctt ctagtgaact aatgtacatg tcacactgta ctgtcgggtt tbtgtgtctc
 15 9481 tcatgaacaa tgttgtgaag gtattaagtg gagagtaagc agaattagat tccctctaag
 9541 atgcacaccc acactaagag cagaataaat attaaaaata gaaaaaaaag ttttcatgca
 9601 gatttcaaat acccaggtat gagctgcagt ttcttcaagt caaagcatcg aggttgtcag
 9661 ttacactatt acaggaacaa tatgcagagt ttttatttta gtatattagt ttccacatat
 20 9721 gtggaattac tattaacctc tctcttcttt tcaaatgctt accattgtaa atgagtttgt
 9781 gacttttgtt aggtgagtg cactgactct ggatgcttaa gaggactgaa gaagttggag
 9841 ttataggtag ttttattcta ctgactgtt cagtgtctaa aatacaactg aggtccttta
 9901 aactgctgtt catgaacttc ttaattgata tatctcatga gatctctaaa ctatttttat
 25 9961 tatgacacgt ttcaccattt tcaactgaac gatttttatg ttttatatta atgtaactat
 10021 atgacacttc ccaaaatccc catattccca attgaactgt ttcaaagttt taccttgact
 10081 tatgggaat gaaaaccac attttataat tttaaaatga aatgtttatt ttatatctct
 30 10141 gcaaatctca caaggaaaga ttagtcactg gtgtgtgaga gcagaggagc ataagagttc
 10201 aggaatagaa tccattatga ttctggaggc aaggagaac tgatgccaa gtttcagtat
 10261 aagagcagta tccactggaa aggataaagt cactacatct gaggacagag caggacatct
 10321 acataatgag tggtcactaa tgggccactg ttacactgtt atatgtataa ggctcaagaa
 35 10381 tgagcactga ggctgtaagg tgtatgggtg aggacatcag gatgtaaac cagctcaggt
 10441 agaggactca gaggacagca cagtcagcat gaactaataa acatcagata agataaggca
 10501 caagctcagc tatatagggg aagggatctt tgtaaatctg attgtgcac cagtctagtt
 40 10561 caatgtgact taggaagccc agtcatatgc aaatctagag aagactttag agtagaaatc
 10621 tgaggctcac ctccacatcc agcaagcgag tgaccagtta gtcttaaggc accacttctt
 10681 agacatcatg gcttgggtgt ggaccttgc attcctgatg gcagctgcc aaagtaagac
 10741 atcagaaaaa agagttccaa ggggaattga agcagttcca tgaatactca ccttctctgt
 45 10801 ttcttttcac aggtgtccag gcagaggtgc agctgggtgga gtcaggagcc gaagtgaaaa
 10861 agcctggggg ttcagtgaag gtgtcctgca aggcctctgg atacacattc actaattata
 10921 ttatccactg ggtgaagcag gagcctggtc agggccttga atggattgga tattttaatc
 10981 cttacaatca tggtaactaag tacaatgaga agttcaaagg cagggccaca ctaactgcag
 50 11041 acaaatccat cagcacagcc tacatggagc tcagcagcct gcgctctgag garactgcgg
 11101 tctactactg tgcaagatca ggacctatg cctggtttga cacctggggc caagggaacca
 11161 cggccaccgt ctctcaggt aagaatggcc actctagggc ctttgttttc tgotgtgccc
 55 11221 tgtgggattt catgagcatt gcaaaagtgt cctcgggaca tgttccgagg ggacctgggc
 11281 ggactggcca ggaggggagc ggcaactggg tgccttgagg atctgggagc ctctgtggat
 11341 tttccgatgc ctttggaaaa tgggactgag gttgggtgag tctgagacag taactcagcc
 11401 tgggggcttg gtgaagatcg ccgcacagca gcgagtcctg gaaatatctt atttagactt
 60 11461 gtgaggtgcg ctgtgtgtca attacatct taaatccttt attggtgga aagagaattg
 11521 ttgagtgagg tgaatccagc caggagggac gcggggggat cca

ES 2 341 341 T3

SEQ ID NO: 38

Secuencia de nucleótido de la expresión del vector HCVHQN73Dsp20

```

5      1   CTAGAGAGGT CTGGTGGAGC CTGCAAAAGT CCAGCTTTCA AAGGAACACA GAAGTATGTG
      61   TATGGAATAT TAGAAGATGT TGCTTTTACT CTTAAGTTGG TTCCTAGGAA AAATAGTTAA
     121   ATACTGTGAC TTTAAAATGT GAGAGGGTTT TCAAGTACTC ATTTTTTTAA ATGTCCAAAA
10    181   TTTTGTCAA TCAATTTGAG GTCTTGTFTG TGTAGAACTG ACATTACTTA AAGTTTAACC
     241   GAGGAATGGG AGTGAGGCTC TCTCATACCC TATTCAGAAC TGACTTTTAA CAATAATAAA
     301   TTAAGTTTAA AATATTTTTA AATGAATTGA GCAATGTTGA GTTGGAGTCA AGATGGCCGA
     361   TCAGAACCAG AACACCTGCA GCAGCTGGCA GGAAGCAGGT CATGTGCCAA GGCTATTTGG
15    421   GGAAGGGAAA ATAAAACCCAC TAGGTAAACT TGTAGCTGTG GTTTGAAGAA GTGGTTTGA
     481   AACACTCTGT CCAGCCCCAC CAAACCGAAA GTCCAGGCTG AGCAAAACAC CACCTGGTA
     541   ATTTGCATTT CTAAAATAAG TTGAGGATTC AGCCGAAACT GGAGAGGTCC TCTTTTAACT
     601   TATTGAGTTC AACCTTTTAA TTTTAGCTTC AGTAGTTCTA GTTTCCCCAA ACTTAAGTTT
20    661   ATCGACTTCT AAAATGTATT TAAGCTTTCT GGGGCAGGCC AGGCCTGACC TTGGCTTTGG
     721   GGCAGGGAGG GGGCTAAGGT GAGGCAGGTG GCGCCAGCCA GGTGCACACC CAATGCCCAT
     781   GAGCCCAGAC ACTGGACGCT GAACCTCGCG GACAGTTAAG AAGCCAGGGG CCTCTGGCC
25    841   CTGGGCCCAG CTCTGTCCCA CAGCGCGGTC ACATGGCACC ACCTCTCTTG CAGCCTCCAC
     901   CAAGGGCCCA TCGGTCTTCC CCCTGGCACC CTCCTCCAAG AGCACCTCTG GGGGCACAGC
     961   GGCTCTGGGC TGCTTGGTCA AGGACTACTT CCCCAGACCG GTGACGGTGT CGTGGAACTC
30   1021   AGGCGCCCTG ACCAGCGGCG TGCACACCTT CCGGCTGTG CTACAGTCTT CAGGACTCTA
     1081  CTCCCTCAGC AGCGTGGTGA CGGTGCCCTC CAGCAGTTTG GGCACCCAGA CCTACATCTG
     1141  CAACGTGAAT CACAAGCCCA GCAACACCAA GGTGGACAAG AGAGTTGGTG AGAGGCCAGC
     1201  ACAGGGAGGG AGGGTGTCTG CTGGAAGCCA GGCTCAGCGC TCCTGCCCTGG ACGCATCCCC
35   1261  GCTATGCAGT CCCAGTCCAG GGCAGCAAGG CAGGCCCCGT CTGCCTCTTC ACCCGGAGGC
     1321  CTCTGCCCGC CCCACTCATG CTCAGGGAGA GGGTCTTCTG GCTTTTTCCT CAGGCTCTGG
     1381  GCAGGCACAG GCTAGGTGCC CCTAAGCCAG GCCCTGCACA CAAAGGGGCA GGTGCTGGGC
     1441  TCAGACCTGC CAAGAGCCAT ATCCGGGAGG ACCCTGCCCC TGACCTAAGC CCACCCCAAA
40   1501  GGCCAAACTC TCCACTCCCT CAGCTCGGAC ACCTTCTCTC CTCCAGATT CCAGTAACTC
     1561  CCAATCTTCT CTCTGCAGAG CCCAAATCTT GTGACAAAAC TCACACATGC CCACCGTGCC
     1621  CAGGTAAGCC AGCCCAGGCC TCGCCCTCCA GCTCAAGGCG GGACAGGTGC CCTAGAGTAG
     1681  CCTGCATCCA GGGACAGGCC CCAGCCGGGT GCTGACAGT CCACCTCCAT CTCTTCTCA
45   1741  GCACCTGAAC TCCTGGGGGG ACCGTGAGTC TTCTCTTCC CCCCAGAAC CAAGGACACC
     1801  CTCATGATCT CCCGGACCCC TGAGGTCACA TGCGTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC
     1861  CCTGAGGTCA AGTTCAACTG GTACGTGGAC GCGGTGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG
50   1921  CCGCGGGAGG AGCAGTACAA CAGCACGTAC CGTGTGGTCA GCGTCTCAC CGTCTGCAC
     1981  CAGGACTGGC TGAATGGCAA GGAGTACAAG TGCAAGGTCT CCAACAAAGC CCTCCCAGCC

```

ES 2 341 341 T3

2041 CCCATCGAGA AAACCATCTC CAAAGCCAAA GGTGGGACCC GTGGGGTGCG AGGGCCACAT
 2101 GGACAGAGGC CGGCTCGGCC CACCTCTGTC CCTGAGAGTG ACCGCTGTAC CAACCTCTGT
 2161 CCCTACAGGG CAGCCCCGAG AACCACAGGT GTACACCCTG CCCCCATCCC GGGAGGAGAT
 2221 GACCAAGAAC CAGGTCAGCC TGACCTGCCT GGTCAAAGGC TTCTATCCCA GCGACATCGC
 2281 COTGGAGTGG GAGAGCAATG GGCAGCCGGA GAACAACTAC AAGACCACGC CTCCCCTGCT
 2341 GGACTCCGAC GGCTCCTTCT TCCTCTATAG CAGCTCACC GTGGACAAGA GCAGGTGGCA
 2401 GCAGGGGAAC GTCTTCTCAT GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAAAC ACTACACGCA
 2461 GAAGAGCCTC TCCCTGTCCC CGGTAAATG AGTGGAGCGG CCGGCAAGCC CCGCTCCCC
 2521 GGGCTCTCGC GGTGCGACGA GGATGCTTGG CACGTACCCC GTCTACATAC TTCCCAGGCA
 2581 CCCAGCATGG AATAAAGCA CCCACCACTG CCCTGGGCCC CTGCGAGACT GTGATGGTTC
 2641 TTTCCACGGG TCAGGCCGAG TCTGAGGCCT GAGTGGCATG AGGGAGGCAG AGCGGGTCCC
 2701 ACTGTCCCCA CACTGGCCCA GGCTGTGCAG GTGTGCTCGG GCGGCTAGG GTGGGGCTCA
 2761 GCCAGGGGCT GCCCTCGGCA GGGTGGGGGA TTTGCCAGGG TGGCCCTCCC TCCAGCAGCA
 2821 GCTGCCCTGG GCTGGGGCCAC GAGAAGCCCT AGGAGCCCTT GGGACAGAC ACACAGCCCC
 2881 TGCCTCTGTA GGAGACTGTC CTGTCTGTG AGCGCCCTGT CCTCCGACCC CGATGCCCAC
 2941 TCGGGGGCAT GCCTAGTCCA TGCGCGTAGG GACAGGCCCT CCCTCACCCA TCTACCCCA
 3001 CGGCACTAAC CCCTGGCAGC CTTGCCAGC CTGCGACCCG CATGGGGACA CAACCGACTC
 3061 CGGGGACATG CACTCTCGGG CCCTGTGGAG GGACTGGTGC AGATGCCAC ACACACACTC
 3121 AGCCAGACC CGTTCAACAA ACCCCGCACT GAGGTTGGTC GAGCGGAGT GCGGCCAGAG
 3181 CCTGCCCTGG CCGTCAGGGA GGACTCCCGG GCTCACTCGA AGGAGGTGCC ACCATTTCAG
 3241 CTTTGGTAGC TTTTCTCTT CTTTAAATT TTCTAAAGCT CATTAAATGT CTTTGATGTT
 3301 TCTTTGTGA TGACAATAAA ATATCCTTTT TAAGTCTTGT ACTTGTGTAT GGGAGCCGCC
 3361 TTCTGTGTG CACGCGCCTC CTGCCCCGGG TGGGAAGCAC GGTGAGGAG AGGCTGGTCC
 3421 AGCTGCACCT CGGGGGCTCC CTGCACTGCG CCCCCGCTC CTGCAGCCAC ACGCATTGCC
 3481 CGAGCGACCC TCCCTGGCCC CTGTCACTAC ATGGACCCCT GGGGCTTCTC CTCFTTTCTA
 3541 CATGGATGCA GTTCTCTCTC CTGCTGGGCA CGGTGCTGCC TGCCCTGGTC ACTCTGCGGG
 3601 GGACAGGGCC TCCAGGGAAA GCTGGGTGGA GGCTGGGAGC TGGCTCAGGC TGGCCAGGCA
 3661 GAGCCACAGG GAGGGCCTTC CAGAACCAAC CATGCTCCGA AGCGAGAGGT GGGTGTGAGA
 3721 TCCAGACATG ATAAGATACA TTGATGAGTT TGGACAAACC ACAACTAGAA TGCAGTGAAA
 3781 AAAATGCTTT ATTTGTGAAA TTTGTGATGC TATTGCTTTA TTGTAAACCA TTATAAGCTG
 3841 CAATAACAA GTTAACAACA ACAATTGCAT TCATTTTATG TTTCAGGTTT AGGGGGAGGT
 3901 GTGGGAGGTT TTTTAAAGCA AGTAAACCT CTACAAATGT GGTATGGCTG ATTATGATCT
 3961 CTAGTCAAGG CACTATACAT CAAATATTCC TTATTAAACC CTTTACAAAT TAAAAAGCTA
 4021 AAGGTACACA ATTTTGGAGC ATAGTTATTA ATAGCAGACA CTCTATGCCT GTGTGGAGTA
 4081 AGAAAAAACA GTATGTTATG ATTATAACTG TTATGCCTAC TTATAAAGGT TACAGAATAT
 4141 TTTTCCATAA TTTTCTTGTA TAGCAGTGCA GCTTTTCTCT TTGTGGTGTA AATAGCAAAG
 4201 CAAGCAAGAG TTCTATTACT AAACACAGCA TGACTCAAAA AACTTAGCAA TTCTGAAGGA
 4261 AAGTCCTTGG GGTCTTCTAC CTTTCTCTTC TTTTGTGGAG GAGTAGAATG TTGAGAGTCA
 4321 GCAGTAGCCT CATCATCACT AGATGGCATT TCTTCTGAGC AAAACAGGTT TTCTCATT
 4381 AAGGCATTCC ACCACTGCTC CCATTCATCA GTTCCATAGG TTGGAATCTA AAATACACAA
 4441 ACAATTAGAA TCAGTAGTTT AACACATTAT AACTTAAAA ATTTTATATT TACCTTAGAG

ES 2 341 341 T3

4501 CTTTAAATCT CTGTAGGTAG TTTGTCCAAT TATGTCACAC CACAGAAGTA AGGTTCCCTTC
 4561 ACAAGATCC GGACCAAAGC GGCCATCGTG CCTCCCCACT CCTGCAGTTC GGGGGCATGG
 4621 ATGCGCGGAT AGCCGCTGCT GGTTCCTCG ATGCCGACGG ATTTGCACTG CCGGTAGAAC
 5 4681 TCCGCGAGGT CGTCCAGCCT CAGGCAGCAG CTGAACCAAC TCGCGAGGGG ATCGAGCCCG
 4741 GGGTGGGCGA AGAACTCCAG CATGAGATCC CCGCGCTGGA GGATCATCCA GCCGGCGTCC
 4801 CGGAAAACGA TTCCGAAGCC CAACCTTTCA TAGAAGGCGG CGGTGGAATC GAAATCTCGT
 4861 GATGGCAGGT TGGGCGTCGC TTGGTCGGTC ATTTGGAACC CCAGAGTCCC GCTCAGAAGA
 10 4921 ACTGTCAGG AAGGCGATAG AAGGCGATGC GCTGCGAATC GGGAGCGGCG ATACCGTAAA
 4981 GCACGAGGAA GCGGTCAGCC CATTCGCCCC CAAGCTCTTC AGCAATATCA CCGGTAGCCA
 5041 ACGCTATGTC CTGATAGCGG TCGCCACAC CCAGCCGGCC ACAGTCGATG AATCCAGAAA
 15 5101 AGCGGCCATT TTCCACCATG ATATTGGGCA AGCAGGCATC GCCATGGGTC ACCACGAGAT
 5161 CCTCGCGCTC GGGCATGCGC GCGTTGAGCC TGGCGAACAG TTCGGCTGGC GCGAGCCCCCT
 5221 GATGCTCTTC GTCCAGATCA TCCTGATCGA CAAGACCGGC TTCCATCCGA GTACGTGCTC
 5281 GCTCGATGCG ATGTTTCGCT TGGTGGTGA ATGGGCAGGT AGCCGATCA AGCGTATGCA
 20 5341 GCGCGCGCAT TGCATCAGCC ATGATGGATA CTTTCTCGSC AGGAGCAAGG TGAGATGACA
 5401 GGAGATCCTG CCGCGGCACT TCGCCCAATA GCAGCCAGTC CTTCCCGCT TCAGTGACAA
 5461 CGTCGAGCAC AGCTGCGCAA GGAACGCCCC TCGTGGCCAG CCACGATAGC CGCGCTGCCT
 25 5521 CGTCTGCGAG TTCATTGAGG GCACCGGACA GGTGGGTCTT GACAAAAAGA ACCCGGCGCC
 5581 CCTGCGCTGA CAGCCGGAAC ACGCGGCGAT CAGAGCAGCC GATTGTCTGT TGTGCCAGT
 5641 CATAGCCGAA TAGCCTCTCC ACCCAAGCGG CCGGAGAACC TGGTGCAT CCATCTTGT
 5701 CAATCATGCG AAGCGATCCT CATCCTGTCT CTGATCAGA TCTTGATCCC CTGCGCCATC
 30 5761 AGATCCTTGG CCGCAAGAAA GCCATCCAGT TTACTTTGCA GGGCTTCCCA ACCTTACCAG
 5821 AGGGCGCCCC AGCTGGCAAT TCGGTTTCGC TTGCTGTCCA TAAAACCGCC CAGTCTAGCT
 5881 ATGCGCATGT AAGCCCACTG CAAGCTACCT GCTTTCTCTT TGGGCTTGGG TTTTCCCTTG
 5941 TCCAGATAGC CCAGTAGCTG ACATTATCC GGGGTGAGCA CCGTTTCTGC GGACTTGCTT
 35 6001 TCTAGCTGTT CCGCTTCCCT TAGCAGCCCT TCGGCCCTGA GTGCTTGCGG CAGCGTGAAG
 6061 CTTTTTGCAA AAGCCTAGGC CTCCAAAAAA GCGTCTCAC TACTTCTGGA ATAGCTCAGA
 6121 GCGCGAGGCG GCGTGGGCT CTGCATAAT AAAAAAATT AGTCAGCCAT GGGGCGGAGA
 40 6181 ATGGGCGGAA CTGGGCGGAG TTAGGGGCGG GATGGGCGGA GTTAGGGGCG GGACTATGGT
 6241 TGCTGACTAA TTGAGATGCA TGCTTTGCAT ACTTCTGCTT GCTGGGAGC CTGGGACTT
 6301 TCCACACCTG GTTGTGACT AATTGAGATG CATGCTTTGC ATACTTCTGC CTGCTGGGA
 6361 GCGTGGGAC TTTCACACC CTAAGTGACA CACATCCAC AGCTGCTCG CGGTTTGGG
 45 6421 TGATGACGCT GAAAACCTCT GACACATGCA GCTCCCGAG ACGGTCACAG CTTGTCTGTA
 6481 AGCGGATGCC GGGAGCAGAC AAGCCGTC AAGGCGCTCA GCGGGTGTG GCGGCTGTG
 6541 GGGCGCAGCC ATGACCCAGT CAGGTAGCGA TAGCGGAGTG TATACTGCTT TAAGTATGCG
 6601 GCATCAGAGC AGATTGTACT GAGAGTGAC CATATGCGGT GTGAAATACC GCACAGATGC
 50 6661 GTAAGGAGAA AATACCGCAT CAGGCGCTCT TCGCTTCTT CGCTCACTGA CTCGCTGCGC
 6721 TCGGTCGTTT GCGTGGGCG AGCGGTATCA GCTCACTCAA AGGCGGTAA ACGGTTATCC
 6781 ACAGAATCAG GGGATAAGC AGGAAAGAAC ATGTGAGCAA AAGGCCAGCA AAAGGCCAGG
 6841 AACCCTAAAA AGGCGCGCTT GCTGGCGTTT TTCCATAGGC TCGCCCCC TGACGAGCAT
 55 6901 CACAAAATC GACGCTCAAG TCAGAGGTGG CGAAACCCGA CAGGACTATA AAGATACCAG

