

(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(73) Titular/es: **Novartis AG.**
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.06.2010(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(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.06.2010(74) Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

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 clínicamente seleccionadas permanecen como auxiliares de memoria y células C citotóxicas de memoria, que circulan en el cuerpo 20 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 25 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 35 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 fosfatases 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 50 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.

55 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 epítopo 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 60 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).

ES 2 341 341 T3

La WO 2002/072832 describe anticuerpos monoclonales (mAb), que son específicos para un epítopo 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

15 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 μ g/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.

20 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.

25 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.

30 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.

35 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.

40 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.

45 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.

50 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.

55 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.

60 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.

65 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:

- 10 - 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.
- 15 - 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 isloote humano prolongado al evitar la infiltración del injerto y al inhibir la reacción de rechazo mediada por leucocito *in vivo*.

30 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 immunoabsorbente 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.

40 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.

50 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.

60 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

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

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

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

20 En realizaciones preferidas adicionales la molécula de la invención además

- 25 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 $K_d < 15$ nM, más preferiblemente con un $K_d < 10$ nM, más preferiblemente con un $K_d < 5$ nM; y/o
- 3) inhibe la función de la célula T alorreactiva *in vitro*, preferiblemente con un IC_{50} aproximadamente menos de 100 nM, preferiblemente menos de 50 nM o 30 nM más preferiblemente con un IC_{50} de aproximadamente 10 o 5 nM, más preferiblemente con un IC_{50} de aproximadamente 0.5 nM o aún 0.1 nM; y/o
- 30 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
- 35 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
- 40 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
- 45 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.

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

55 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.

60 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 antigenógeno 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

ES 2 341 341 T3

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

5 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 10 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.

15 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),
- o
- un polipéptido de la SEQ ID NO: 32 y un polipéptido de la SEQ ID NO: 8 (tal como VHQN73D/humV1),

20 “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 25 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 30 las regiones de estructura (FR).

35 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 proteináceo o 40 no proteináceo 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 45 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 50 postraduccionales son el resultado de la acción de células huéspedes recombinantes sobre el polipéptido expresado. Los residuos de glutaminilo y asparaginilo son frecuentemente traduccionalemente desamidados a los correspondientes residuos de glutamilo y aspartilo. Alternativamente, estos residuos son desaminados bajo condiciones medianamente ácidas. Otras modificaciones postraduccionales incluyen la hidroxilación de la prolina y la lisina, la fosforilación de 55 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 específica y sus variantes de secuencia de aminoácidos, tal como las inmunoadesinas, las fusiones N-terminales a las secuencias de señal heterólogo.

60 “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.

65 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:

- 15 - 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,
- 20 - 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.

25 “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 bicanario, y ARN que es una mezcla de regiones mono o bicanarias.

30 El anticuerpo humanizado CD45RO/RB por ejemplo que es un anticuerpo químico 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.

35 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.

40 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 cassetes de CDR sintéticos bicanarios se preparan mediante síntesis de ADN de acuerdo con la secuencia CDR y CDR' como se especifica aquí. Estos cassetes 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.

55 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.

60 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.

65 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 5 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 10 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 15 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 15 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 20 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 25 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 30 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 35 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 40 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 45 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 isloote humano en un modelo de ratón hu-PBL-NOD/SCID.

Un anticuerpo humanizado CD45RO/RB de acuerdo con la presente invención puede tener así propiedades inmuno- 50 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, esclerodema, gastritis autoinmune, glomerulonefritis, rechazo por trasplante, 55 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 isloote pancreático, y/o también soriasis, dermatitis tal como dermatitis 60 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 65 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.

ES 2 341 341 T3

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)etyl-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.

ES 2 341 341 T3

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.

5 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 10 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 15 están excluidas del alcance de la invención.

15 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; 20 clorobutanol; parabenos y timerosal.

20 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 25 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 permite.

30 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 35 portador líquido, un portador sólido finamente dividido, o ambos y luego si es necesario, conformar el producto.

35 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, elíxir o una emulsión.

40 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 45 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 50 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.

55 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 60 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.