ES 2 341 341 T3

6961 GCGTTTCCCC CTGGAAGCTC CCTCGTGC GC TCTCCTGTTT CGACCCCTGCC GCTTACCGGA
 7021 TACCTGTCCG CCTTTCTCCC TTCCGGGAAGC GTGGCGCTTT CTCATAGCTC ACGCTGTAGG
 7081 TATCTCAGTT CGGTGTAGGT OGTTCCGCTCC AAGCTGGGCT GTGTGCACGA ACCCCCCGTT
 5 7141 CAGCCCGAQC GCTCGCGCTT ATCCGGTAAC TATCGTCTTG AGTCCAACCC GGTAAAGACAC
 7201 GACTTATCGC CACTGGCAGC AGCCACTGGT AACAGGATTA GCAGAGCGAG GTATGTAGGC
 7261 GGTGCTACAG AGTTCCTGAA GTGGTGGCCT AACTACGGCT AACTAGAAAG GACAGTATTT
 10 7321 GGTATCTGCG CTCTGCTGAA GCCAGTTACC TTCCGAAAAA GAGTTGGTAG CTCTTGATCC
 7381 GGCAAAACAAA CCACCGCTGG TAGCGGTGGT TTTTGTGTTT GCAAGCAGCA GATTACGCGC
 7441 AGAAAAAAG GATCTCAAGA AGATCCTTTG ATCTTTTCTA CGGGGTCTGA CGCTCAGTGG
 7501 AACGAAAACT CACGTTAAGG GATTTTGGTC ATGAGATTAT CAAAAAGGAT CTTCACCTAG
 15 7561 ATCCTTTTAA ATTA AAAATG AAGTTTAAA TCAATCTAAA GTATATATGA GTAAACTTGG
 7621 TCTGACAGTT ACCAATGCTT AATCAGTGAG GCACCTATCT CAGCGATCTG TCTATTTGCT
 7681 TCATCCATAG TTGCGTGACT CCGCGTCTGT TAGATAACTA CGATACGGGA GGGCTTACCA
 20 7741 TCTGGCCCA GTGTGCAAT GATACCCCA GACCCACGCT CACCGGCTCC AGATTTATCA
 7801 GCAATAAACC AGCCAGCCGG AAGGCGCGAG CGCAGAAGTG GTCCTGCAAC TTTATCCGCC
 7861 TCCATCCAGT CTATTAAATG TTGCGGGGAA GCTAGAGTAA GTAGTTCCGC AGTTAATAGT
 7921 TTGCGCAACG TTGTTGCCAT TGCTGCAGGC ATCGTGGTGT CACGCTCGTC GTTTGGTATG
 25 7981 GCTTCATTCA GCTCCGTTT CCAACGATCA AGCGGAGTTA CATGATCCCC CATGTTGTGC
 8041 AAAAAAGCGG TTAGCTCCTT CGGTCTCTCG ATCGTTGTCA GAAAGTAAGTT GGCCGCACTG
 8101 TTATCACTCA TGGTTATGGC AGCACTGCAT AATTCTCTTA CTGTCATGCC ATCCGTAAGA
 8161 TGCTTTTCTG TGA CTGGTGA GTACTCAACC AAGTCATTCT GAGAATAGTG TATGCGCGCA
 30 8221 CCGAGTTGCT CTGCGCCGGC GTCAACACGG GATAATAACG CGCCACATAG CAGAACTTTA
 8281 AAAGTGCTCA TCATTGGA AAAGTTCTTCG GGGCGAAAAC TCTCAAGGAT CTTACCGCTG
 8341 TTGAGATCCA GTTCGATGTA ACCCACTCGT GCACCCAACT GATCTTCAGC ATCTTTTACT
 35 8401 TTCACCAGCG TTTCTGGGTG AGCAAAAACA GGAAGGCAAA ATGCCGCAAA AAAGGGAATA
 8461 AGGGCGACAC GGAAATGTTG AATACTCATA CTCCTCCCTT TCAATATTA TTGAAGCATT
 8521 TATCAGGGTT ATTGTCTCAT GAGCGGATAC ATATTTGAAT GTATTTAGAA AAATAAACAA
 8581 ATAGGGGTTT CCGCGACATT TCCCGAAAA GTGCCACCTG ACGTCTAAGA AACCATTATT
 40 8641 ATCATGACAT TAACCTATAA AAATAGGCGT ATCAGGAGGC CCTTTCGTCT TCAAGAATTC
 8701 GAGCTCGSTA CCCATCAGCC AAAAAGCATG CCTGCCACAC AACATCAATT TCTGGAAAAC
 8761 GCTACACTTA ATTATTTCTA GTAGAACAGC TCTTTGTTTT GCCAAAAGA ATCACCTATA
 8821 GTGGCATCTA AGCACAAAA GGAGAAAAAA ATCACAAGA AATGATTGAG AGGCATAATA
 45 8881 AAAATTATCA AAAAATTATG AGTTTACGA TTTTCATCTT TCCCAAGTTG AAATCATAGG
 8941 GTGGCTTTAA CACAGTGACA AGGAATGTGC ATGCTGCCAT TATGGTGTCT TGCCATAAAT
 9001 GGTGGAGCC TTGTCATGCT ACAGAGAAAC TGTACATACG CAGGGGGTGC CAAATTTCCA
 9061 TATTTTPTTA TATCATTGAG CAGGTGCACA GAAGACCAGA AAGCACTTTC TATCAGGCTG
 50 9121 GCCTTCCTCT TCCTTCCAG TATGAAGCAA AACTGCCAA TGAAACTAGC AATTGTTAAA
 9181 TTCTTTTTC AAACAGTATT TGTGCTATCA GAACATAGTG CATTCAAAAG TCTAGCCTGA
 9241 GAGAACAAAC CAGTTTATT CATTCCTCCT ACTACCTCTC TCATTCCCAC TGTTTGTGTT
 55 9301 CTCCCTCCCA TTTAATTGT CTATCTAGTC CAACTAAGC ACACGATCCA GTCCACATTA
 9361 AACACATGT TTTCACTTTA AGTCAAATAC AAGACACCTT TAATATCAGC CCTTGTTTCAT

ES 2 341 341 T3

```

9421 AATCGTGCTT CTAGTGACTT AATGTACATG TCACACTGTA CTGTTGGGTT TTGTGTCTCA
9481 TCATGAACAA TGTGTGAAG GTATTAAAGT GAGAGTAAGC AGAATTAGAT TCCTCTAATG
9541 ATGCACACCC ACACCTAAGAG CAGAAATAAT ATTAAAAATA GAAAAAAAG TTTTACATGA
5 9601 GATTTCAAAT ACCCAGGTAT GAGCTGCAGT TTCTTCAAGT TAAAGCATCG AGGTTGTCAG
9661 TTACACTATT ACAGGAAACA TATGCAGAGT TTTTATTTTA GTATATTAGT TTTACATAT
9721 GTGGAAATTAC TATTAAACTA TTCTTTCTTT TCAAATGCTT ACCATTGTAA ATGAGTTTGT
9781 GACTTTGTGT AGGTGAGTGC ACATGACTCT GGATGCCTAA GAGGACTGAA GAAGTTGGAG
10 9841 TTATAGGTAG TTTTATTCTA CTTGACTGTT CAGTGCTAAA AATACAACCTG AGGTCCCTTA
9901 AACTGCTGTT CATGAACCTC TTAATTGATA TATCTCATGA GATCTCTAAA CTATTPTTAT
9961 TATGACACGT TTCACCATTT TCACTGTAAC GATTTTTATG TTTTATATTA ATGTAACATAT
15 10021 ATGACACTTC CCAAAATCCC CATATTCACA ATTGAACGT TFCAAAGTTT TACCTTGACT
10081 TATGGGAAAT GAAACCCAC ATTTTATAAT TTTAAAATGA AATGTTTATT TTATATTTCT
10141 GCAAAATTTCA CAAGGAAAGA TTAGTCACTG GTGTGTGAGA GCAGAGGAGC ATAAGAGTTC
10201 AGGAATAGAA TCCATTATGA TTCTGGAGGC AAGGAAGAAC TGATGCCAAG GTTTCAGTAT
20 10261 AAGAGCAGTA TCCACTGGAA AGGATAAAGT CACTACATCT GAGCACAGAG CAGGACATCT
10321 ACATAATGAG TGGTCACTAA TGGGCCACTG TTACACTGTT ATATGTATAA GGCTCAAGAA
10381 TGAGCACTGA GGCTGTAAGG TGTATGGGTG AGGACATCAG GATGTAAACC CAGCTCAGGT
10441 AGAGSACTCA GAGGACAGCA CAGTCAGCAT GAACTAATAA ACATCAGATA AGATAAGGCA
25 10501 CAAGCTCAGC TATATAGGGT AAGGGATCTT TGTAAATCTG ATTGTGCATC CAGTCTAGTT
10561 CAATGTGACT TAGGAAGCCC AGTCATATGC AAATCTAGAG AAGACTTTAG AGTAGAAATC
10621 TGAGGCTCAC CTCACATACC AGCAAGCGAG TGACCAGTTA GTCTTAAGGC ACCACTTCTT
10681 AGACATCATG GCTTGGGTGT GGACCTTGCC ATTCTGATG GCAGCTGCCC AAGTAAGAC
30 10741 ATCAGAAAAA AGAGTTCCAA GGGGAATTGA AGCAGTTCCA TGAATACTCA CCTTCCTGTG
10801 TTCTTTTCAC AGGTGTCCAG GCACAGGTGC AGCTGGTGGG GTCAGGAGCC GAAGTGAAAA
10861 AGCCTGGGGC TTCAGTGAAG GTGTCTTCCA AGGCCTCTGG ATACACATTC ACTAATTATA
10921 TTATCCACTG GGTGAAGCAG GAGCCTGGTC AGGGCCTTGA ATGGATTGGA TATTTTAATC
35 10981 CTTACAATCA TGGTACTAAG TACAATGAGA AGTTCAAAGG CAGGGCCACA CTAAGTGCAG
11041 ACAAAATCCAT CAGCACAGCC TACATGGAGC TCAGCAGCCT GCGCTCTGAG GACACTGCGG
11101 TCTACTACTG TGCAAGATCA GGACCCATAG CCTGGTTTGA CACCTGGGGC CAAGGGACCA
40 11161 CGGTACACGT CTCCTCAGGT AAGAAATGGC ACTCTAGGGC CTTTGTTTTC TGCTGCTGCC
11221 TGTGGGATTT CATGAGCAIT GCAAAGTTGT CCTGGGACA TGTTCGAGG GGACCTGGG
11281 GGAAGTGGCA GGAGGGGAGC GGCAGTGGG TGCCCTTGAGG ATCTGGGAGC CTCTGTGGAT
11341 TTTCCGATGC CTTTGGAAAA TGGGACTGAG GTTGGGTGCG TCTGAGACAG TAACTCAGCC
45 11401 TGGGGGCTTG GTGAAGATCG CCGCACAGCA GCGAGTCCGT GAAATATCTT ATTTAGACTT
11461 GTGAGGTGCG CTGTGTGTCA ATTTACATCT TAAATCCTTT ATTGGCTGGA AAGAGAATTG
11521 TTGGAATGGG TGAATCCAGC CAGGAGGGAC GCGGGGGGAT CCA

```

SEQ ID NO: 39

Secuencia de nucleótido de la expresión del vector LCVL2Sp20

```

1 CTAGAGTCCT AGAGAGGTCT GGTGGAGCCT GCAAAAGTCC AGCTTTCAAA
60 51 GGAACACAGA AGTATGTGTA TGGAATATTA GAAGATGTTG CTTTTACTCT

```

ES 2 341 341 T3

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

```

101 TAAGTTGGTT CCTAGGAAAA ATAGTTAAAT ACTGTGACTT TAAAATGTGA
151 GAGGGTTTTT AAGTACTCAT TTTTTTAAAT GTCCAAAATT TTTGTCAATC
201 AATTTGAGGT CTTGTTTGTG TAGAACTGAC ATTACTTAAA GTTTAACCGA
251 CGAATGGGAG TGAGGCTCTC TCAEACCCTA TTCAGAACTG ACTTTTAAAC
301 ATAATAAATT AAGTTTAAAA TATTTTTTAA TGAATTGAGC AATGTTGAGT
351 TGGAGTCAAG ATGGCCGATC AGAACCAQAA CACCTGCAGC AGCTGGCAGG
401 AAGCAGGTCA TGTGGCAAGG CTATTGCGGG AAGGGAAAAT AAAACCACTA
451 GGTAAACTTG TAGCTGTGGT TTGAAGAAGT GGTTTTGAAA CACTCTGTCC
501 AGCCCCACCA AACCGAAAGT CCAGGCTGAG CAAAACACCA CCTGGGTAAT
551 TTGCATTCTT AAAATAAGTT GAGGATTCAG CCGAAACTGG AGAGGTCTCT
601 TTTTAACTTA TTGAGTTCAA CCTTTTAAAT TTAGCTTGAG TAGTTCTAGT
651 TTCCCCAAAC TTAAGTTTAT CGACTTCTAA AATGTATTTA GAACTCATTT
701 TCAAAATTAG GTTATGTAAG AANTTGAAGG ACTTTAGTGT CTTTAATTTT
751 TAATATATTT AGAAAACCTT TTAAAATTAC TCTATTATTC TTCCCTCTGA
801 TTATTGGTCT CCATTCAATT CTTTTCCAAT AOCOGAAGCA TTTACAGTGA
851 CTTTGTTCAT GATCTTTTTT AGTTGTTTGT TTTGCCTTAC TATTAAGACT
901 TTGACATTTT GTTCAAAACG GCTTCACAAA TCTTTTTTCAA GACCACTTTC
951 TGAGTATTCA TTTTAGGAGA AATACTTTTT TTTTAAATGA ATGCAATTAT
1001 CTAGGACCTG CAGGCATGCT GTTTTCTGTC TGTCCCTAAC ATGCCCTGTG
1051 ATTATCCGCA AACACACAC CCAAGGGCAG AACTTTGTTA CTTAAACACC
1101 ATCCTGTTTG CTTCTTTCTT CAGGAAGTGT GGCTGCACCA TCTGTCTTCA
1151 TCTTCCCGCC ATCTGATGAG CAGTTGAAAT CTGGAACTGC CTCTGTTGTG
1201 TGCCTGCTGA ATAACCTCTA TCCCAGAGAG GCCAAAGTAC AGTGAAGGT
1251 GGATAACGCC CTCCAATCGG GTAACCTCCA GGAGAGTGTC ACAGAGCAGG
1301 ACAGCAAGGA CAGCACCTAC AGCCTCAGCA GCACCCTGAC GCTGAGCAAA
1351 GCAGACTACG AGAAACACAA AGTCTACGCC TGOGAAGTCA CCCATCAGGG
1401 CCTGAGCTCG CCCGTCACAA AGAGCTTCAA CAGGGGAGAG TGTTAGAGGG
1451 AGAAGTGCCC CCACCTGCTC CTCAGTTCCA GCCTGACCCC CTCCCATCCT
1501 TTGGCCTCTG ACCCTTTTTT CACAGGGGAC CTACCCCTAT TCGGGTCTCT
1551 CAGCTCATCT TTCACCTCAC CCCCCTCCTC CTCCTTGGCT TTAATTATGC
1601 TAATGTTGGA GGAGAATGAA TAAATAAAGT GAATCTTTGC ACCTGTGGTT
1651 TCTCTCTTTC CTCATTTAAT AATTATTATC TGTTGTTTTA CCAACTACTC
1701 AATTTCTCTT ATAAGGGACT AAATATGTAG TCATCCTAAG GCGGGATATC
1751 GAGATCTGAA GCTGATCCAG ACATGATAAG ATACATTGAT GAGTTTGGAC
1801 AAACCACAAC TAGAATGCAG TGAAAAAAAT GCTTTATTTG TGAAATTTGT
1851 GATGCTATTC CTTTATTTGT AACCATTATA AGCTGCAATA AACAAGTTAA
1901 CAACAACAAT TGCATTCAAT TTATGTTTCA GGTTCAGGGG GAGGTGTGGG
1951 AGGTTTTTTT AAGCAAGTAA AACCTCTACA AATGTGGTAT GGCTGATTAT
2001 GATCTCTAGT CAAGGCACTA TACATCAAAT ATTCTTATT AACCCCTTTA
2051 CAAATTAAAA AGCTAAAGGT ACACAATTTT TGAGCATAGT TATTAATAGC
2101 AGACACTCTA TGCCTGTGTG GAGTAAGAAA AAACAGTATG TTATGATTAT

```

ES 2 341 341 T3

2151 AACTGTTATG CCTACTTATA AAGGTTACAG AATATFTTTC CATAAFTTTC
 2201 TTGTATAGCA GTGCAGCTTT TTCTTTGTG GTGTAAATAG CAAAGCAAGC
 2251 AAGAGTTCTA TTACTAAACA CAGCATGACT CAAAAACTT AGCAATTCTG
 5 2301 AAGGAAAGTC CTTGGGGTCT TCTACCTTTC TCTTCTTTTT TGGAGGAGTA
 2351 GAATGTTGAG AGTCAGCAGT AGCCTCATCA TCACTAGATG GCATTTCTTC
 2401 TGAGCAAAAC AGGTTTTCTC CATTAAAGGC ATTCCACCAC TGCTCCCAT
 10 2451 CATCAGTTCC ATAGGTTGGA ATCTAAAATA CACAAACAAT TAGAATCAGT
 2501 AGTTTAAACAC ATTATACACT TAAAAATTTT ATATTTACCT TAGAGCTTTA
 2551 AATCTCTGTA GGTAGTTTGT CCAATTATGT CACACCACAG AAGTAAGGTT
 15 2601 CCTTCACAAA GATCCGGACC AAAGCGGCCA TCGTGCCTCC CCACTCCTGC
 2651 AGTTGGGGGG CATGGATGGG CGGATAGCCG CTGCTGGTTT CCTGGATGCC
 2701 GACGGATTTG CACTGCCGGT AGAACTCCGC GAGGTGCTCC AGCCTCAGGC
 20 2751 AGCAGCTGAA CCAACTCGCG AGGGGATCGA GCATCCCCCA TGGTCTTATA
 2801 AAAATGCATA GCTTTAGGAG GGGAGCAGAG AACTTGAAAG CATCTTCCTG
 2851 TTAGTCTTTC TTCTCGTAGA CTTCAAACCT ATACTTGATG CCTTTTTCTT
 2901 CCTGGACCTC AGAGAGGACG CCTGGGTATT CTGGGAGAAG TTTATATTTT
 25 2951 CCCAAATCAA TTTCTGGGAA AAACGTGTCA CTTTCAAATT CCTGCATGAT
 3001 CCTTGTCACA AAGAGTCTGA GGTGGCCTGG TTGATTCAAT GCTTCCTGGT
 3051 AAACAGAACT GCCTCCCACT ATCCAAACCA TGTCTACTTT ACTTGCCAAT
 30 3101 TCCGGTTGTT CAATAAGTCT TAAGGCATCA TCCAAACTTT TGGCAAGAAA
 3151 ATGAGCTCCT CGTGGTGGTT CTTTGAGTTC TCTACTGAGA ACTATATTAA
 3201 TTCTGTCCCT TAAAGGTGGA TTCTTCTCAG GAATGGAGAA CCAGGTTTTT
 35 3251 CTACCCATAA TCACCAGATT CTGTTTACCT TCCACTGAAG AGGTTGTGGT
 3301 CATTCCTTTG AAGTACTTGA ACTCGTTCTT GAGCGGAGGC CAGGGTGGGT
 3351 CTCCTTCTTT GCCAATCCCC ATATTTTGGG ACACGGCGAC GATGCAGTTC
 3401 AATGGTCGAA CCATGATGGC AGCGGGGATA AAATCCTACC AGCCTTCACG
 40 3451 CTAGGATTGC CGTCAAGTTT GGGGGTACCG AGCTCGAATT AGCTTTTTGC
 3501 AAAAGCCTAG GCCTCCAAA AAGCCTCCTC ACTACTTCTG GAATAGCTCA
 3551 GAGGGCCGAG GCGGCCTCGG CTTCTGCATA AATAAAAAAA AFTAGTCAGC
 45 3601 CATGGGGCGG AGAATGGGCG GAACTGGGCG GAGTTAGGGG CGGGATGGGC
 3651 GGAGTTAGGG GCGGGACTAT GGTGCTGAC TAATTGAGAT GCATGCTTTG
 3701 CATACTTCTG CCTGCTGGGG AGCCTGGGGA CTTTCCACAC CTGGTTGCTG
 50 3751 ACTAATTGAG ATGCATGCTT TGCATACTTC TGCTGCTGG GGAGCCTGGG
 3801 GACTTTCCAC ACCCTAACTG ACACACATTC CACAGCTGCC TGGGCGTTTT
 3851 CGGTGATGAC GGTGAAAACC TCTGACACAT GCAGCTCCCG GAGACGGTCA
 3901 CAGCTTGTCT GTAAGCGGAT GCGGGGAGCA GACAAGCCCG TCAGGGCGCG
 55 3951 TCAGCGGGTG TTGGCGGGTG TCGGGGCGCA GGCATGACCC AGTCACGTAG
 4001 CGATAGCGGA GTGTATACTG GCTTAACTAT GCGGCATCAG AGCAGATTGT
 4051 ACTGAGAGTG CACCATATGC GGCCGCATAT GCGGTGTGAA ATACCGCACA
 60 4101 GATGCGTAAG GAGAAAATAC CGCATCAGGC GCTCTTCCGC TTCTCGCTC
 4151 ACTGACTCGC TGCGCTCGGT CGTTCGGCTG CGGCGAGCGG TATCAGCTCA

ES 2 341 341 T3

4201 CTCRAAGGCG GTAATACGGT TATCCACAGA ATCAGGGGAT AACGCAGGAA
 4251 AGAACATGTG AGCAAAAGGC CAGCAAAAGG CCAGGAACCG TAAAAAGGCC
 5 4301 GCGTTGCTGG CGTTTTTCCA TAGGCTCCGC CCCCCTGACG AGCATCACAA
 4351 AAATCGACGC TCAAGTCAGA GGTGGCGAAA CCGACAGGA CTATAAAGAT
 4401 ACCAGGCGTT TCCCCCTGGA AGCTCCCTCG TCGCTCTCC TGTTCGACC
 10 4451 CTGCGGCTTA CCGGATACCT GTCCGCCTTT CTCCCTTCGG GAAGCGTGGC
 4501 GCTTTCTCAT AGCTCACGCT GTAGGTATCT CAGTTCGGTG TAGGTGGTTC
 4551 GCTCCAAGCT GGGCTGTGTG CACGAACCCC CCGTTCAGCC CGACCGCTGC
 4601 GCCTTATCCG GTAACATATCG TCTTGAGTCC AACCCTGTAA GACACGACTT
 15 4651 ATCGCCACTG GCAGCAGCCA CTGGTAACAG GATTAGCAGA GCGAGGTATG
 4701 TAGGCGGTGC TACAGAGTTC TTGAAGTGGT GGCCTAACTA CCGCTACACT
 4751 AGAAGGACAG TATTTGGTAT CTGCGCTCTG CTGAAGCCAG TTACCTTCGG
 20 4801 AAAAAGAGTT GGTAGCTCTT GATCCGGCAA ACAAACCACC GCTGGTAGCG
 4851 GTGGTTTTTT TGTTCGAAG CAGCAGATTA CGCGCAGAAA AAAAGGATCT
 4901 CAAGAAGATC CTTTGATCTT TTCTACGGGG TCTGACGCTC AGTGGAACGA
 25 4951 AAATPCACGT TAAGGGATTT TGGTCATGAG ATTATCAAAA AGGATCTTCA
 5001 CCTAGATCCT TTAAATTA AAATGAAGTT TTAAATCAAT CTAAAGTATA
 5051 TATGAGTAAA CTTGGTCTGA CAGTACCAA TGCTTAATCA GTGAGGCACC
 5101 TATCTCAGCG ATCTGTCTAT TTCGTTTCATC CATAGTTGCC TGACTCCCCG
 30 5151 TCGTGTAGAT AACTACGATA CGGGAGGGCT TACCATCTGG CCCAGTGTCT
 5201 GCAATGATAC CGCGAGACCC ACGCTCACCG GCTCCAGATT TATCAGCAAT
 5251 AAACCAGCCA GCGGGAAGGG CCGAGCGCAG AAGTGGTCTT GCAACTTTAT
 35 5301 CCGCCTCCAT CCAGTCTATT AATTGTTGCC GGAAGCTAG AGTAAGTAGT
 5351 TCGCCAGTTA ATAGTTTGGC CAACGTTGTT GCCATTGCTG CAGGCATCGT
 5401 GGTGTCACGC TCGTCTGTTG GTATGGCTTC ATTACAGCTCC GGTTCCCAAC
 40 5451 GATCAAGGCG AGTTACATGA TCCCCCATGT TGTGCAAAAA AGCGGTTAGC
 5501 TCCTTCGGTC CTCGATCGT TGTGAGAAGT AAGTTGGCCG CAGTGTATC
 5551 ACTCATGGTT ATGGCAGCAC TGCATAATTC TCTTACTGTC ATGCCATCCG
 45 5601 TAAGATGCTT TTCTGTGACT GGTGAGTACT CAACCAAGTC ATTCTGAGAA
 5651 TAGTGTATGC GCGGACCGAG TTGCTCTTGC CCGGCGTCAA CACGGGATAA
 5701 TACCGCGCCA CATAGCAGAA CTTTAAAAGT GCTCATCATT GGAAAACGTT
 5751 CTTGGGGGCG AAAACTCTCA AGGATCTTAC CGCTGTTGAG ATCCAGTTGG
 50 5801 ATGTAACCCA CTCGTGCACC CAACTGATCT TCAGCATCTT TTACTTTTAC
 5851 CAGCGTTTCT GGGTGAGCAA AACAGGAAG GCAAAATGCC GCAAAAAGG
 5901 GAATAAGGCG GACACGGAAA TGTTGAATAC TCATACTCTT CCTTTTTCAA
 55 5951 TATTATTGAA GCATTTATCA GGGTTATTGT CTCATGAGCG GATACATATT
 6001 TGAATGTATT TAGAAAAATA AACAAATAGG GGTCCGCGC ACATTTCCCC
 6051 GAAAAGTGCC ACCTGACGTC TAAGAAACCA TTATTATCAT GACATTAACC
 60 6101 TATAAATAA GOCGTATCAC GAGGCCCTTT CGTCTTCAAG AATTCAGCTG
 6151 CTCGAGGAAG AGCTCAAACC CATGCTACTC TCTGGCTTGA TGAAGCAAC
 6201 GCTTTCATAG CTGAGCTGTC ATAAATAATA AAGAGATTTT TTTATTAATA

ES 2 341 341 T3

6251 TTGAAAAGAT GGGTTATTTA TGTAAGACTC TGTCTTCATT TTAAAAACCA
 6301 CACCTTCCAG TAGTATTCTG TTAAGTTTCT GGCAATCACT GTGATCAAGA
 6351 AGCTACACGG TGAGTTGTGC TTCTCAGTCC TAAGGGATAC ATCTACAAGA
 5 6401 GGCTCCCATC CTGGAAGCTC AGGAAACATT GTAGAAAAGG AGGCAAAAGA
 6451 CTGACAGAGC CAGAGGACCA AGAAATTTGT TGTGAGGTTG TGTCTCCTAC
 6501 TAACAATATA AGCAATATCT ATAAATTGTT GATATCATGG CTACTAAAAT
 10 6551 GTGAGTTGAA CGAGGAGGAC ACAAATGAAC ATGACAATCA GAATGAGGCC
 6601 TCTCACCTGC AAAAAACACT ATAGAGAAGC AGATAAAGCT GTCAGCAGAA
 6651 GAGGCGCACC TCCTTATAGA AGAAGCCTAC CAGGTTTGAT ATATCAGCCT
 15 6701 TGAAAACCTA CATAGTATTT ACATTATATC GAGTCTATGA GACATATTTA
 6751 GTAATGCATA TGTATGTGTG TGTGTGCATG TATGTGTGTA AATACATATG
 6801 TTCATAGAAA AATGTGTAAA AAGAGATCAT GAATTTAAGA GAGAACTGGG
 6851 ACAATTTTTT TCAGGGAGTT GTAATCAGGA AAGTTAAGGG AAAAAATGTTG
 20 6901 TAATTAATAA TCAGGCTCAG AAACAAACAA AGGAAAAGAA AAAAAACAA
 6951 CAACAACAAC AAAAAACAA AACAAAGGAG AAGCTGTATG GCCACAATAG
 7001 CATCTACAGC TAACTGTGAA AGGATAATGG AACAAGTTAT GTACTGCCTA
 25 7051 GAGCAGTATG ATGCCTAAAT CATCTCGACA TGGAGGAAAA TAGAACAAAG
 7101 ACACTCTACA TAGACTATGA TAGAAATCAA AATAAGGTGT AAGACATAGA
 7151 ACATTAGTTT TGTTTGTTGT TCAAAGAGAC TCACATTCCC AAAAAAAAT
 30 7201 CTGTGGGATT TTACAGGTCT GCAATAGCT GCTGACCTGA TGATTTCTGC
 7251 AGCTGTGCCT ACCCTTTGCT GATTTGCATG TACCCAAAGC ATAGCTTACT
 7301 GACATGAGGA TTTCTTCATA GTCAGGTCAC ACCCTTTGCT GGAGTCAGAA
 35 7351 TCACACTGAT CACACACAGT CATGAGTGTG CTCACTCAGG TCCTGGGCTT
 7401 GCTGCTGCTG TGGCTTACAG GTAATGAAGA CAGCACTAGA ATTTTATTGA
 7451 GCTTCCTGTA CACTGTGCTG CTTGTCTCTG TGAAAATTCT CTTGTGAATT
 7501 AATCATGTGG GGATCTGTTT TCAATTTTTC AATTGTAGGT ACGCGTTGTG
 40 7551 ACATTCTGCT GACCCAGTCT CCAGCCACCC TGTCTCTGAG TCCAGGAGAA
 7601 AGAGCCACTT TCTCCTGCAG GGCCAGTCAG AACATTGGCA CAAGCATACA
 7651 GTGGTATCAA CAAAAACAA ATGGTGTCTC AAGGCTTCTC ATAAGGTCTT
 45 7701 CTTCTGAGTC TATCTCTGGG ATCCCTTCCA GGTTTAGTGG CAGTGGATCA
 7751 GGGACAGATT TTAATCTTAC CATCAGCAGT CTGGAGCCTG AAGATTTTGC
 7801 AGTGTATTAC TGTCAACAAA GTAATACCTG GCCATTACG TCCGGCCAGG
 7851 GGACCAAGCT TGAAATCAAA CGTAAGTAGA ATCCAAAGTC TCTTTCTTCC
 50 7901 GTTGTCTATG TCTGTGGCTT CTATGTCTAA AAATGATGTA TAAATCTTA
 7951 CTCTGAAACC AGATTCTGGC ACTCTCCAAG GCAAAGATAC AGAGTAACTC
 8001 CGTAAGCAAA GCTGGGAATA GGCTAGACAT GTTCTCTGGA GAATGAATGC
 55 8051 CAGTGTAAATA ATTAACACAA GTGATAGTTT CAGAAATGCT CTAGTT

ES 2 341 341 T3

SEQ ID NO: 40

Secuencia de nucleótido de la expresión del vector HCVHESp20

```

5      1   CTAGAGAGGT CTGGTGGAGC CTGCAAAAGT CCAGCTTTCA AAGGAACACA
      51   GAAGTATGTG TATGGAATAT TAGAAGATGT TGCTTTTACT CTTAAGTTGG
     101   TTCCTAGGAA AAATAGTTAA ATACTGTGAC TTAAAAATGT GAGAGGGTTT
10    151   TCAAGTACTC ATTTTTTTTAA ATGTCCAAAA TTTTGTCAA TCAATTTGAG
      201   GTCTGTGTTG TGTAGAAGTG ACATTACTTA AAGTTTAACC GAGGAATGGG
      251   AGTGAGGCTC TCTCATACCC TATTCAGAAC TGACTTTTAA CAATAATAAA
     15  301   TTAAGTTTAA AATATTTTTA AATGAATTGA GCAATGTTGA GTTGGAGTCA
      351   AGATGCCCGA TCAGAACCAG AACACCTGCA GCAGCTGGCA GGAAGCAGGT
     20  401   CATGTGGCAA GGCTATTTGG GGAAGGGAAA ATAAAACCAC TAGGTAAACT
      451   TGTAGCTGTG GTTTGAAGAA GTGGTTTGA AACACTCTGT CCAGCCCCAC
     25  501   CAAACCGAAA GTCCAGGCTG AGCAAAACAC CACCTGGGTA ATTTGCATTT
      551   CTAAAATAAG TTGAGGATTC AGCCGAAACT GGAGAGGTCC TCTTTTAACT
      601   TATTGAGTTC AACCTTTTAA TTTTAGCTTG AGTAGTTCTA GTTTCCCCAA
     30  651   ACTTAAGTTT ATCGACTTCT AAAATGTATT TAAGCTTTCT GGGGCAGGCC
      701   AGGCCTGACC TTGGCTTTGG GGCAGGGAGG GGGCTAAGGT GAGGCAGGTG
      751   GCGCCAGCCA GGTGCACACC CAATGCCCAT GAGCCCAGAC ACTGGACGCT
     35  801   GAACCTCGCG GACAGTTAAG AACCAGGGG CCTCTGCGCC CTGGGCCAG
      851   CTCTGTCCCA CACCGCGGTC ACATGSCACC ACCTCTCTTG CAGCCTCCAC
      901   CAAGGGCCCA TCGGTCTTCC CCCTGSCACC CTCTCCAAG AGCACCTCTG
     40  951   GGGGCACAGC GGCCCTGGGC TGCCTGTTCA AGGACTACTT CCCCGAACCG
     45 1001   GTGACGGTGT CGTGGAACTC AGGCGCCCTG ACCAGCGGCG TGCACACCTT
      1051  CCGGCTGTG CTACAGTCCT CAGGACTCTA CTCCCTCAGC AGCGTGGTGA
      1101  CCGTGCCCTC CAGCAGCTTG GGCACCCAGA CCTACATCTG CAACGTGAAT
     45 1151  CACAAGCCCA GCAACACCAA GGTGACAAAG AGAGTTGGTG AGAGGCCAGC
      1201  ACAGGGAGGG AGGGTGTCTG CTGGAAGCCA GGCTCAGCGC TCCTGCCTGG
      1251  ACGCATCCCG GCTATGCAGT CCCAGTCCAG GGCAGCAAGG CAGGCCCCGT
     50 1301  CTGCCTCTTC ACCCGGAGGC CTCTGCCCCG CCCACTCATG CTCAGGGAGA
      1351  GGGTCTTTCTG GCTTTTTTCCC CAGGCTCTGG GCAGGCACAG GCTAGGTGCC
      1401  CCTAAGCCAG GCGCTGCACA CAAAGGGCCA GGTGCTGGGC TCAGACCTGC
      1451  CAAGAGCCAT ATCCGGGAGG ACCCTGCCCC TGACCTAAGC CCACCCCAA
     55 1501  GGCCAAACTC TCCACTCCCT CAGCTCGGAC ACCTTCTCTC CTCCAGATT
      1551  CCAGTAACTC CCAATCTTCT CTCTGCAGAG CCCAAATCTT GTGACAAAAC
      1601  TCACACATGC CCACCGTGCC CAGGTAAGCC AGCCCAGGCC TCGCCCTCCA
     60 1651  GCTCAAGGCG GGACAGGTGC CCTAGAGTAG CCTGCATCCA GGGACAGGCC
      1701  CCAGCCGGGT GCTGACAGT CCACCTCCAT CTCTTCTCTA GCACCTGAAC
      1751  TCCTGGGGGG ACCGTGAGTC TTCTCTTCC CCCCCAAACC CAAGGACACC
     65 1801  CTCATGATCT CCGGACCCC TGAGGTGACA TGCGTGGTGG TGGACGTGAG
      1851  CCACGAAGAC CCTGAGGTCA AGTTCAACTG GTACGTGGAC GCGTGGAGG
      1901  TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG AGCAGTACAA CAGCACGTAC

```

ES 2 341 341 T3

1951 CGTGTGGTCA GCCTCCTCAC CGTCTTGCAC CAGGACTGGC TGAATGGCAA
 2001 GGAGTACAAG TGCAAGGTCT CCAACAAAGC CCTCCCAGCC CCCATCGAGA
 2051 AAACCATCTC CAAAGCCAAA GGTGGGACCC GTGGGGTGGG AGGGCCACAT
 5 2101 GGACAGAGGC CGGCTCGGCC CACCTCTTGC CCTGAGAGTG ACCGCTGTAC
 2151 CAACCTCTGT CCTACAGGG CAGCCCCGAG AACCACAGGT GTACACCCTG
 2201 CCCCCATCCC GGGAGGAGAT GACCAAGAAC CAGGTCAGCC TGACCTGGCT
 10 2251 GGTCAAAGGC TTCTATCCCA GCGACATCGC CGTGGAGTGG GAGAGCAATG
 2301 GGCAGCCGGA GAACAACCTAC AAGACCAAGC CTCCCGTGCT GGACTCCGAC
 2351 GGCTCCTTCT TCCTCTATAG CAAGCTCACC GTGGACAAGA GCAGGTGGCA
 15 2401 GCAAGGGAAC GTCTTCTCAT GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAACC
 2451 ACTACACGCA GAAGAGCCTC TCCCTGTCCC CGGGTAAATG AGTGGGACGG
 2501 CCGGCAAGCC CCGGCTCCCC GGGCTCTGGC GGTGGCAGCA GGATGCTTGG
 20 2551 CACGTACCCC GTCTACATAC TTCCCAAGCA CCCAGCATGG AATAAAGCA
 2601 CCCACCACTG CCTGGGCCCC CTGGGAGACT GTGATGGTTC TTTCACCGG
 2651 TCAGGCCCCG TCTGAGGCCT GAGTGGCATG AGGGAGGCAG AGCGGGTCCC
 2701 ACTGTCCCCA CACTGGCCCC GGCTGTGCAG GTGTGCCTGG GCGGCTTAGG
 25 2751 GTGGGGCTCA GCCAGGGGCT GCGCTCGGCA GGCTGGGGGA TTTCGCAAGC
 2801 TGGCCCTCCC TCCAGCAGCA GCTGCCCTGG GCTGGGCCAC GAGAAGCCCT
 2851 AGGAGCCCCT GGGGACAGAC ACACAGCCCC TGCTCTGTGA GGAGACTGTC
 30 2901 CTGTCTGTG AGCGCCCTGT CCTCCGACCC CGATGCCCCAC TCGGGGGCAT
 2951 GCCTAGTCCA TGCGCGTAGG GACAGGCCCT CCTCACCCTA TCTACCCCCA
 3001 CGGCACTAAC CCTGGCAGC CCGCCCCAGC CTGCGACCCG CATGGGGACA
 35 3051 CAACCGACTC CGGGGACATG CACTCTCGGG CCTGTGGAG GGACTGGTGC
 3101 AGATGCCCCA ACACACACTC AGCCCAGACC CGTTCAACAA ACCCCGCACT
 3151 GAGGTGGGTC GAGCGGGAGT GCGGCCAGAG CCTGCTTCGG CCGTCAGGGA
 3201 GGACTCCCGG GCTCACTCGA AGGAGGTGCC ACCATTTAG CTTTGGTAGC
 40 3251 TTTTCTTCTT CTTTAAATTT TTCTAAAGCT CATTAATTGT CTTTGATGTT
 3301 TCTTTTGTGA TGACAATAAA ATATCCTTTT TAAGTCTTGT ACTTCGTGAT
 3351 GGGAGCCGCC TTCTGTGTG CAGCGCCCTC CTGCCCCCGG TGGGAAGCAC
 45 3401 GGTCAAGAGG AGGCTGGTCC AGCTGCACCT GCGGGGCTCC CTGCACTCGC
 3451 CCCCCGCTC CTGCAGCCAC ACGCATTGCC CGAGCGACCC TCCCTGGCCC
 3501 CTGTCACTAC ATGGACCCCT GGGGCTTCTC CTCTTTTCTA CATGGATGCA
 50 3551 GTTCTCTCTC CTGCTGGGCA CGGTGCTGCC TGCCCTGGTC ACTCTGCGGG
 3601 GGACAGGGCC TCAGGGGAAA GCTGGGTGGA GGCTGGGAGC TGGCTCAGGC
 3651 TGGCCAGGCA GAGCCACAGG GAGGGCCTTC CAGAACCAAC CATGGTCCGA
 3701 AGCGAGAGGT GGGTGTGAGA TCCAGACATG ATAAGATACA TTGATGAGTT
 55 3751 TGGACAAACC ACAACTAGAA TGCAGTGAAA AAAATGCTTT ATTTGTGAAA
 3801 TTTGTGATGC TATTGCTTTA TTGTAAACCA TTATAAGCTG CAATAAACAA
 3851 GTTAACAACA ACAATTGCAT TCATTTTATG TTTGAGGTTC AGGGGGAGGT
 60 3901 GTGGGAGGTT TTTTAAAGCA AGTAAACCTT CTACAAATGT GGTATGGCTG
 3951 ATTATGATCT CTAGTCAAGG CACTATACAT CAAATATTCC TTATTAAACC

65

ES 2 341 341 T3

4001 CTTTACAAAT TAAAAAGCTA AAGGTACACA ATTTTGTGAGC ATAGTTATTA
 4051 ATAGCAGACA CTCTATGCCT GTGTGGAGTA AGAAAAACA GTATGTTATG
 4101 ATTATRACTG TTATGCCTAC TTATAAAGGT TACAGAATAT TTFTCCATAA
 5 4151 TTTTCTTGTA TAGCAGTGCA GCTTTTTCCT TTGTGGTGTA AATAGCAAAG
 4201 CAAGCAAGAG TTCTATTACT AAACACAGCA TGA CTC AAAA AACTTAGCAA
 4251 TTCTGAAGGA AAGTCCTTGG GGTCTTCTAC CTTTCTCTTC TTTTGTGGAG
 10 4301 GAGTAGAATG TTGAGAGTCA GCAGTAGCCT CATCATCACT AGATGGCATT
 4351 TCTTCTGAGC AAAACAGGTT TTCTCATTA AAGGCATTCC ACCACTGCTC
 4401 CCATTTCATCA GTTCCATAGG TTGGAATCTA AAATACACAA ACAATTAGAA
 15 4451 TCAGTAGTTT AACACATTAT AACTTAAAA ATTTTATATT TACCTTAGAG
 4501 CTTTAAATCT CTGTAGGTAG TTTGTCCAAT TATGTCACAC CACAGAAAGTA
 4551 AGGTTCTTTC ACAAAGATCC GGACCAAAGC GGCCATCGTG CCTCCCCACT
 20 4601 CCTGCAGTTC GGGGGCATGG ATGCGGGAT AGCCGCTGCT GGTTCCTGG
 4651 ATGCCGACGG ATTTGCACTG CCGGTAGAAC TCCGCGAGGT CGTCCAGCCT
 4701 CAAGCAGCAG CTGAACCAAC TCGCGAGGGG ATCGAGCCCG GGTGCGCGA
 4751 AGAACTCCAG CATGAGATCC CCGCGCTGGA GGATCATCCA GCCGGCGTCC
 25 4801 CGGAAAACGA TTCCGAAGCC CAACCTTTCA TAGAAGGCGG CGGTGGAATC
 4851 GAAATCTCGT GATGGCAGGT TGGGCGTGGC TTGGTCGGTC ATTTGGAACC
 4901 CCAGAGTCCC GCTCAGAAGA ACTCGTCAAG AAGGCGATAG AAGGCGATGC
 30 4951 GCTGCGAATC GGGAGCGGCG ATACCGTAAA GCACGAGGAA GCGGTCAGCC
 5001 CATTCGCCCC CAAGCTCTTC AGCAATATCA CGGGTAGCCA ACGCTATGTC
 5051 CTGATAGCGG TCGCCACAC CCAGCCGGCC ACAGTCGATG AATCCAGAAA
 5101 AGCGGCCATT TTCCACCATG ATATTGGGCA AGCAGGCATC GCCATGGGTC
 35 5151 ACGACGAGAT CCTCGCGTTC GGGCATGCGC GCCTTGAGCC TGGCGAACAG
 5201 TTGGGCTGGC GCGAGCCCTT GATGCTCTTC GTCCAGATCA TCCTGATCGA
 5251 CAAGACCGGC TTCCATCCGA GTACGTGCTC GCTCGATGCG ATGTTTCGCT
 40 5301 TGGTGGTCGA ATGGGCGAGT AGCCGGATCA AGCGTATGCA GCCGCCGCAT
 5351 TGCATCAGCC ATGATGGATA CTTTCTCGGC AGGAGCAAGG TGAGATGACA
 5401 GGAGATCCTG CCCCGGCACT TCGCCCAATA GAGCCAGTC CTTTCCCGCT
 45 5451 TCAGTGACAA CGTCGAGCAC AGCTGCGCAA GGAACGCCCG TCGTGGCCAG
 5501 CCACGATAGC CGCGCTGCCT CGTCCTGCAG TTCATTGAGG GCACCCGACA
 5551 GGTGCGTCTT GACAAAAAGA ACCGGGCGCC CCTGCGCTGA CAGCCGGAAC
 5601 ACGGCGGCAT CAGAGCAGCC GATTGTCTGT TGTGCCAGT CATAGCCGAA
 50 5651 TAGCCTCTCC ACCCAAGCGG CCGGAGAACC TCGGTGCAAT CCATCTTGT
 5701 CAATCATCGG AAACGATCCT CATCCTGTCT CTTGATCAGA TCTTGATCCC
 5751 CTGCGCCATC AGATCCTTGG CCGCAAGAAA GCCATCCAGT TFACTTTGCA
 55 5801 GGGCTTCCCA ACCTTACCAG AGGGCGCCCC AGCTGGCAAT TCCGGTTCCG
 5851 TTGCTGTCCA TAAACCGGC CAGTCTAGCT ATCGCCATGT AAGCCCACTG
 5901 CAAGCTACCT GCTTTCTCTT TCGGCTTGGC TTTTCCCTTG TCCAGATAGC
 5951 CCAGTAGCTG ACATTTCATC GGGGTGAGCA CCGTTTCTGC GACTTGGCTT
 60 6001 TCTACGTGTT CCGCTTCCTT TAGCAGCCCT TCGGCCCTGA GTGCTTGGCG