65 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

5 tipo 1 y tipo 2, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn (CD), colitis ulcerativa (UC), lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjögren, escleroderma, gastritis autoinmune, y glomerunonefritis; 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.

10

Ejemplos

15 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.

20 El “candidato mAb” o “anticuerpo químico” 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.

25 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).

30

Se utilizan las siguientes abreviaturas:

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

ES 2 341 341 T3

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

35 Ejemplo 1

40 *Respuesta de linfocito mezclado Primaria (MLR)*

45 *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 (Dynal, 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.

50 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, estreptomicina y L-glutamina.

55 *Reactivos*

60 El anti-CD45R0/RB mAb químérico “candidato mAb” y un anticuerpo químérico 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 *65 Respuesta de Linfocito mezclado Primario (MLR)*

Alícuotas de 1×10^5 PBMC o 5×10^4 de las células CD3⁺ o CD4⁺ se mezclan con 1×10^5 PBMC irradiado o 5×10^4 PBMC irradiado agotado de las Células T (50 Gy) en cada pozo de placas de cultivos de 96-pozos (Costar, Cambridge,

ES 2 341 341 T3

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.

10 El MLR Primario se efectúa en la presencia del “candidato mAb” o el IgG₁ químérico 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:

15 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)

35 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.

40 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.

45 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 químérico 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).

50

Ejemplo 2

MLR Secundario

55

Con el fin de evaluar si el “candidato mAb” induce una 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.

65

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 químérico 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:

5

TABLA 2

10	Donante de células T CD4 ⁺ de respuesta #	% de Inhibición de MLR 2 ^{ry}
15	#211	49.90*
	#220	59.33*
20	#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”, las 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 las 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 tratadas 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.

30 La inhibición porcentual se calcula de acuerdo la siguiente fórmula:

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

35

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

40 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

45

Estudios de supervivencia in vivo en ratones SCID

Inseto del hu-PBL en ratones SCID

50 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.

55

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 isótipos químicos 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 μ l 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

65 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

ES 2 341 341 T3

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 5 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

10 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.

15 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.

20 Ejemplo 4

Expresión de anticuerpos de la invención

25 *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, 30 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 35 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).

40 *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

45 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 BgIII. 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 50 *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 eletrocoporación (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 55 en las Figuras.

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

60 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 (Proteen 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 65 VHQ.

ES 2 341 341 T3

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 μ g cada una) son diluidos en un volumen total de 900 μ l de medio fresco sin suero ni antibiótico. Luego se mezcla 180 μ 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 CO₂. 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 μ 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 100-120 μ 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 μ g de ADN superremboinado 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 μ 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, estreptomicina 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 μ l de cada pozo con aprox. 10⁵ 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/Fcγ anti-humano de cabra de anticuerpo de recubrimiento (Cat. N° 109-005-098, Jackson Labs) y anticuerpo acoplado a peroxidasa contra cadena liviana kappa 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

5 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.

10

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).

15

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:

20

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'-AAAAAAAGCTTGGTCCCTGGCC 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.

25

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

30

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 HuCD45HClo (5'-AAATCCTTCTAGAACTCACCTGAGGAGAC-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 MDWTWRFVCLLAVVAPGAHS (SEQ ID NO: 47), se ha remplazado durante la subclonación con MAWVWTLPLMAAAQSVA (SEQ ID NO: 48).

35

Los intermedios HCcassHVESP20 o HCcassHVQSP20 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.

40

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

45

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 LCVL1 Sp20 (SEQ NO: 36) se utilizan para la expresión en las células Sp2/0 del anticuerpo humanizado VHE-N73D/humV1.

50

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.

20 Ejemplo 5

Determinación de la expresión IgG humana recombinante mediante ELISA

25 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. Nº 4-39454, Nunc Immunoplate Maxisorp) se recubren 30 durante toda la noche a 4°C con 100 μl de IgG anti humano de cabra (molécula completa, Cat. Nº 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. Nº 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 40 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. Nº 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).

45 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:

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

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

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

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

Analisis de cromatografía de exclusión de tamaño (SEC)

60 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.