ES 2 341 341 T3

6051 CAGCGTGAAG CTTTTTGCAA AAGCCTAGGC CTCCAAAAAA GCCTCCTCAC
 6101 TACTTCTGGA ATAGCTCAGA GCGCGAGGCG GCCTCGGCCT CTGCATAAAT
 6151 AAAAAAATT AGTCAGCCAT GGGGCGGAGA ATGGGCGGAA CTGGGCGGAG
 5 6201 TTAGGGGCGG GATGGGCGGA GTTAGGGGCG GCACTATGGT TGCTGACTAA
 6251 TTGAGATGCA TGCTTTGCACT ACTTCTGCCT GCTGGGGAGC CTGGGGACTT
 6301 TCCACACCTG GTTGCTGACT AATTGAGATG CATGCTTTGC ATACTTCTGC
 10 6351 CTGCTGGGGA GCCTGGGGAC TTTCCACACC CTAAGTGACA CACATTCCAC
 6401 AGCTGCCTCG CGCGTTTCGG TGATGACGGT GAAAACCTCT GACACATGCA
 6451 GCTCCCGGAG ACGGTCACAG CTTGTCTGTA AGCGGATGCC GGGAGCAGAC
 15 6501 AAGCCCGTCA GGGCGCGTCA GCGGCTGTTG GCGGGTGTG GGGCGCAGCC
 6551 ATGACCCAGT CACGTAGCGA TAGCGGAGTG TATACTGGCT TAAGTATGCG
 6601 GCATCAGAGC AGATTGTACT GAGAGTGCAC CATATGCGGT GTGAAATACC
 20 6651 GCACAGATGC GTAAGGAGAA AATACCGCAT CAGGCGCTCT TCCGCTTCTT
 6701 CGCTCACTGA CTCGCTGCGC TCGGTGTTT GCGTCCGGCG AGCGGTATCA
 6751 GCTCACTCAA AGGCGGTAAT ACGGTTATCC ACAGAATCAG GGGATAACGC
 6801 AGGAAAGAAC ATGTGAGCAA AAGGCCAGCA AAAGGCCAGG AACCGTAAAA
 25 6851 AGGCGCGGTT GCTGGCGTTT TTCCATAGGC TCCGCCCCCC TGACGAGCAT
 6901 CACAAAAATC GACGCTCAAG TCAGAGGTGG CGAAACCCGA CAGGACTATA
 6951 AAGATACCAG GCGTTTCCCC CTGGAAGCTC CCTCGTGCGC TCTCCTGTTT
 30 7001 CGACCCCTGCC GCTTACCGGA TACCTGTCCG CCTTTCTCCC TTGGGGAAGC
 7051 GTGGCGCTTT CTCATAGCTC ACGCTGTAGG TATCTCAGTT CGGTGTAGGT
 7101 CGTTGCTCC AAGCTGGGCT GTGTGCACGA ACCCCCCGTT CAGCCCGACC
 35 7151 GCTGCGCCTT ATCCGGTAAC TATGCTCTTG AGTCCACCC GGTAAGACAC
 7201 GACTTATCGC CACTGGCAGC AGCCACTGGT AACAGGATTA GCAGAGCGAG
 7251 GTATGTAGGC GGTGCTACAG AGTTCTTGAA GTGGTGGCCT AACTACGGCT
 40 7301 AACTAGAAG GACAGTATTT GGTATCTGCG CTCTGCTGAA GCCAGTTACC
 7351 TTGGGAAAAA GAGTTGGTAG CTCTTGATCC GGCAACAAA CCACCGCTGG
 7401 TAGCGGTGGT TTTTTTGTTC GCAAGCAGCA GATTACGCGC AGAAAAAAG
 7451 GATCTCAAGA AGATCCTTTG ATCTTTTCTA CCGGGTCTGA CGCTCAGTGG
 45 7501 AACGAAACT CACGTTAAGG GATTTTGGTC ATGAGATTAT CAAAAAGGAT
 7551 CTTACCTAG ATCCTTTTAA ATTAAAAATG AAGTTTAAA TCAATCTAAA
 7601 GTATATATGA GTAAACTTGG TCTGACAGTT ACCAATGCTT AATCAGTGAG
 50 7651 GCACCTATCT CAGCGATCTG TCTATTTGCT TCATCCATAG TTGCCTGACT
 7701 CCGCGTCGTG TAGATAACTA CGATACGGGA GGGCTTACCA TCTGGCCCCA
 7751 GTGCTGCAAT GATACCGCGA GAACCGAGCT CACCGGCTCC AGATTTATCA
 55 7801 GCRATAAACC AGCCAGCCGG AAGGCGCGAG CGCAGAASTG GTCTGTCAAC
 7851 TTTATCCGCC TCCATCCAGT CTATTAATTG TTGCGGGGAA GCTAGAGTAA
 7901 GTAGTTCCGC AGTTAATAGT TTGCGCAACG TTGTTGCCAT TGCTGCAGGC
 7951 ATCGTGGTGT CACGCTCGTC GTTTGGTATG GCTTCATPCA GCTCCGGTTC
 60 8001 CCAACGATCA AGGCGAGTTA CATGATCCCC CATGTTGTGC AAAAAAGCGG
 8051 TTAGCTCCTT CCGTCTCCCG ATCGTGTGTA GAAGTAAGTT GCGCGCAGTG

65

ES 2 341 341 T3

8101 TTATCACTCA TGCTTATGGC AGCACTGCAT AATTCTCTTA CTGTCATGCC
 8151 ATCCGTAAGA TGCTTTTCTG TGA CTGCTGA GTACTCAACC AAGTCATTCT
 5 8201 GAGAATAGTG TATGCGGCGA CCGAGTTGCT CTGCGCGGC GTCAACACGG
 8251 GATAATACCG CGCCACATAG CAGAACTTTA AAAGTGCTCA TCATTGGAAA
 8301 ACGTTCTTCG GGGCGAAAAC TCTCAAGGAT CTTACCGCTG TTGAGATCCA
 8351 GTTCGATGTA ACCCACTCGT GCACCCAACT GATCTTCAGC ATCTTTTACT
 10 8401 TTCACCAGCG TTCTGCGGTG AGCAAAAACA GGAAGGCAAA ATGCCGCAAA
 8451 AAAGGGAATA AGGGCGACAC GGAAATGTTG AATACTCATA CTCTTCCTTT
 8501 TTCAATATTA TTGAAGCATT TATCAGGGTT ATTGTCTCAT GAGCGGATAC
 15 8551 ATATTTGAAT GTATTTAGAA AAATAAACAA ATAGGGGTTT CGCGCACATT
 8601 TCCCGGAAAA GTGCCACCTG ACGTCTAAGA AACCATTATT ATCATGACAT
 8651 TAACCTATAA AAATAGGCGT ATCAGGAGGC CCTTTCGTCT TCAAGAATTC
 20 8701 GAGCTCGGTA CCCATCAGCC AAAAAGCATG CCTGCCACAC AACATCAATT
 8751 TCTGGAAAAC GCTACACTTA ATTATTTCTA GTAGAACAGC TCTTTGGTTT
 8801 GCCAAAAGA ATCACCTATA GTGGCATCTA AGCACAAAAA GGAGAAAAAA
 8851 ATCACAAGA AATGATTGAG AGGCATAATA AAAATTATCA AAAAATTATG
 25 8901 AGTTTTACGA TTTCATCTTT TTCCAAGTTG AAATCATAGG GTGGCTTTAA
 8951 CACAGTGACA AGGAATGTGC ATGCTGCCAT TATGGTGCTC TGCCTAAAAT
 9001 GGTTCGAGCC TTGTCATGCT ACAGAGAAAC TGTCTACAG CAGGGGGTGC
 30 9051 CAAATTTCCA TATTTTTTTA TATCATTGAG CAGGTGCACA GAAGACCAGA
 9101 AAGCACTTTC TATCAGGCTG GCCTTCCTCT TCCTTTCCAG TATGAAGCAA
 9151 AAAGTGCCAA TGAACTAGC AATTGTTAAA TTCTTTTTC AAACAGTATT
 35 9201 TGTGCTATCA GAACATAGTG CATTCAAAAG TCTAGCCTGA GAGACAACC
 9251 CAGTTTTATT CATTCCTCCT ACTACCTCTC TCATTCCCAC TGTGTTGTTT
 9301 CTCCCTCCCA TTTTAATTGT CTATCTAGTC CAACTAAGC ACAGGATCCA
 40 9351 GTCCACATTA AACAACATGT TTTCACCTTA AGTCAAAATC AAGACACCTT
 9401 TAATATCAGC CCTTGTTTAT AATCGTGCTT CTAGTGACTT AATGTACATG
 9451 TCACACTGTA CTGTTGGGTT TTGTGTCTCA TCATGAACAA TGTGTTGAAG
 45 9501 GTATTAAGTG GAGAGTAAGC AGAATTAGAT TCCTCTAATG ATGCACACCC
 9551 AACTAAGAG CAGAAATAAT ATTAATAATA GAAAAAAG TTTTACATGA
 9601 GATTTCAAAT ACCCAGGTAT GAGCTGCAGT TTCTTCAAGT TAAAGCATCG
 9651 AGGTTGTCAG TTACACTATT ACAGGAAACA TATGCAGAGT TTTTATTTTA
 50 9701 GTATATTAGT TTTCACATAT GTGGAATTAC TATTAACTA TTCTTTCTTT
 9751 TCAAATGCTT ACCATTGTAA ATGAGTTTGT GACTTTGTGT AGGTGAGTGC
 9801 ACATGACTCT GGATGCCTAA GAGGACTGAA GAAGTTGGAG TTATAGGTAG
 55 9851 TTTTATTTCTA CTGACTGTT CAGTGCTAAA AATACAACCTG AGGTCTTTTA
 9901 AACTGCTGTT CATGAACCTC TTAATTGATA TATCTCATGA GATCTCTAAA
 9951 CTATTTTTAT TATGACACGT TTCACCATTT TCACTGTAAC GATTTTTATG
 60 10001 TTTTATATTA ATGTAACAT ATGACACTTC CCAAAATCCC CATATTCACA
 10051 ATTGAAGTGT TTCAAAGTTT TACCTGACT TATGGGAAAT GAAAACCCAC
 10101 ATTTTATAT TTTAAATGA AATGTTTATT TTATATTTCT GCAAATTTCA

65

ES 2 341 341 T3

10151 CAAGGAAAGA TTAGTCACTG GTGTGTGAGA GCAGAGGAGC ATAAGAGTTC
 10201 AGGAATAGAA TCCATTATGA TTCTGGAGGC AAGGAAGAAC TGATGCCAAG
 5 10251 GTTTCAGTAT AAGAGCAGTA TCCACTGGAA AGGATAAAGT CACTACATCT
 10301 GAGCACAGAG CAGGACATCT ACATAATGAG TGGTCACTAA TGGGCCACTG
 10351 TTACACTGTT ATATGTATAA GGCTCAAGAA TGAGCACTGA GGCTGTAAAG
 10401 TGTATGGGTG AGGACATCAG GATGTAAACC CAGCTCAGGT AGAGGACTCA
 10 10451 GAGGACAGCA CAGTCAGCAT GAACTAATAA ACATCAGATA AGATAAGGCA
 10501 CAAGCTCAGC TATATAGGGT AAGSGATCTT TGTAAATCTG ATTGTGCATC
 10551 CAGTCTAGTT CAATGTGACT TAGGAAGCCC AGTCATATGC AAATCTAGAG
 15 10601 AAGACTTTAG AGTAGAAATC TGAGGCTCAC CTCACATACC AGCAAGCGAG
 10651 TGACCAGTTA GTCTTAAGGC ACCACTTCTT AGACATCATG GCTTGGGTGT
 10701 GGACCTTGCC ATTCTGTATG GCAGCTGCCC AAAGTAAGAC ATCAGAAAAA
 20 10751 AGAGTTCCAA GGGGAATTGA AGCAGTTCCA TGAATACTCA CCTTCTGTG
 10801 TTTTFTTTCAC AGGTGTCCAG GCAGAGGTGC AGCTGGTGGG GTCAGGAGCC
 10851 GAAGTGAAAA AGCCTGGGGC TTCAGTGAAG GTGTCTTGCA AGGCCTCTGG
 10901 ATACACATTC ACTAATTATA TTATCCACTG GGTGAAGCAG GAGCCTGGTC
 25 10951 AGGCCCTTGA ATGCATTGGA TATTTTAATC CTTACAATCA TGGTACTAAG
 11001 TACAATGAGA AGTTCAAAGG CAGGGCCACA CTAAGTGCAA ACAATCCAT
 11051 CAGCACAGCC TACATGGAGC TCAGCAGCCT GCGCTCTGAG GACACTGCGG
 30 11101 TCTACTACTG TGCAAGATCA GGACCCATG CCTGGTTTGA CACCTGGGGC
 11151 CAAGGGACCA CGGTACCCGT CTCTTCAGGT AAGAATGGCC ACTCTAGGGC
 11201 CTTTGTTTTC TGCTGCTGCC TGTGGGATTT CATGAGCATT GCAAAGTTGT
 35 11251 CCTCGGGACA TGTTCCGAGG GGACCTGGGC GGACTGGCCA GGAGGGGAGG
 11301 GGCACCTGGG TGCCCTTGAGG ATCTGGGAGC CTCTGTGGAT TTTCCGATGC
 11351 CTTTGGAAAA TGGGACTGAG GTTGGGTGCG TCTGAGACAG TAACTCAGCC
 40 11401 TGGGGGCTTG GTGAAGATCG CCGCACAGCA GCGAGTCCGT GAAATATCTT
 11451 ATTTAGACTT GTGAGGTGCG CTGTGTGTCA ATTTACATCT TAAATCCTTT
 11501 ATTGGCTGGA AAGAGAATTG TTGGAGTGGG TGAATCCAGC CAGGAGGGAC
 45 11551 GCGGGGGGAT CCA

SEQ ID NO: 41

50 Secuencia de nucleótido de la expresión del vector HCVHQSp20

1 CTAGAGAGGT CTGGTGGAGC CTGCAAAAGT CCAGCTTTCA AAGGAACACA
 55 51 GAAGTATGTG TATGGAATAT TAGAAGATGT TGCTTTTACT CTTAAGTTGG
 101 TTCTTAGGAA AATAGTTAA ATACTGTGAC TTTAAATGT GAGAGGGTTT
 151 TCAAGTACTC ATTTTTTTAA ATGTCCAAA TTTTGTCAA TCAATTTGAG
 60 201 GTCTTGTTTG TGTAGAACTG ACATTAATA AAGTTTAACC GAGGAATGGG
 251 AGTGAGGCTC TCTCATACC TATTCAGAAC TGACTTTTAA CAATAATAAA
 301 TTAAGTTTAA AATATTTTAA AATGAATTGA GCAATGTTGA GTTGGAGTCA
 351 AGATGGCCGA TCAGAACCAG AACACCTGCA GCAGCTGGCA GGAAGCAGGT
 65 401 CATGTGGCAA GGCTATTTGG GGAAGGGAAA ATAAAACCAC TAGGTAAACT

ES 2 341 341 T3

451 TGTAGCTGTG GTTTGAAGAA GTGGTTTTGA AACACTCTGT CCAGCCCCAC
 501 CAAACCGAAA GTCCAGGCTG AGCAAAACAC CACCTGGGTA ATTTGCATTT
 551 CTAAAATAAG TTGAGGATTC AGCCGAAACT GGAGAGGTCC TCTTTTAACT
 601 TATTGAGTTC AACCTTTTAA TTTTAGCTTG AGTAGTTCTA GTTTCCCCAA
 651 ACTTAAGTTT ATCGACTTCT AAAATGTATT TAAGCTTTCT GGGGCAGGCC
 701 AGGCCTGACC TTGGCTTTGG GGCAGGGAGG GGGCTAAGGT GAGGCAGGTG
 751 GCGCCAGCCA GGTGCACACC CAATGCCCAT GAGCCAGAC ACTGGACGCT
 801 GAACCTCGCG GACAGTTAAG AAGCCAGGGG CCTCTGCGCC CTGGGCCAG
 851 CTCTGTCCCA CACCGCGGTC ACATGGCACC ACCTCTCTTG CAGCCTCCAC
 901 CAAGGGCCCA TCGGTCTTCC CCCTGGCACC CTCTCCAAAG AGCACCTCTG
 951 GGGGCACAGC GGCCCTGGGC TGCCTGGTCA AGGACTACTT CCCCAGAACG
 1001 GTGACGGTGT CGTGGAATC AGGCGCCCTG ACCAGGGGGG TGCACACCTT
 1051 CCGGGCTGTC CTACAGTCTT CAGGACTCTA CTCCCTCAGC AGCGTGGTGA
 1101 CCGTGCCCTC CAGCAGCTTG GGCACCCAGA CCTACATCTG CAACGTGAAT
 1151 CACAAGCCCA GCAACACCAA GGTGGACAAG AGAGTTGGTG AGAGGCCAGC
 1201 ACAGGGAGGG AGGGTGTCTG CTGGAAGCCA GGCTCAGCGC TCCTGCCTGG
 1251 ACGCATCCCC GCTATGCAGT CCCAGTCCAG GGCAGCAAGG CAGGCCCCGT
 1301 CTGCCTCTTC ACCCGGAGGC CTCTGCCCCG CCCACTCATG CTCAGGGAGA
 1351 GGGTCTTCTG GCTTTTTTCC CAGGCTCTGG GCAGGCACAG GCTAGGTGCC
 1401 CCTAACCCAG GCCCTGCACA CAAAGGGGCA GGTGCTGGGC TCAGACCTGC
 1451 CAAGAGCCAT ATCCGGGAGG ACCCTGCCCC TGACCTAAGC CCACCCAAA
 1501 GGCCAAACTC TCCACTCCCT CAGCTCGGAC ACCTTCTCTC CTCCAGATT
 1551 CCAGTAACTC CCAATCTTCT CTCGTGAGAG CCCAAATCTT GTGACAAAAC
 1601 TCACACATGC CCACCGTGCC CAGGTAAGCC AGCCAGGCC TCGCCCTCCA
 1651 GCTCAAGGCG GGACAGGTGC CCTAGAGTAG CCTGCATCCA GGGACAGGCC
 1701 CCAGCCGGGT GCTGACACGT CCACCTCCAT CTCTTCTCA GCACCTGAAC
 1751 TCCTGGGGGG ACCGTGAGTC TTCTCTTCC CCCCAAAACC CAAGGACACC
 1801 CTCATGATCT CCCGGACCCC TGAGGTCACA TGCGTGGTGG TGGACGTGAG
 1851 CCACGAAGAC CCTGAGGTCA AGTTCAACTG GTACGTGGAC GCGGTGGAGG
 1901 TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG AGCAGTACAA CAGCACGTAC
 1951 CGTGTGGTCA GCGTCTCAC CGTCTGAC CAGGACTGGC TGAATGGCAA
 2001 GGAGTACAAG TGCAAGGTCT CCAACAAAGC CCTCCAGCC CCCATCGAGA
 2051 AAACCATCTC CAAAGCCAAA GGTGGGACCC GTGGGGTGCG AGGGCCACAT
 2101 GGACAGAGGC CGGCTCGGCC CACCTCTGTC CCTGAGAGTG ACCGCTGTAC
 2151 CAACCTCTGT CCTACAGGG CAGCCCCGAG AACCACAGGT GTACACCTG
 2201 CCCCCATCCC GGGAGGAGAT GACCAAGAAC CAGGTCAGCC TGACCTGCCT
 2251 GGTCAAAGGC TTCTATCCCA GCGACATCGC CGTGGAGTGG GAGAGCAATG
 2301 GGCAGCCGGA GAACAACACT AAGACCACGC CTCCCGTGCT GGACTCCGAC
 2351 GGCTCCTTCT TCCTCTATAG CAGCTCACC GTGGACAAGA GCAGGTGGCA
 2401 GCAGGGGAAC GTCTTCTCAT GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAACC
 2451 ACTACACGCA GAAGAGCCTC TCCTGTCCC CGGGTAAATG AGTGGACGG

ES 2 341 341 T3

2501 CCGGCAAGCC CCCGCTCCCC GGGTCTCTCGC GGTGCGACGA GGATGCTTGG
 2551 CACGTACCCC GTCTACATAC TTCCCAGGCA CCCAGCATGG AATAAAGCA
 2601 CCCACCACTG CCTTGGGCCC CTGCGAGACT GTGATGGTTC TTTCCACGGG
 2651 TCAGGCCCAG TCTGAGGCCT GAGTGGCATG AGGGAGGCAG AGCGGGTCCC
 2701 ACTGTCCCCA CACTGGCCCA GGCTGTGCAG GTGTGCCCTGG GCGGCTTAGG
 2751 GTGGGGCTCA GCCAGGGGCT GCCCTCGGCA GGGTGGGGGA TTTGCCAGCG
 2801 TGGCCCTCCC TCCAGCAGCA GCTGCCCTGG GCTGGGCCAC GAGAAAGCCCT
 2851 AGGAGCCCCCT GGGGACAGAC ACACAGCCCC TGCCTCTGTA GGAGACTGTC
 2901 CTGTCTCTGT AGCGCCCTGT CCTCCGACCC CGATGCCCCAC TCGGGGGCAT
 2951 GCTTAGTCCA TGCGCGTAGG GACAGCCCCCT CCCTCACCCA TCTACCCCCA
 3001 CGGCACTAAC CCCTGGCAGC CCTGCCCAGC CTCGCACCCG CATGGGGACA
 3051 CAACCGACTC CGGGGACATG CACTCTCGGG CCCTGTGGAG GSACTGCTGC
 3101 AGATGCCCCAC ACACACACTC AGCCCAGACC CGTTCAACAA ACCCCGCACT
 3151 GAGGTTGGTC GAGCGGGAGT GCGGCCAGAG CCTGCCCTCGG CCGTCAGGGA
 3201 GGACTCCCCG GCTCACTCGA AGGAGGTGCC ACCATTTCAG CTTTGGTAGC
 3251 TTTTCTTCTT CTTTTAAATT TTCTAAAGCT CATTAATTGT CTTTGTATGT
 3301 TCTTTTGTGA TGACAATAAA ATATCCTTTT TAAGTCTTGT ACTTCGTGAT
 3351 GGGAGCCGCG TTCTGTGTTC CACGGGCCTC CTGCCCCCGG TGGGAAGCAC
 3401 GGTCAAGAGG AGGCTGGTCC AGCTGCACCT CGGGGGCTCC CTGCACTCGC
 3451 CCCCCGCTC CTGCAGCCAC ACGCATTGCC CGAGCGACCC TCCCTGGCCC
 3501 CTGTCACTAC ATGGACCCCT GGGGCTTCTC CTCTTTTCTA CATGGATGCA
 3551 GTTTCTCCTC CTGCTGGGCA CGGTGCTGCC TGCCCTGGTC ACTCTGCGGG
 3601 GGACAGGGCC TCCAGGGAAA GCTGGGTGGA GGCTGGGAGC TGGCTCAGGC
 3651 TGGCCAGGCA GAGCCACAGG GAGGGCCTTC CAGAACCAAC CATGGTCCGA
 3701 AGCGAGAGGT GGGTGTGAGA TCCGACATG ATAAGATACA TTGATGAGTT
 3751 TGGACAAACC ACAACTAGAA TGCAGTGAAA AAAATGCTTT ATTTGTGAAA
 3801 TTTGTGATGC TATTGCTTTA TTTGTAACCA TTATAAGCTG CAATAAACAA
 3851 GTTAACAACA ACAATTGCAT TCATTTTATG TTTGAGGTTT AGGGGGAGGT
 3901 GTGGGAGGTT TTTTAAAGCA AGTAAACCT CTACAAATGT GGTATGGCTG
 3951 ATTATGATCT CTAGTCAAGG CACTATACAT CAATATTCC TTATTACCC
 4001 CTTTACAAAT TAAAAAGCTA AAGGTACACA ATTTTGTAGC ATAGTTATTA
 4051 ATAGCAGACA CTCTATGCCT GTGTGGAGTA AGAAAAACA GTATGTTATG
 4101 ATTATAACTG TTATGCCCTAC TTATAAAGGT TACAGAAATAT TTTTCCATAA
 4151 TTTTCTTGTA TAGCAGTGCA GCTTTTTCCT TTGTGGTGTA AATAGCAAAG
 4201 CAAGCAAGAG TTCTATTACT AAACACAGCA TGA CTCAAA AACTTAGCAA
 4251 TTCTGAAGGA AAGTCCTTGG GGTCTTCTAC CTTTCTCTTC TTTTGTGGAG
 4301 GAGTAGAATG TTGAGAGTCA GCAGTAGCCT CATCATCACT AGATGGCATT
 4351 TCTTCTGAGC AAAACAGGTT TTCCTCATT AAGGCATTCC ACCACTGCTC
 4401 CCATTCTATCA GTTCCATAGG TTGGAATCTA AAATACACAA ACAATTAGAA
 4451 TCAGTATTTT AACACATTAT ACACCTTAAA ATTTTATATT TACCTTAGAG
 4501 CTTTAAATCT CTGTAGGTAG TTTGTCCAAT TATGTCACAC CACAGAAGTA

ES 2 341 341 T3

4551 AGGTTCCCTTC ACAAAGATCC GGACCAAAGC GGCCATCGTG CCTCCCCACT
 4601 CCTGCAGTTC GGGGGCATGG ATGCGCGGAT AGCCGCTGCT GGTTCCTGG
 5 4651 ATGCGGACGG ATTTGCACTG CCGGTAGAAC TC CGCGAGGT CGTCCAGCCT
 4701 CAGGCAGCAG CTGAACCAAC TCGCGAGGGG ATCGAGCCCC GGGTGGGCGA
 4751 AGAACTCCAG CATGAGATCC CCGCGCTGGA GGATCATCCA GCCGGCGTCC
 4801 CGGAAACGA TTCCGAAGCC CAACCTTTCA TAGAAGGCGG CGGTGGAATC
 10 4851 GAAATCTCGT GATGGCAGGT TGGGCGTCGC TTGGTCGGTC ATTTGGAACC
 4901 CCAGAGTCCC GCTCAGAAGA ACTCGTCAAG AAGGCGATAG AAGGCGATGC
 4951 GCTGCGAATC GGGAGCGGCG ATACCGTAAA GCACGAGGAA GCGGTCAGCC
 15 5001 CATTCGCCGC CAAGCTCTTC AGCAATATCA CGGGTAGCCA ACCGTATGTC
 5051 CTGATAGCGG TCGGCCACAC CCAGCCGGCC ACAGTCGATG AATCCAGAAA
 5101 AGCGGCCATT TTCCACCATG ATATTCGGCA AGCAGGCATC GGCATGGGTC
 20 5151 ACGACGAGAT CCTCGCGCTC GGGCATGCGC GCCTTGAGCC TGGCGAACAG
 5201 TTCGGCTGGC GCGAGCCCCT GATGCTCTTC GTCCAGATCA TCCTGATCGA
 5251 CAAGACCGGC TTCCATCCGA GTACGTGCTC GCTCGATGCG ATGTTTCGCT
 25 5301 TGTGGTCCA ATGGGCAGGT AGCCGATCA AGCCTATGCA GCCGCCGCAT
 5351 TGCATCAGCC ATGATGGATA CTTTCTCGGC AGGAGCAAGG TGAGATGACA
 5401 GGAGATCCG CCCCGGCACT TCGCCCAATA GCAGCCAGTC CCTTCCCGCT
 5451 TCAGTGACAA CGTCGAGCAC AGCTGCGCAA GGAACGCCCC TCGTGGCCAG
 30 5501 CCACGATAGC CGCGCTGCCT CGTCTGCGAG TTCATTGAGG GCACCGGACA
 5551 GGTCCGTCTT GACAAAAGA ACCGGGCGCC CCTGCGCTGA CAGCCGGAAC
 5601 ACCGCCGCAT CAGAGCAGCC GATTGTCTGT TGTGCCAGT CATAGCCGAA
 35 5651 TAGCCTCTCC ACCCAAGCGG CCGGAGAACC TCGTGCAAT CCATCTGTGT
 5701 CAATCATGCG AAACGATCCT CATCTGTCT CTGATCAGA TCTTGATCCC
 5751 CTGCGCCATC AGATCCTTGG CGGCAAGAAA GCCATCCAGT TTACTTTGCA
 40 5801 GGGCTTCCCA ACCTTACCAG AGGGCGCCCC AGCTGGCAAT TCCGTTTCGC
 5851 TTGCTGTCCA TAAAACCGCC CAGTCTAGCT ATCGCCATGT AAGCCCACTG
 5901 CAAGCTACCT GCTTTCTCTT TCGCTTGGG TTTTCCCTTG TCCAGATAGC
 45 5951 CCAGTAGCTG ACATTCATCC GGGGTCAGCA CCGTTTCTGC GGACTGGCTT
 6001 TCTACGTGTT CCGCTTCTT TAGCAGCCCT TCGGCCCTGA GTGCTTGGG
 6051 CAGCGTGAAG CTFTTTGCAA AAGCCTAGGC CTCCAAAAA GCCTCTTCAC
 6101 TACTTCTGGA ATAGCTCAGA GGCCGAGGCG GCCTCGCCCT CTGCATAAAT
 50 6151 AAAAAAATT AGTCAGCCAT GGGGCGGAGA ATGGGCGGAA CTGGGCGGAG
 6201 TTAGGGGCGG GATGGGCGGA GTTAGGGGCG GGACTATGGT TGCTGACTAA
 6251 TTGAGATGCA TGCTTTGCAT ACTTCTGCCT GCTGGGAGC CTGGGGACTT
 55 6301 TCCACACCTG GTTGCTGACT AATTGAGATG CATGCTTTGC ATACTTCTGC
 6351 CTGCTGGGGA GCCTGGGGAC TTTCCACACC CTAAGTACA CACATTCCAC
 6401 AGCTGCCTCG CGCGTTTCGG TGATGACGGT GAAAACTCT GACACATGCA
 60 6451 GCTCCCCGAG ACGGTCACAG CTTGTCTGTA AGCGGATGCC GCGAGCAGAC
 6501 AAGCCCGTCA GCGCGCTCA GCGGTGTTG GCGGCTGTC GCGCGCAGCC
 6551 ATGACCCAGT CACGTAGCGA TAGCGGAGTG TATACTGGCT TAACTATGCG

65

ES 2 341 341 T3

6601 GCATCAGAGC AGATTGTACT GAGAGTGCAC CATATGCGGT GTGAAATACC
 6651 GCACAGATGC GTAAGGAGAA AATACCGCAT CAGGCGCTCT TCCGCTTCTT
 6701 CGCTCACTGA CTCGCTGCGC TCGGTCTTTC GGCTGCGGCG AGCGGTATCA
 5 6751 GCTCACTCAA AGGCGGTAAAT ACGGTTATCC ACAGAATCAG GGGATAACGC
 6801 AGGAAGAAGC ATGTGAGCAA AAGGCCAGCA AAAGGCCAGG AACCGTAAAA
 6851 AGGCCGCGTT GCTGGCGTTT TTCCATAGGC TCCGCCCCCC TGACGAGCAT
 10 6901 CACAAAAATC GACGCTCAAG TCAGAGGTGG CGAAACCCGA CAGGACTATA
 6951 AAGATACCAG GCGTTTCCCC CTGGAAGCTC CCTCGTGGCG TCTCTGTTC
 7001 CGACCCCTGCC GCTTACCGGA TACCTGTCCG CCTTTCTCCC TTCCGGGAAGC
 15 7051 GTGGCGCTTT CTCATAGCTC ACGCTGTAGG TATCTCAGTT CCGTGTAGGT
 7101 CGTTCCGCTCC AAGCTGGGCT GTGTGCACGA ACCCCCCGTT CAGCCCGACC
 7151 GCTGCGCCTT ATCCGGTAAC TATCGTCTTG AGTCCAACCC GGTAAAGACAC
 20 7201 GACTTATCGC CACTGGCAGC AGCCACTGGT AACAGGATTA GCAGAGCGAG
 7251 GTATGTAGGC GGTGCTACAG AGTTCTTGAA GTGGTGGCCT AACTACGGCT
 7301 ACACTAGAAG GACAGTATTT GGTATCTGCG CTCTGCTGAA GCCAGTTACC
 7351 TTCCGAAAAA GAGTTGGTAG CTCTTGATCC GGCAACAAA CCACCGCTGG
 25 7401 TAGCGGTGGT TTTTTTGTTC GCAAGCAGCA GATTACCGC AGAAAAAAG
 7451 GATCTCAAGA AGATCCTTTG ATCTTTTCTA CCGGGTCTGA CGCTCAGTGG
 7501 AACGAAAACT CACGTTAAGG GATTTTGGTC ATGAGATTAT CAAAAAGGAT
 30 7551 CTTCACCTAG ATCCTTTTAA ATTAAAAATG AAGTTTTAAA TCAATCTAAA
 7601 GTATATATGA GTAAACTTGG TCTGACAGTT ACCAATGCTT AATCAGTGAG
 7651 GCACCTATCT CAGCGATCTG TCTATTTCTG TCATCCATAG TTGCCTGACT
 35 7701 CCCCCTCGTG TAGATAACTA CGATACGGGA GGGCTTACCA TCTGGCCCCA
 7751 GTGCTGCAAT GATACCGCGA GACCCACGCT CACCGGCTCC AGATTTATCA
 7801 GCAATAAACC AGCCAGCCGG AAGGGCCGAG CGCAGAAAGT GTCTGCAAC
 7851 TTTATCCGCC TCCATCCAGT CTATTAATTG TTGCCGGGAA GCTAGAGTAA
 40 7901 GTAGTTCCGC AGTTAATAGT TTGCGCAACG TTGTTGCCAT TGCTGCAGGC
 7951 ATCGTGGTGT CACGCTCCTC GTTTGGTATG GCTTCATTCA GCTCCGGTTC
 8001 CCAACGATCA AGGCGAGTTA CATGATCCCC CATGTTGTGC AAAAAAGCGG
 45 8051 TTAGCTCCTT CCGTCTCTCC ATGGTTGTCA GAAGTAAGTT GGCCGCACTG
 8101 TTATCACTCA TGGTTATGGC AGCACTGCAT AATTCTCTTA CTGTCATGCC
 8151 ATCCGTAAGA TGCTTTTCTG TGA CTGGTGA G TACTCAACC AAGTCATTCT
 50 8201 GAGAATAGTG TATGCGGCGA CCGAGTTGCT CTTGCCCGGC GTCAACACGG
 8251 GATTAATACG CGCCACATAG CAGAACTTTA AAAGTGCTCA TCATTGGAAA
 8301 ACGTTCTTCG GGGCGAAAAC TCTCAAGGAT CTTACCGCTG TTGAGATCCA
 55 8351 GTTCGATGTA ACCCACTCGT GCACCCAACT GATCTTCAGC ATCTTTTACT
 8401 TTCACCAGCG TTTCTGGGTG AGCAAAAACA GGAAGGCAAA ATGCCGCAAA
 8451 AAAGGGAATA AGGGCGACAC GGAAATGTTG AATACTCATA CTCTTCTTTT
 8501 TTCAATATTA TTGAAGCATT TATCAGGGTT ATTGTCTCAT GAGCGZATAC
 60 8551 ATATTGGAAT GTATTTAGAA AAATAACAA ATAGGGGTTT CGCGCACATT
 8601 TCCCCGAAAA GTGCCACCTG ACGTCTAAGA AACCATTATT ATCATGACAT

65

ES 2 341 341 T3

8651 TAACCTATAA AAATAGGCGT ATCACGAGGC CCTTTCGTCT TCAAGAATTC
 8701 GAGCTCGGTA CCCATCAGCC AAAAAGCATG CCTGCCACAC AACATCAATT
 5 8751 TCTGGAAAAC GCTACACTTA ATTATTTCTA GTAGAACAGC TCTTTGGSTTT
 8801 GCCAAAAAGA ATCACCTATA GTGGCATCTA AGCACAAAAA GGAGAAAAAA
 8851 ATCACAAGA AATGATTGAG AGGCATAATA AAAATTATCA AAAAATTATG
 8901 AGTTTTACGA TTTCATCTTT TTCCAAGTTG AAATCATAGG GTGGCTTTAA
 10 8951 CACAGTGACA AGGAATGTGC ATGCTGCCAT TATGGTGCTC TGCTAAAAT
 9001 GGTTCGAGCC TTGTCATGCT ACAGAGAAAC TGTCATACAG CAGGGGGTGC
 9051 CAAATTTCCA TATTTTTTTA TATCATTGAG CAGGTGCACA GAAGACCAGA
 15 9101 AAGCACTTTC TATCAGGCTG GCCTTCCTCT TCCTTTCCAG TATGAAGCAA
 9151 AAAC TGCCAA TGAACTAGC AATTGTTAAA TTCTTTTTC AAACAGTATT
 9201 TGTGCTATCA GAACATAGTG CATTCAAAAG TCTAGCCTGA GAGAACAAACC
 20 9251 CAGTTTTATT CATTCCTCTT ACTACCTCTC TCATTCCAC TGTGTGTGT
 9301 CTCCTCCCA TTTTAATTGT CTATCTAGTC CAAACTAAGC ACACGATCCA
 9351 GTCCACATTA AACACATGT TTTCACTTA AGTCAATAC AAGACACCTT
 25 9401 TAATATCAGC CCTTGTTCAT AATCGTGCTT CTAGTGACTT AATGTACATG
 9451 TCACACTGTA CTGTGGGTT TTGTGTCTCA TCATGAACAA TGTGTGAAG
 9501 GTATTAAGTG GAGAGTAAGC AGAATTAGAT TCCTCTAATG ATGCACACCC
 9551 AACTAAGAG CAGAAATAAT ATTAATAATA GAAAAAAG TTTTACATGA
 30 9601 GATTTCAAAT ACCCAGGTAT GAGCTGCAGT TTCTTCAAGT TAAAGCATCG
 9651 AGGTGTGAG TTACACTATT ACAGGAAACA TATGCAGAGT TTTTATTTA
 9701 GTATATTAGT TTTCACATAT GTGGAATTAC TATTAAACTA TTCTTTCTTT
 35 9751 TCAAATGCTT ACCATTGTAA ATGAGTTTGT GACTTTGTGT AGGTGAGTGC
 9801 ACATGACTCT GGATGCCTAA GAGGACTGAA GAAGTTGGAG TTATAGGTAG
 9851 TTTTATTCTA CTTGACTGTT CAGTGCTAAA AATACAACTG AGGTCTTTA
 40 9901 AACTGCTGTT CATGAACCTC TTAATTGATA TATCTCATGA GATCTCTAAA
 9951 CTATTTTTAT TATGACACGT TTCACCATT TCACTGTAAC GATTTTTATG
 10001 TTTTATATTA ATGTAACAT ATGACACTTC CCAAAATCCC CATATTCACA
 45 10051 ATTGAAGTGT TTCAAAGTTT TACCTTGACT TATGGGAAAT GAAACCCAC
 10101 ATTTTATART TTTAAAATGA AATGTTTATT TTATATTTCT GCAAATTTCA
 10151 CAAGGAAAGA TTAGTCACTG GTGTGTGAGA GCAGAGGAGC ATAAGAGTTC
 10201 AGGAATAGAA TCCATTATGA TTCTCGAGGC AAGGAAGAAC TGATGCCAAG
 50 10251 GTTTCAGTAT AAGAGCAGTA TCCACTGGAA AGGATAAAGT CACTACATCT
 10301 GAGCACAGAG CAGGACATCT ACATAATGAG TGGTCACTAA TGGGCCACTG
 10351 TTACACTGTT ATATGTATTA GGCTCAAGAA TGAGCACTGA GGCTGTAAGG
 55 10401 TGTATGGGTG AGGACATCAG GATGTAAAC CAGCTCAGGT AGAGGACTCA
 10451 GAGGACAGCA CAGTCAGCAT GAACTAATTA ACATCAGATA AGATAAGGCA
 10501 CAAGCTCAGC TATATAGGGT AAGGGATCTT TGTAAATCTG ATTGTGCATC
 60 10551 CAGTCTAGTT CAATGTGACT TAGGAAGCCC AGTCATATGC AAATCTAGAG
 10601 AAGACTTTAG AGTAGAAATC TGAGGCTCAC CTCACATACC AGCAAGCGAG
 10651 TGACCAGTTA GTCTTAAGGC ACCACTTCTT AGACATCATG GCTTGGGTGT

ES 2 341 341 T3

```

10701  GGACCTTGCC ATTCCTGATG GCAGCTGCCC AAAGTAAGAC ATCAGAAAAA
10751  AGAGTTCCAA GGGGAATTGA AGCAGTTCCA TGAATACTCA CCTTCCTGTG
10801  TTCTTTTCAC AGGTGTCCAG GCACAGGTGC AGCTGGTGGG GTCAGGAGCC
10851  GAAGTGAAAA AGCCTGGGGC TTCAGTGAAG GTGTCCTGCA AGGCCTCTGG
10901  ATACACATTC ACTAATTATA TTATCCACTG GGTGAAGCAG GAGCCTGGTC
10951  AGGGCCTTGA ATGGATTGGA TATTTTAATC CTTACAATCA TGGTACTAAG
11001  TACAATGAGA AGTTCAAAGG CAGGGCCACA CTAAGTGCAG ACAAATCCAT
11051  CAGCACAGCC TACATGGAGC TCAGCAGCCT GCGCTCTGAG GACACTGCGG
11101  TCTACTACTG TGCAAGATCA GGACCCCTATG CCTGGTTTGA CACCTGGGGC
11151  CAAGGGACCA CGGTCACCGT CTCCTCAGGT AAGAATGGCC ACTCTAGGGC
11201  CTTTGTTTTT TGCTGCTGCC TGTGGGATTT CATGAGCATT GCAAAGTTGT
11251  CCTCGGGACA TGTTCCGAGG GGACCTGGGC GGACTGGCCA GGAGGGGAGC
11301  GGCACCTGGG TGCCCTTGAGG ATCTGGGAGC CTCTGTGGAT TTTCCGATGC
11351  CTTTGGAAAA TGGGACTGAG GTTGGGTGCG TCTGAGACAG TAACTCAGCC
11401  TGGGGGCTTG GTGAAGATCG CCGCACAGCA GCGAGTCCGT GAAATATCTT
11451  ATTTAGACTT GTBAGGTGCG CTGTGTGTCA ATTTACATCT TAAATCCTTT
11501  ATTGGCTGGA AAGAGAATTG TTGGAGTGGG TGAATCCAGC CAGGAGGGAC
11551  GCGGGGGGAT CCA

```

Ejemplo 9

Eficacia In vitro de los anticuerpos humanizados que se unen a CD45RO/RB

VHE/humV1 y VHQ/humV1

Para determinar la eficacia de los anticuerpos humanizados que se unen a CD45RO/RB VHE/humV1 y VHQ/humV1 en comparación con el anticuerpo quimérico se analiza la capacidad para inducir apoptosis en las células T humanas y también la capacidad para inhibir la proliferación de célula T humana.

Células y Reactivos

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aíslan de las muestras de leucoféresis y los donantes humanos saludables con un tipo de sangre conocido, pero tipo HLA desconocido mediante centrifugación sobre Ficoll-Hypaque (Pharmacia LKB). El PBMC utilizado como estimulador se vacía primero de las células T y NK al utilizar glóbulos ferromagnéticos recubiertos con CD3 (Miltenyi). Los glóbulos y las células contaminantes se remueven mediante campo magnético. El PBMC agotado de célula T se utilizan como células estimuladoras después de la irradiación (50 Gy). Las células T CD4⁺ son utilizadas como células de respuesta en el MLR y se aíslan del PBMC con un kit de selección negativo de células CD4 (Miltenyi).

Las células obtenidas se analizan mediante FACScan o FACSCalibur (Becton Dickinson & Co., CA) y la pureza de las células obtenidas es de >75%. Las células se suspenden en un medio RPMI1640 complementado con 10% de FCS, inactivado caliente, penicilina, estreptomycin y L-glutamina.

Ensayos de Apoptosis

El PBMC humano de los tres donantes voluntarios saludables se cultiva en un medio de crecimiento (RPMI1640+10% de FCS) durante toda la noche (<16h) en presencia del mAb quimérico que se une al CD45RO/RB, los anticuerpos humanizados (VHE/humV1 y VHQ/humV1) o el mAb de control anti-LPS. Si se indica, un reactivo de reticulación, el fragmento F(ab')₂ de IgG anti-humano de cabra (Cat.No.109-006-098, JacksonLab) se incluye a un µg/ml de concentración que es dos veces tan alto como la concentración de anticuerpos anti-CD45 de la muestra. La concentración de PBS en todos los pozos introducida por los reactivos del anticuerpo se mantiene constante entre todas las muestras, a saber a 20% (v/v) para las muestras sin reticulador o a 40%(v/v) para las muestras con reticulador. Experimentos anteriores demuestran que la cantidad de PBS no afecta la lectura.

Después de cultivo durante toda la noche en la presencia de los anticuerpos, las muestras se someten a análisis de citometría de flujo y a tñido con la AnnexinaV-FITC marcador de apoptosis (Cat.No. 556419, BD/Pharmingen) y el marcador de célula T CD2-PE (Cat.No. 556609, BD/Pharmingen). Las muestras se corren en un instrumento FACSCalibur de Becton Dickinson y los datos se analizan utilizando un software CellQuest Pro.

A partir de los datos recolectados, las curvas se obtienen utilizando el software Origin v7.0300 La ecuación utilizada para el ajuste es

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + (x/x_0)^p} + A_2 \quad (\text{"Sigmoid-Logistic"})$$

A_1 : valor final (para las sesiones de ajuste establecidas en "compartido" y "flotante")

A_2 : valor inicial (para las sesiones de ajuste establecidas en "compartido" y "flotante")

P : poder

X_0 : ED_{50} ; IC_{50} (ver adelante).

En ausencia del reticulador, el VHE/humV1 es más efectivo, con un valor ED_{50} de 148 ± 71 nM, seguido por VHQ/humV1 con 377 ± 219 nM. El anticuerpo quimérico que se une CD45RO/RB es menos efectivo con un valor ED_{50} de 2440 ± 1205 nM.

En la presencia de antisuero de reticulación, los valores ED_{50} se cambian dramáticamente hacia mayor eficacia por al menos dos órdenes de magnitud. Además, la presencia de un reticulador permite mayores niveles de apoptosis a muy altas concentraciones de anticuerpo, alcanzando ahora hasta el 80% mientras que la ausencia del reticulador solo permite hasta el 50% de apoptosis. En la presencia del reticulador, las curvas (concentración de anticuerpo/% apoptosis) son bi-modales con dos mesetas: la primer meseta se alcanza a bajas concentraciones de anticuerpo (~5 nM), mientras que el nivel de apoptosis corresponde al nivel máximo obtenido en ausencia de reticulador. En la segunda meseta se alcanza la concentración más alta de anticuerpo para (~500 nM) y se observa apoptosis dentro del 70-80% de la población de célula T.

Ambos mAb humanizados que se unen a CD45RO/RB son igualmente efectivos y mejor o iguales comparados con el mAb quimérico que se une a CD45RO/RB con respecto a su capacidad para inducir apoptosis a células T humanas primarias.

Ensayo de linfocito mezclado

Uno $\times 10^5$ PBMC o 5×10^4 de las células CD4+ se mezclan con PBMC irradiado del que se han agotado 1×10^5 o 5×10^4 células T (50 Gy) en cada pozo de placas de cultivo de 96 pozos en la presencia o ausencia de diferentes concentraciones de mAb.

Las células mezcladas se cultivan durante 5 días y se determina la proliferación al pulsar las células con 3H -timidina durante las últimas 16-20 horas de cultivo. La inhibición MLR en cada concentración de anticuerpo se expresa como la inhibición porcentual como se describió en el ejemplo 2.

El efecto de incrementar las concentraciones de VHE/humV1 y VHQ/humV1 sobre MLR se evalúa en el respondedor 3: combinaciones estimuladoras. Todos los anticuerpos inhiben el MLR de una manera dependiente de dosis. Los valores IC_{50} (ver anteriormente) son similares para el Ab VHE/humV1 (7 ± 7 nM) y VHQ/humV1 (39 ± 54 nM) humanizados. Ambos anticuerpos humanizados son más potentes para inhibir el MLR que el anticuerpo quimérico parental (IC_{50} de 347 ± 434 nM). Como se ve usualmente con los experimentos MLR, la variabilidad del donante es alta en estos experimentos.

VHE-N73D/humV1

Para manejar el efecto biológico del VHE-N73D/humV1 que induce apoptosis en las células mononucleares periféricas sanguíneas humanas (PBM) los PBMC objetivo se incuban durante toda la noche en presencia de varias concentraciones de VHE-N73D/humV1 y se analizan posteriormente para unión del marcador de apoptosis AnnexinV mediante análisis de citometría de flujo. Los PBMC se incuban durante toda la noche en medio de cultivo de tejido que tiene varias concentraciones del VHE-N73D/humV1 u otra variante de la molécula que se une a CD45RO/RB humanizado, VHE/humV1, o el anti-CD45RO/RB mAb quimérico o un mAb de control IgG1 isotipo. Además, se agregan los fragmentos $F(ab')_2$ de reticulación del IgFc antihumano de cabra a $2 \times$ la concentración de masa de cada mAb, semejando reticulación del anticuerpo humanizado CD45RO/RB mediante los receptores Fc que pueden ocurrir *in vivo*. Al siguiente día las células se lavan mediante centrifugación durante 10 min a 400 veces la gravedad estándar y el medio removido. Las células se suspenden en el amortiguador FACS (PBS que contiene el 1% v/v de FBS, 0.1% w/v de EDTA y 0.1% w/v de azida sodio) y se siembran en placas microtituladoras con un fondo de 96 pozos con una densidad celular de 1×10^5 células por pozo. Cada muestra de célula se incuba durante 30 minutos a $4^\circ C$ en $50 \mu l$ de amortiguador FACS que contiene $100 \mu g/ml$ de suero de ratón normal para bloquear sitios de unión no específicos sobre las células con CD2 conjugado a ficoeritrina (PE) para identificar las células T humanas. Después de lavar dos

ES 2 341 341 T3

veces mediante centrifugación, las células se resuspenden en 100 μ l de amortiguador que tiñe AnnexinV “calcium-proficient” (Vendor BD/Pharmingen kit 556419) que contiene 1:100 v/v de AnnexinV marcada con FITC. Luego de la incubación durante 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad, se agrega 7-amino actinomicina D (7-AAD) para dar una concentración final de 1 μ g/ml y se analiza utilizando un citómetro de flujo FACS Calibur (Becton Dickinson). Los valores ED₅₀ para la eficacia de los anticuerpos para inducir apoptosis se puede calcular de los análisis de la cantidad de apoptosis (= intensidad de la fluorescencia de AnnexinV-FITC) inducida como una función de la concentración del anticuerpo utilizando el software Origin 7.5 con una ecuación de ajuste de curva sigmoidal/Logística.

Luego de tales análisis se observa un efecto bifásico de todos los anticuerpos humanizados CD45RO/RB probados: a bajas concentraciones de anticuerpo, se encuentra un bajo nivel de menos de 30% de apoptosis de célula T. El valor ED₅₀ para alcanzar el nivel de esta apoptosis se calcula como 0.31 ± 0.13 nM para VHE-N73D/humV1. A mayores concentraciones de anticuerpo, la apoptosis se puede inducir hasta en el 70% de las células T. El valor ED₅₀ para alcanzar este mayor nivel de apoptosis se calcula como 352 ± 83 nM para VHE-N73D/humV1. En resumen, se encuentra que el VHE-N73D/humV1 también induce apoptosis en células T humanas, que se puede mejorar mediante reticulación.

Ejemplo 10

20 Especificidad de la molécula de unión CD45RB/RO

Molécula de unión CD45RB/RO quimérica

La molécula CD45 se expresa sobre todos los leucocitos. Sin embargo, diferentes isoformas CD45 se expresan mediante varios subconjuntos de leucocitos. Con el fin de determinar la reactividad del subconjunto de leucocitos de la molécula de anticuerpo quimérico que se une a CD45RB/RO se efectúa la marcación inmunofluorescente de los leucocitos humanos con marcadores específicos de subconjunto y marcación inmunofluorescente simultánea con el anticuerpo quimérico que se denomina CD45RB/RO conjugado con tinte, seguido por análisis de citometría de flujo.

Los subconjuntos específicos para una preparación recientemente aislada de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC), plaquetas humanas, neutrófilos de sangre periférica humana o citoblastos hematopoyéticas derivadas de la ósea humana se identifican mediante incubación con anticuerpos acoplados a ficoeritrina contra CD2 (linfocitos T), CD14 (monocitos), CD19 (linfocitos B), CD34 (células madre), CD42a (plaquetas), CD56 (linfocitos citolíticos naturales) o CD66b (granulocitos). La unión simultánea de una molécula de unión CD45RB/RO quimérica marcada con FITC se detecta sobre los linfocitos, monocitos, células madre, linfocitos citolíticos naturales y granulocitos pero no sobre las plaquetas o los linfocitos B.

VHE-N73D/humV1

Con el fin de determinar la reactividad del subconjunto de leucocitos de la marcación inmunofluorescente del VHE-N73D/humV1 de los leucocitos marcados con marcadores específicos e inmunofluorescencia simultánea se efectúa la marcación con un VHE-N73D/humV1 conjugado con tinte, seguido por análisis de citometría de flujo.

En resumen, los subconjuntos específicos de una preparación recientemente aislada de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) o neutrófilos de sangre periférica humana se identifican luego de la incubación con los anticuerpos acoplados a ficoeritrina contra CD3, CD4, CD8 (linfocitos T), CD14 (monocitos), CD16 (linfocitos citolíticos naturales y monocitos), CD19 (linfocitos B), o CD66b (granulocitos). La unión simultánea del VHE-N73D/humV1 marcada con el FITC se detecta sobre los linfocitos T, monocitos, células madre, linfocitos citolíticos naturales y granulocitos pero no sobre los linfocitos B. Así, las moléculas de VHE-N73D/humV1 no reaccionan con los linfocitos B humanos.

Ejemplo 11

55 *Introducción in vitro de las células T supresoras (o células reguladoras) y de células T funcionalmente paralizadas T*

Para demostrar la capacidad de un anticuerpo quimérico que se une a CD45RO/RB para inducir las células T supresoras, el anticuerpo está incluido en varias concentraciones durante la generación de las estirpes celulares T CD8+ reactivas con la proteína matriz de antígeno 1 (MP1) del hemófilo de la influenza. Estas estirpes son generadas a través de co-cultivo repetido de los linfocitos humanos CD8+ con los monocitos humanos CD14+ pulsados con el antígeno. Posteriormente, los monocitos CD14+ se pueden reemplazar con una estirpe celular positiva de antígeno-2 de leucocito humano como una célula que presenta antígeno MP1 (APC). Si tales células T CD8+ específicas de MP1 provenientes de un cultivo contienen el anticuerpo quimérico que se une al CD45RO/RB se mezclan con células T CD8+ humanas recientemente aisladas y esta mezcla de células se estimula con el antígeno MP1 sobre el APC, la adición de las células T CD8+ del cultivo en la presencia de la molécula CD45RO/RB es capaz de reducir la producción de IFN-gama en una forma dependiente de dosis de anticuerpo. Ningún anticuerpo quimérico que se une al CD45RO/RB está presente durante este cultivo de ensayo y FIN-gama indicando que el pre-tratamiento con el CD45RO/RB ha inducido células T CD8+ capaces de suprimir la activación de células T recientemente aisladas.

En razón de esta inducción de las células reguladoras T supresoras por medio del anticuerpo quimérico que se une a CD45RO/RB, el anticuerpo puede ser útil en enfermedades, donde una población de células T desreguladas y/o activadas se cree que contribuye a la patología. Ejemplos de tales enfermedades incluyen enfermedades autoinmunes, enfermedades por rechazo, soriasis, enfermedad inflamatoria del intestino y alergias.

Para demostrar la capacidad de una molécula que se une a CD45RO/RB quimérica para hacer que las células T tengan hiporespuesta (anérgica) a estimulación adicional es decir para paralizar funcionalmente las células T, el anticuerpo está incluido durante la generación de las estirpes celulares CD8+ reactivas con la proteína de matriz de antígeno 1(MP1) del hemófilo de la influenza como se subrayó anteriormente. La parálisis se evalúa al activar las células T (expuestas antes al anticuerpo quimérico que se une a CD45RO/RB) con el antígeno MP1 presentado por la molécula que se une al APC N° CD45RO/RB está presente en este cultivo. Las células CD8+ T no expuestas al anticuerpo quimérico que se une al CD45RO/RB previamente producen IFN- γ luego del estímulo mencionado. En contraste, las células CD8+ T pretratadas con anticuerpo quimérico que une CD45RO/RB muestran una producción marcadamente reducida a inexistente de esta citocina en respuesta al estímulo de antígeno, que demuestra la capacidad del anticuerpo quimérico que se une a CD45RO/RB al paralizar funcionalmente las células T humanas. En razón de la inducción de la hiperrespuesta a la célula T funcional por la molécula que se une a CD45RO/RB, el anticuerpo se puede utilizar en enfermedades, tales como enfermedades autoinmunes tales como rechazo por trasplante, soriasis, dermatitis, enfermedad inflamatoria del intestino o alergias donde se cree que una población de células T activadas contribuyen a la patología.

Ejemplo 12

Estudios in vivo en ratones Skin SCID-hu

El beneficio terapéutico del anticuerpo quimérico que se une a CD45RB/RO en inflamación de piel se prueba utilizando ratones SCID. La piel humana proveniente de individuos normales se trasplanta sobre ratones SCID (Skin SCID-hu) y el proceso inflamatorio se semeja mediante transferencia adoptiva de los leucocitos mononucleares aislados de los individuos humanos no relacionados con el donante de la piel humana.

Trasplante de piel adulta humana en ratones SCID (ratones Skin SCID-hu)

Dos piezas pequeñas (1 cm²) de piel adulta humana (obtenida del West Hungarian Regional Tissue Bank; WHRTB, Gyor) que consiste de la epidermis completa, la dermis papilar y parte de la dermis reticular, se trasplantan a los lados trasero superior derecho e izquierdo en los ratones SCID. Los ratones C.B 17 /GbmTac-Prkdc^{scid} Lyst^{bg} (Taconic, Germantown, NY) en reemplazo de la piel del ratón. La calidad de los injertos se monitorea durante 5-6 semanas siguientes al trasplante y los ratones con trasplante exitoso (ratones Skin SCID-hu, generalmente > 85%) se seleccionan para pruebas *in vivo* del anticuerpo quimérico que se une al CD45RB/RO.

Injerto de células mononucleares en ratones SCID

Los leucocitos mononucleares (Spl) se aíslan de biopsias de bazo de adulto humano (WHRTB, Gyor) después de la suspensión de células (utilizando un tamiz de disociación de célula equipado con una malla de tamaño 50) y los procedimientos de gradiente de densidad estándar. Las alícuotas de $\sim 5 \times 10^8$ Spl se resuspenden en 1.5 ml de RPMI-10% de FCS y se inyectan intraperitonealmente (i.p.), en el día experimental 0, en los ratones Skin SCID-hu. Estos números Spl se han encontrado en experimentos previos por ser suficientes para inducir un xeno-GvHD letal >90% de los ratones dentro de las 4-6 semanas después de la transferencia celular.

Tratamiento de anticuerpo de los ratones Skin SCID-hu

Los ratones Skin SCID-hu, reconstituidos con Spl humano, se tratan con anticuerpo quimérico que se une a CD45RB/RO o con el control anti-LPS mAb en el día 0, inmediatamente después de la inyección de célula mononuclear, en los días 3 y 7 y a intervalos semanales posteriormente. Los anticuerpos se suministran subcutáneamente (s.c.) en 100 μ l de PBS a una concentración final de 1 mg/kg de peso de cuerpo (b.w.).

Evaluación del tratamiento anti-CD45

La eficacia del anticuerpo quimérico que se une al CD45RB/RO se evalúa mediante la supervivencia de los ratones trasplantados y al monitorear el rechazo de los injertos de piel. La significancia de los resultados se evalúa mediante el método estadístico de análisis de supervivencia utilizando la prueba Log-rank (método Mantel) con la ayuda del software Systat v10. Al final de las biopsias del experimento de los injertos de piel humana y del hígado de ratón, pulmón, riñón y bazo se obtienen de ratones sacrificados para propósitos histológicos. Todos los ratones se pesan al inicio (antes de la transferencia celular) y a través del experimento (cada 2 días) como una estimación indirecta de su estado de salud. Las líneas de regresión lineal son generadas utilizando el peso del cuerpo versus los valores de días de transferencia post-PBMC obtenidos de cada uno de los ratones y posteriormente, sus pendientes (control versus ratones tratados anti-CD45) se comparan utilizando la prueba no paramétrica Mann-Whitney.

Resultados

Los injertos de piel humana son muy bien tolerados por los ratones SCID. Inicialmente, los injertos sufren un periodo de hiperproliferación de queratinocito que resulta en la formación de unas incrustaciones hiperqueratóticas. Aproximadamente 5 semanas después del trasplante, las incrustaciones caen de los injertos y revelan un tejido que contiene todas las estructuras características observadas en la piel humana normal. Durante este proceso, los injertos de piel humana se funden con la piel de ratón adyacente y generan una red de vasos humanos recientemente crecidos que conectan los injertos con el tejido de ratón subyacente. El Spl circulante trasferido hacia los ratones Skin SCID-hu (en el día experimental 0, aproximadamente 6 semanas después del trasplante de piel) infiltran los injertos de piel y después del reconocimiento de las moléculas de aloantígeno expresadas sobre la piel humana montan una respuesta inflamatoria; que tiene semejanza con el proceso inflamatorio que ocurre en la piel de soriasis y que en algunos casos destruye completamente el injerto.

El tratamiento de estos con el anticuerpo quimérico que se une a CD45RB/RO suprime el proceso inflamatorio y evita el rechazo de los injertos de piel humana. En contraste, la muestra obtenida de los ratones tratados con control muestra una infiltración masiva con múltiples signos de necrosis y una destrucción dramática de la epidermis. Este proceso es fácilmente monitoreado por el ojo y documentado por fotografía simple de los ratones.

Seis de cada seis ratones Skin SCID-hu transferidos con SPL humano alogénico y tratados con anti-LPS mAb de control muestran una respuesta inflamatoria fuerte claramente visible por el ojo 23 días después de la transferencia de célula mononuclear. Todos los ratones muestran considerables lesiones, incluyendo le eritema, descamación y pústulas pronunciadas. En contraste los injertos de piel de todos los ratones tratados con anticuerpo quimérico que se denomina CD45RB/RO tienen una apariencia normal. Las diferencias dramáticas entre los dos grupos de ratones son específicamente debidas al tratamiento de anticuerpo razón a que la piel humana de todos los ratones tiene una apariencia idéntica al inicio del experimento. Este aspecto no cambia hasta la segunda semana después de la transferencia de la célula, tiempo en el cual el grupo de control inicia el desarrollo de lesiones de piel. El experimento se termina en el día 34 después de la transferencia mononuclear. Para ese tiempo, uno de los ratones de control ya había muerto (día 30) los otros 4 se habían sacrificado (días 27, 27, 27, y 30) debido a un fuerte xeno-GvHD. La reacción patológica observada en los ratones tratados con control de anticuerpo también se correlaciona con la pérdida de peso de cuerpo en estos animales.

En contraste, el grupo tratado con el anticuerpo quimérico que se une con CD45RB/RO exhibe un estado saludable durante el tiempo completo del experimento.

Ejemplo 13

Actividades in vivo de un anticuerpo quimérico que se une a CD45RB/RO en un modelo de trasplante de célula islote humano

Ratones

Los ratones hembra NOD/SCID (Charles River Laboratories, Calco, Italia) se mantienen bajo condiciones específicas libres de patógeno. El nivel de glucosa en la sangre de la cola venosa se cuantifica utilizando un sistema Glucometer Elite (Bayer, Alemania). La diabetes se induce en los ratones NOD/SCID mediante inyección intravenosa de 180 mg/kg de estreptozotocina (Sigma, St.Luis, MO). Un diagnóstico de la diabetes se hace después de dos mediciones de glucosa consecutiva mayor de 250 mg/dl.

Preparación de islote y trasplante

Los páncreas se obtienen de donantes multiórgano cadavéricos con el corazón palpitante. Los islotes se aíslan de acuerdo con el método descrito en Bertuzzi *et al.*, Diabetes, 1999, 48: 1971-8. Los islotes purificados se cultivan en matraces estériles que contienen 25 ml de medio M 199 (Seromed Biochrom, Berlín, Alemania) complementado con 10% de FCS, 1% de L-glutamina, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin (medio completo). Los islotes se incuban a 30° en 5% de CO₂ y 95% de aire humidificado. Los ratones se anestesian con una inyección intraperitoneal de avertina y se trasplantan alícuotas de 1500 IE de islotes humanos bajo la cápsula de piel de los ratones NOD/SCID diabéticos receptores, como se describió en Davalli A.M. *et al.*, Diabetes, 1996, 45: 1161-7. Se inyectan 50 x 10⁶ de PBMC recientemente aislados intraperitoneal a los ratones NOD/SCID.

Tratamiento de los ratones trasplantados

Los ratones trasplantados Hu-PBL-NOD/SCID se tratan con s.c. tratados por días 0, +3 y +5 con 1 mg/kg de un anticuerpo quimérico que se une a CD45RB/RO. Los ratones de control se tratan con la solución salina o con mAb purificado con IgG (Vinci.Biochem, Italia).

Análisis histológico

Los polos del riñón que contienen el injerto de islote humano se congelan instantáneamente en Tissue Tek (Miles Lab., IN) y se almacenan a -70°. Secciones congeladas de 5 μ m de grueso se tiñen con mAb biotilado contra insulina humana o CD3 humano seguido por conjugado de estreptavidina-peroxidasa. Se utiliza diaminobenzidina (DAKO, Carpinteria, CA) como cromógeno y hematoxilina como contrateñido. La infiltración de linfocitos de los injertos se evalúa sobre hematoxilina y las secciones congeladas teñidas con eosina.

Resultados

Los resultados en los ratones NOD/SCID normales trasplantados con islotes humanos permanecen normoglicémicos hasta los 100 días postrasplante, mientras que el tiempo de rechazo medio de los ratones hu-PBL-NOD/SCID con los islotes humanos es de 35 ± 13 días. El tratamiento corto de los ratones hu-PBL-NOD/SCID trasplantados con islotes humanos con mAB de la presente invención prolongan significativamente la supervivencia de los islotes humanos con una tasa de supervivencia mayor del 70% del día 60 y 50% en el día 100 postrasplante.

El análisis histológico de los injertos de islote humano efectuados a los 100 días postrasplante en los ratones hu-PBL-NOD/SCID muestran una infiltración masiva de células T positivas CD3+, CD4+ y CD8+ positivas en los ratones receptores de control. En contraste, en los ratones receptores tratados con un anticuerpo quimérico que se une a CD45RB/RO se observa una infiltración significativamente inferior de las células humanas. El teñido positivo para la insulina demuestra la función de injerto en los ratones receptores hu-PBL-NOD/SCID tratados con un anticuerpo quimérico que se une con CD45RB/RO comparado con los ratones receptores de control. Un islote trasplantado y con un anticuerpo quimérico que se une con CD45RB/RO tratado en ratones hu-PBL-NOD/SCID con islote trasplantado y tratados con anticuerpo quimérico que se une a CD45RB/RO cantidades inferiores de IFN-gama humana se detectan en el suero comparado con los ratones receptores de control.

Estos datos indican que el tratamiento de corto plazo con el anticuerpo quimérico que se une a CD45RB/RO conduce a una supervivencia del injerto de islote humano prolongado y al inhibir la reacción de rechazo mediada por leucocito *in vivo*.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo humanizado que tiene una especificidad de unión tanto por el CD45RO como por el CD45RB que comprende la región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 31 o 32 y una región variable de cadena liviana de la SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8.
2. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 1 que tiene una especificidad de unión tanto por el CD45RO como el CD45RB que comprende:
- 10 Una región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 31 y una región variable de una cadena liviana de la SEQ ID NO: 7,
- 15 Una región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 31 y una región variable de cadena liviana de la SEQ ID NO: 8,
- 20 Una región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 32 y una región variable de cadena liviana de la SEQ ID NO: 7, o
- Una región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 32 y una región variable de cadena liviana de la SEQ ID NO: 8.
3. Polinucleótidos aislados que codifican el anticuerpo humanizado de las reivindicaciones 1 o 2.
- 25 4. Un vector de expresión que comprende los polinucleótidos de las reivindicaciones 3 cuyo vector es capaz de producir un anticuerpo humanizado cuando dicho vector está presente en una célula o huésped compatible.
5. Una célula anfitriona aislada que comprende un vector de expresión de la reivindicación 4.
- 30 6. Un anticuerpo humanizado de las reivindicaciones 1 o 2 para uso como farmacéutico.
7. El anticuerpo de la reivindicación 6 para uso en el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades autoinmunes, rechazo por trasplante, soriasis, dermatitis, enfermedades inflamatorias del intestino y/o alergias.
- 35 8. El anticuerpo de la reivindicación 7 en el tratamiento y/o profilaxis de la enfermedad del injerto contra el anfitrión (GVHD).
9. El anticuerpo de la reivindicación 7 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de rechazo por trasplante de célula islote pancreática.
- 40 10. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de la reivindicación 1 o 2 en asocio con por lo menos un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

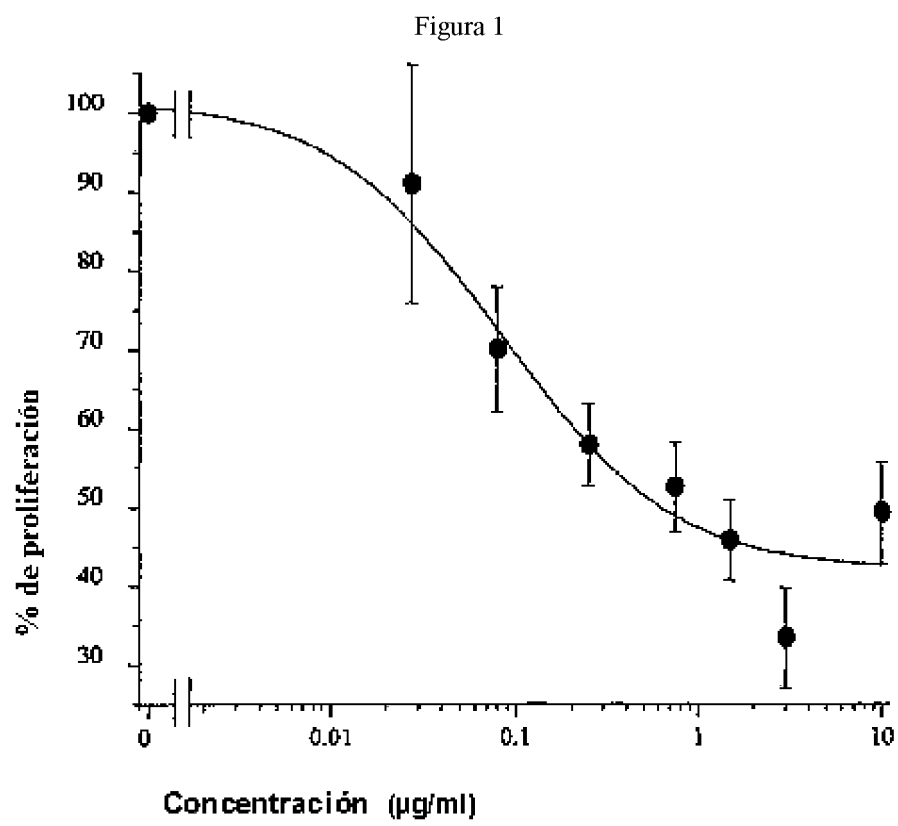


Figura 2

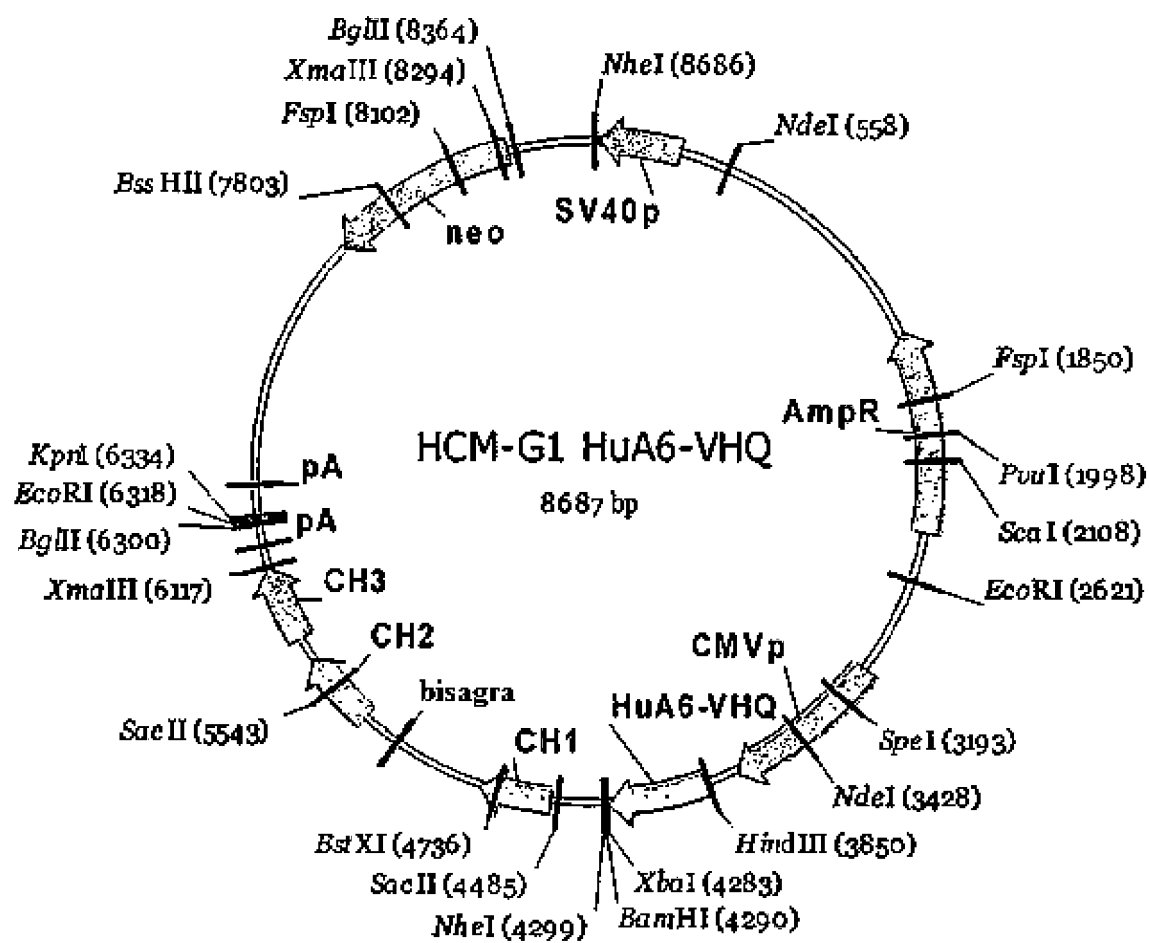


Figura 3

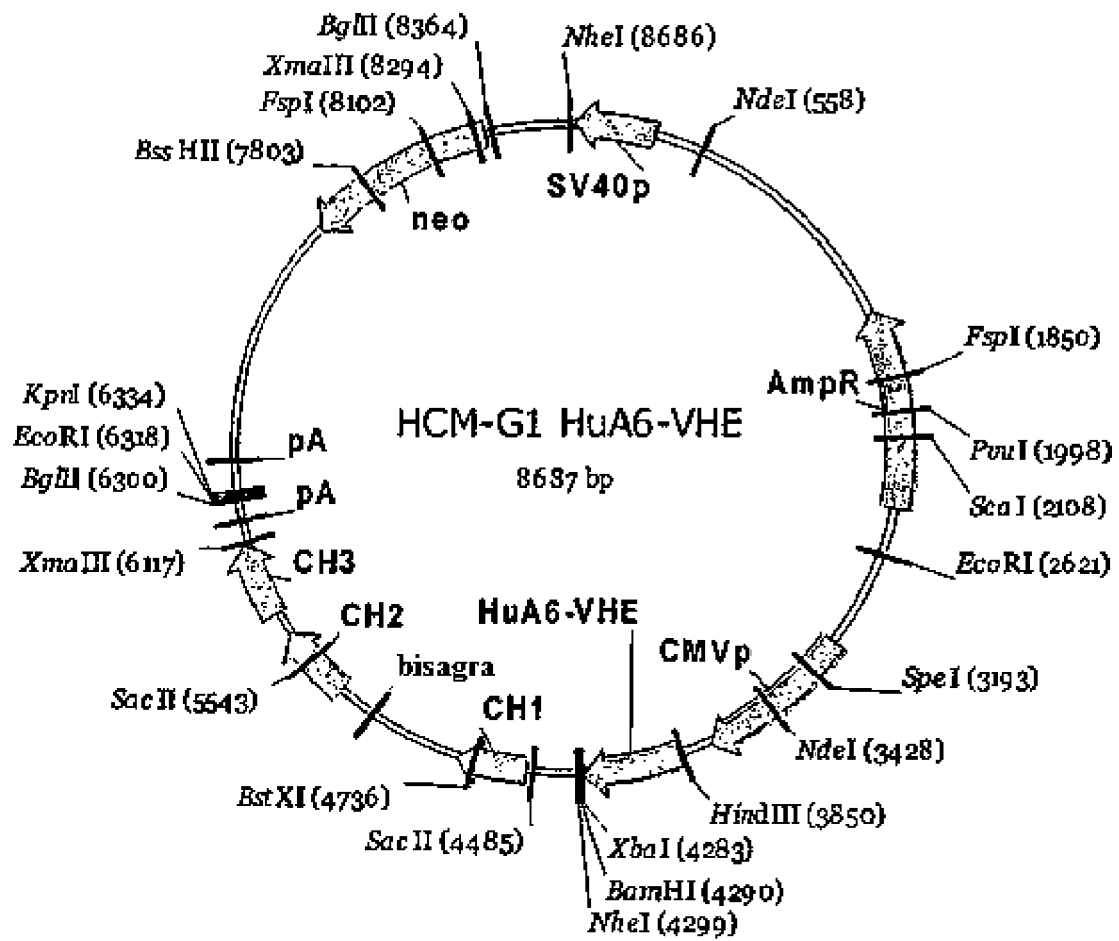


Figura 4

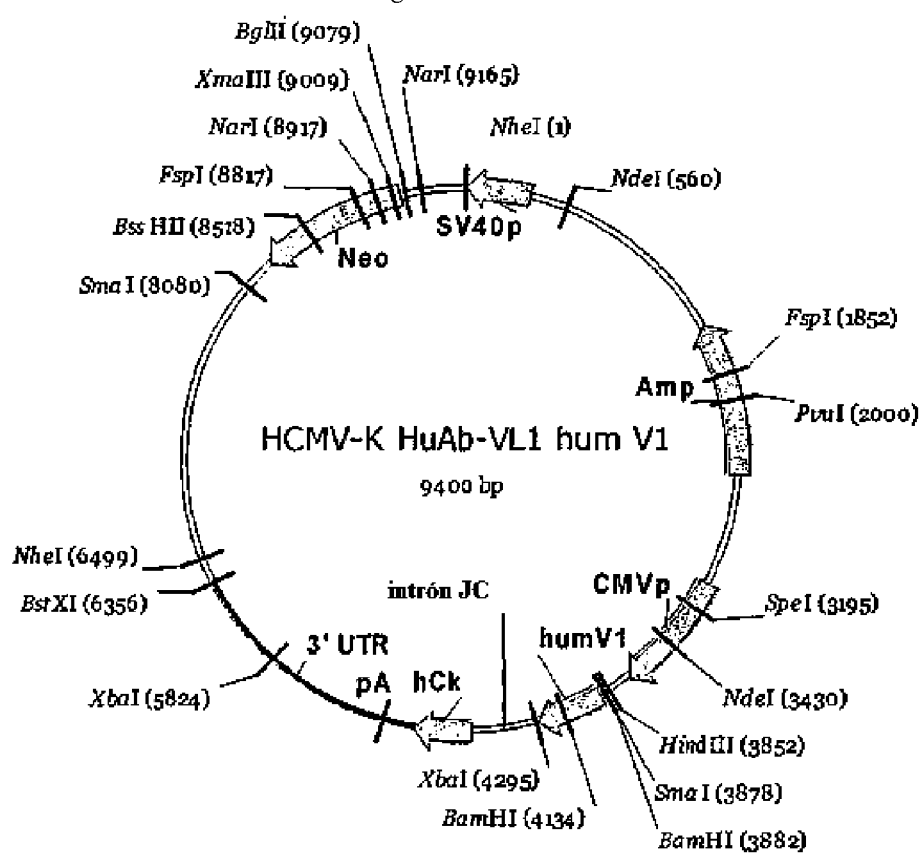
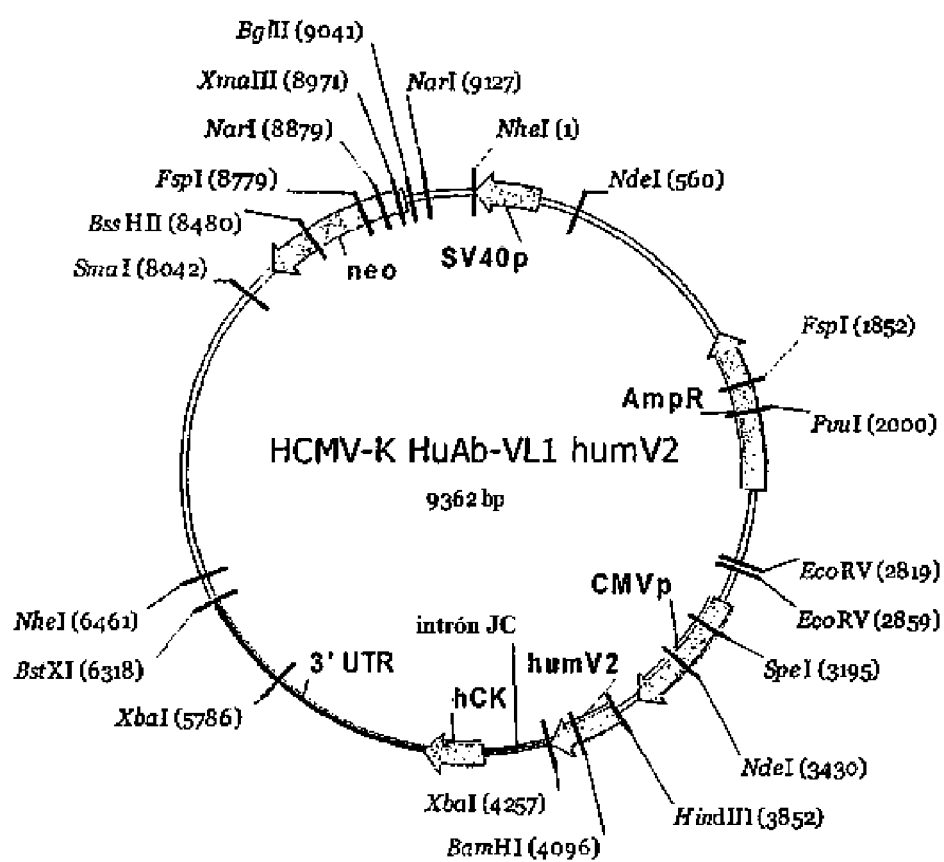


Figura 5



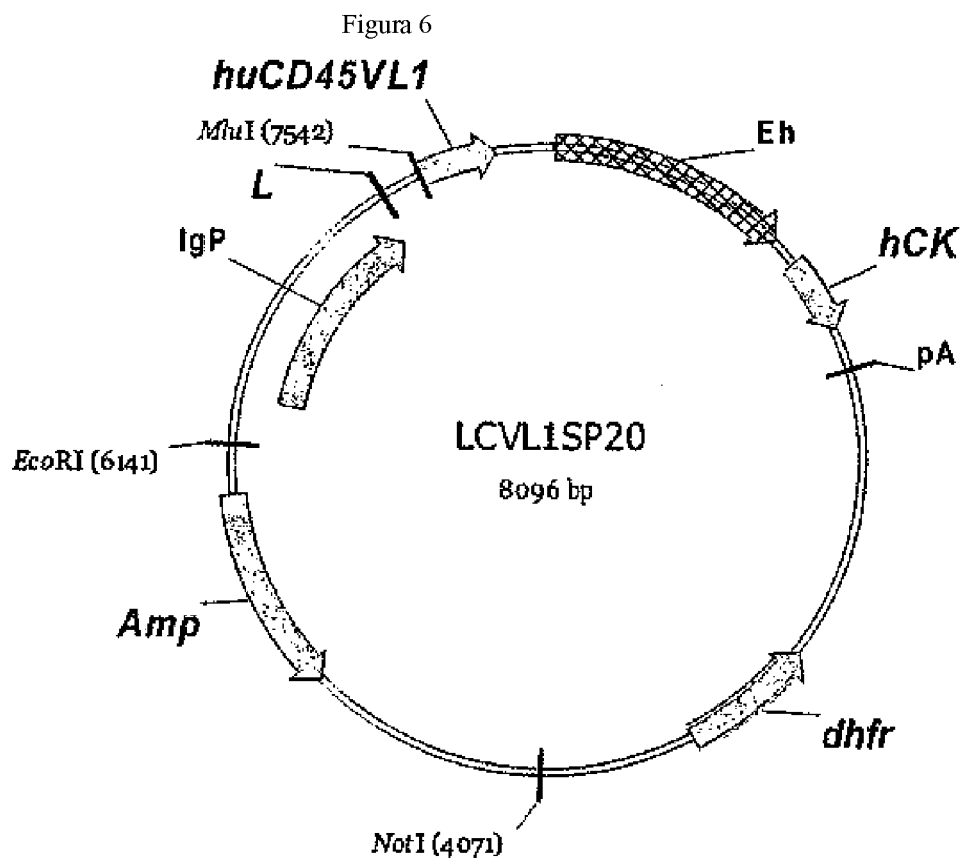
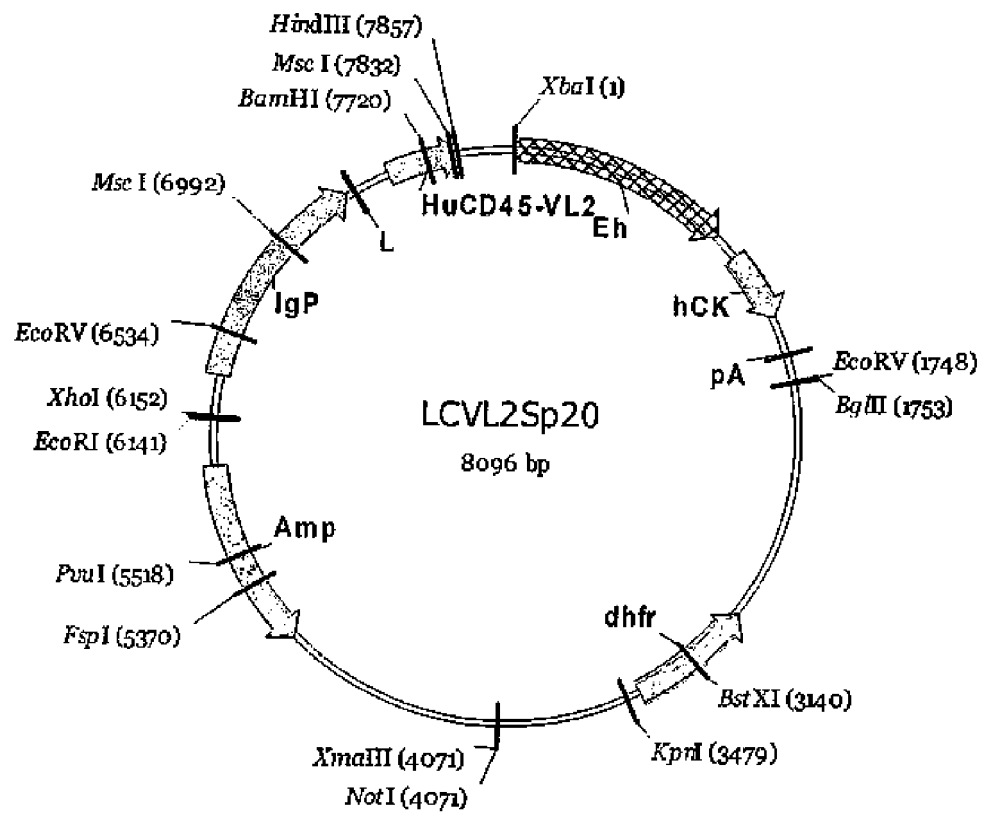


Figura 7



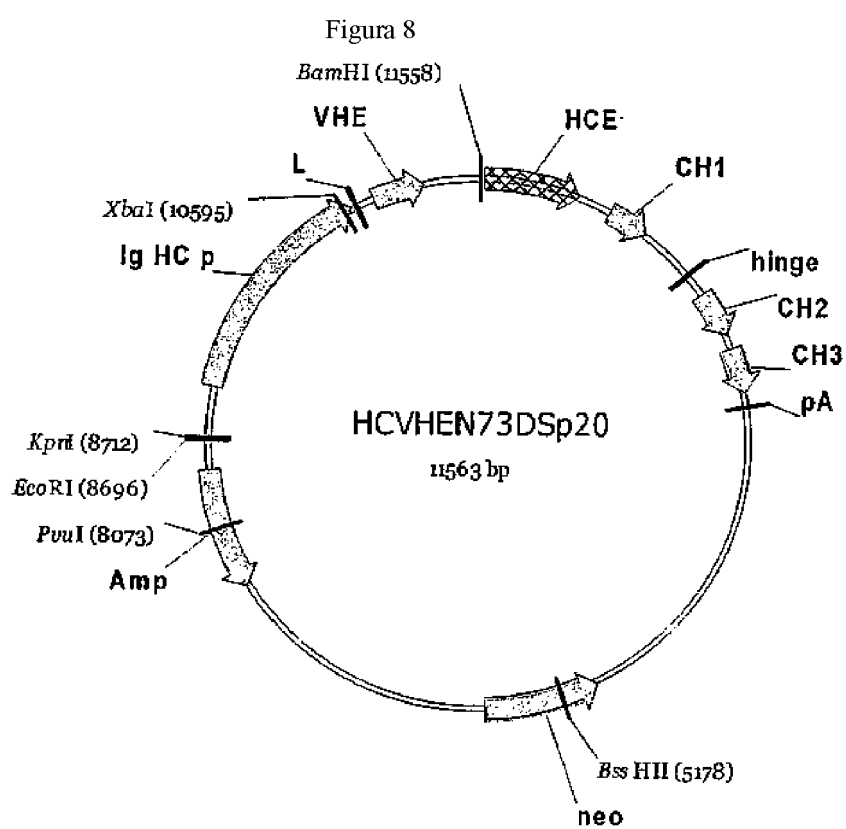


Figura 9

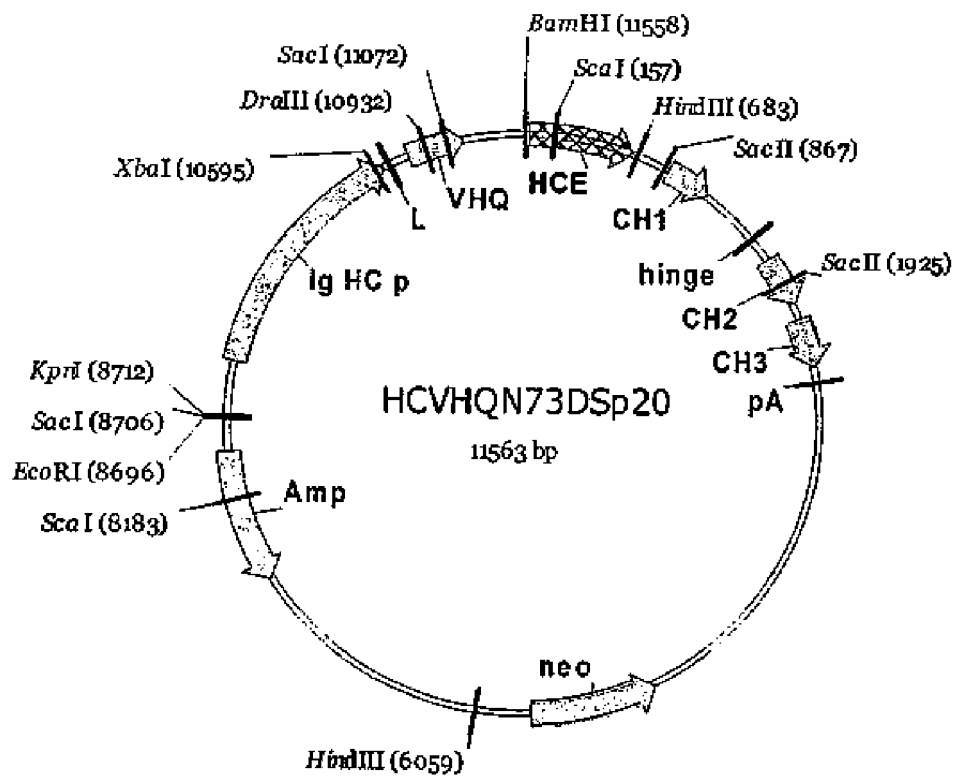


Figura 10

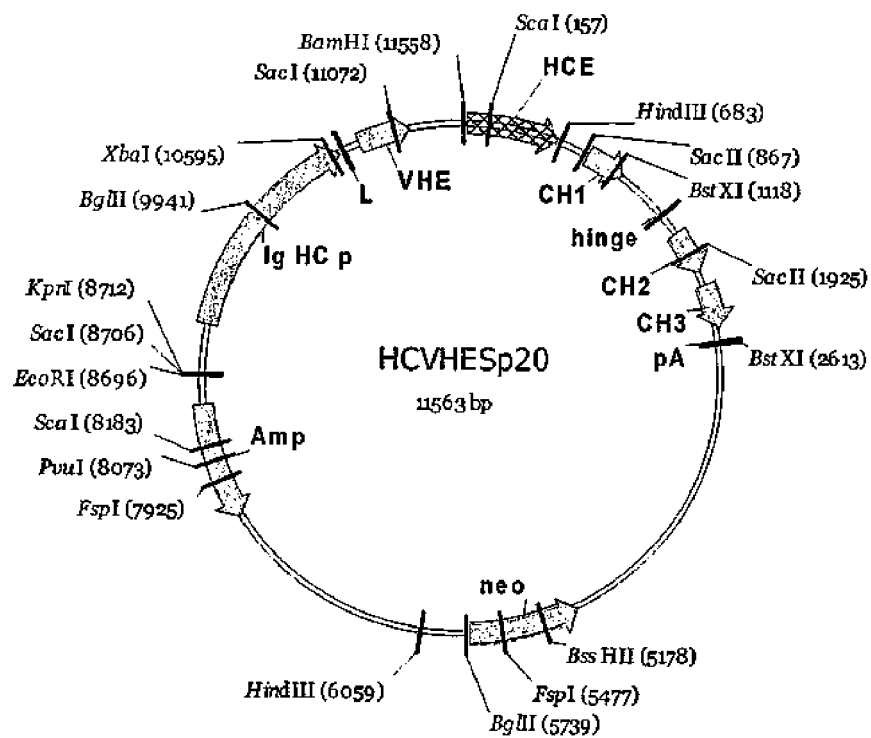


Figura 11

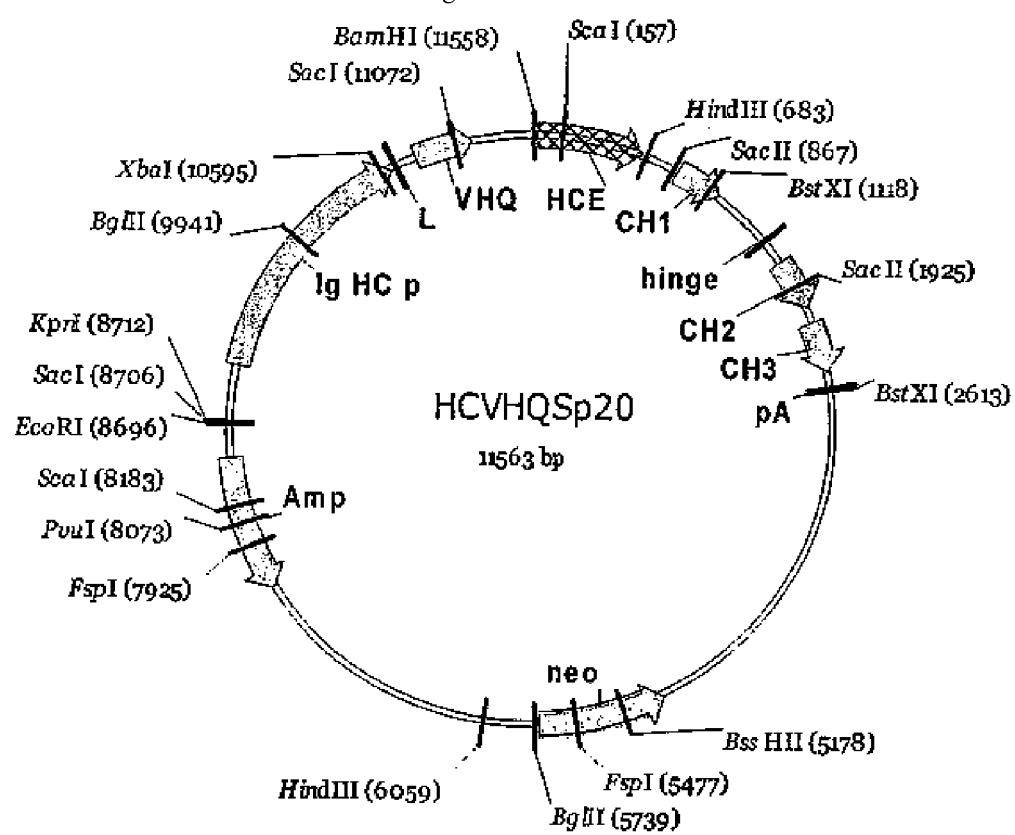


Figura 12

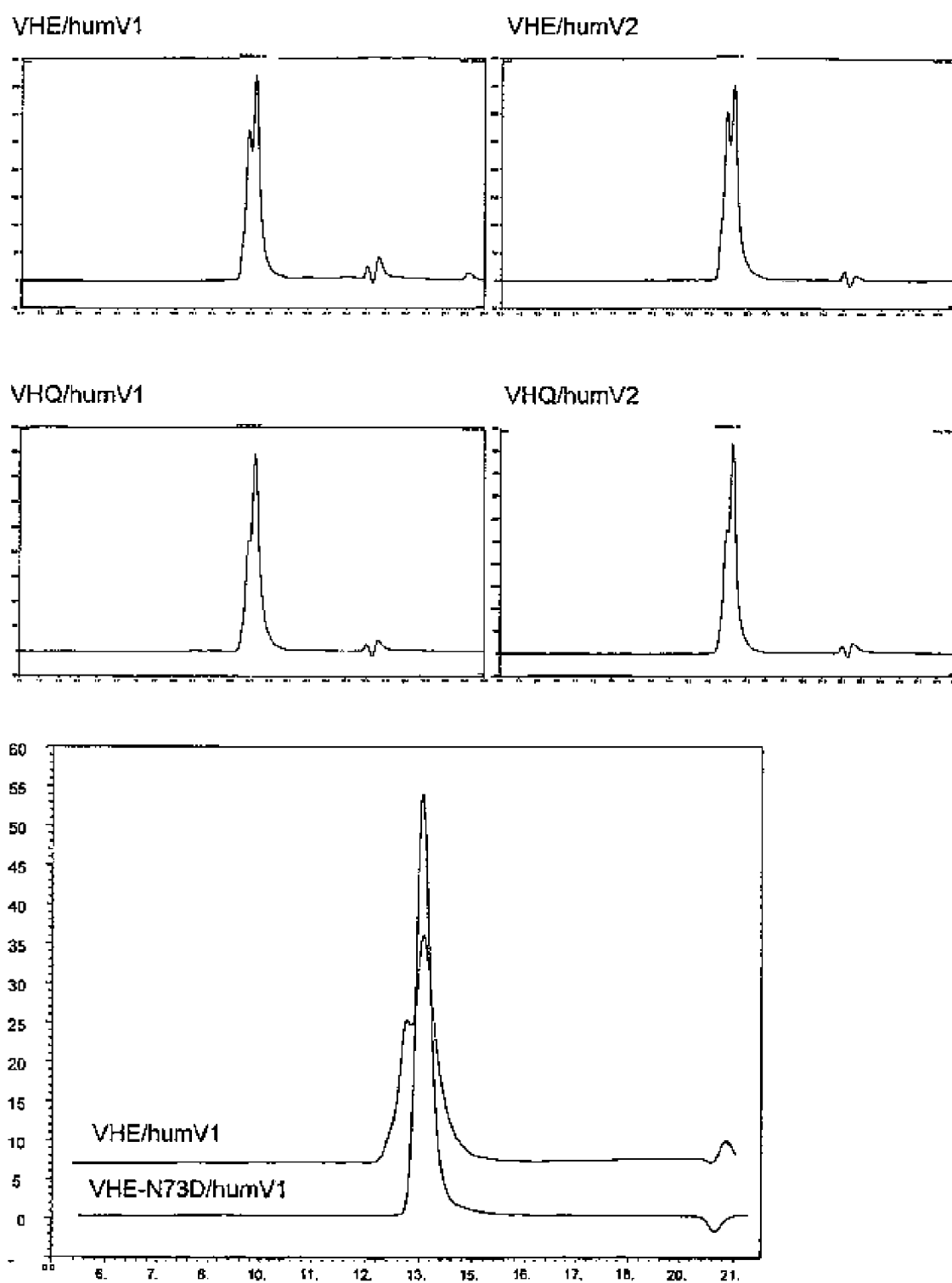


Figura 13

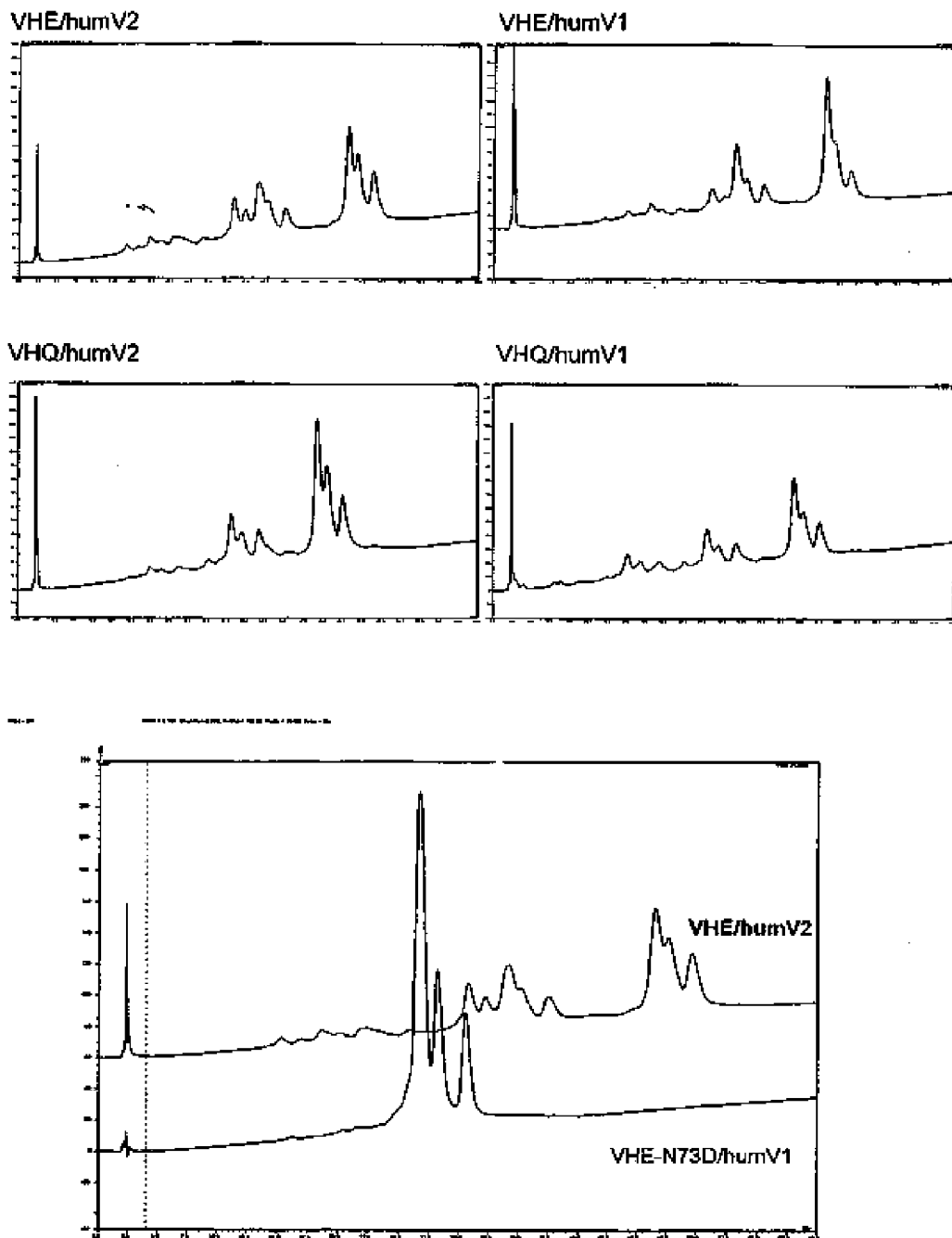


Figura 14