ES 2 341 341 T3

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 químérico 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 chromatograma (>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 ninguna forma 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 la 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).

Ánalisis 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 chromatograma del Fracción 1 (rastros de aquellos picos también son detectables en los chromatogramas 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

ES 2 341 341 T3

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, 20 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.

Caracterización analítica de las fracciones CEX

25 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 40 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

45 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 muestran que a) el sitio de glucosilación conservado en la parte Fc de la cadena pesada está ocupado por formas de oligosacárido bi-antenarias con ninguna (G0), una (G1) o dos unidades de galactosa terminal (G2); b) que 50 encontrarse, el sitio de glucosilación irregular (N73) lleva oligosacáridos complejos que contienen ácido N-glicolil neuramínico.

55 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 heterogeneidad 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.

15 *Cromatografía de Intercambio de Cátion (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).

20 *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).

35 *Ejemplo 6*

Análisis de competición FACS (afinidad de unión)

40 La estirpe de células T humanas 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 químico marcado FITC como una referencia y se comparan con la inhibición del anticuerpo de ratón purificado y el anticuerpo químico. Los cultivos de células PEER se centrifugan durante 10 segundos a 3000 rpm y el medio se remueve. Las células 45 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 químico (control positivo) así como también sobrenadantes concentrados que contienen las varias combinaciones 50 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 químico 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 55 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 químico 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 químico 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 epítopo y que la especificidad del epítopo parece ser retenida después del proceso de humanización.

60 El sobrenadante no diluido de los transfectantes SP2/0 anteriormente mencionados o el anticuerpo químico (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 químico 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 5 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-N 73D/humV1

10 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 CD45RO/RB, modificada la reactividad con el epítopo 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.

15 Las célula 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 20 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 μl de amortiguador FACS que contiene 20 $\mu\text{g/ml}$ de anti-CD45R0/RB mAb, VHE-N73D/humV1 o el 25 control IgG1 Ab quimérico. Luego, las células PEER se lavan dos veces con 150 μl de amortiguador FACS mediante centrifugación. Las células se incuban posteriormente durante 30 minutos a 4°C en 50 μl de amortiguador FACS que contiene 20 $\mu\text{g/ml}$ del mAb quimérico conjugado con FITC o del control Ab 3G5 conjugado con FITC. Finalmente, las células se lavan y se resuspenden en 200 μl de amortiguador FACS que contiene 7-amino Actinomicina D (7-AAD) a 1 $\mu\text{g/ml}$, que sigue la identificación de las células viables durante análisis. La preparación de la célula se analiza sobre 30 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 35 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 epítopo de la molécula de unión anti-CD45R0/RB humanizada.

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

40 Para determinar la afinidad del anticuerpo VHE-N73D/humV1 por su epítopo, 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.

45 En resumen, la intensidad de teñido del PEER o las células HSC-F con un anticuerpo marcado con FITC en la presencia de varias concentraciones del anticuerpo competidor no marcado se 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 50 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 teñido de 55 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 60 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 CD45RO/RB objetivo.

ES 2 341 341 T3

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 policlonalmente 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 policlonalmente 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 teñido de ADN tomado por las células apoptóticas y necrótica 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 teñido 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 receptoia 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 celulares 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 DILLTQSPAIALSVSPGERVSFSCRASQNIGTSIQWYQQRTNGSPRLLIRSSSESISGIPSRFSG
SGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQSNTWPFTFGSGTKLEIK

15 SEQ ID NO: 2

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

20 EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTNYIHWVKQEPGQGLEWIGYFNPYNHGTKY
NEKFKGRATLTADKSSNTAYMDLSSLTSEDSAIYYCARSGPYAWFDTWGQQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 3

25 Secuencia de aminoácidos de la cadena liviana quimérica

30 DILLTQSPAIALSVSPGERVSFSCRASQNIGTSIQWYQQRTNGSPRLLIRSSSESISGIPSRFSG
SGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQSNTWPFTFGSGTKLEIKRTVAAPSVIFPPSDEQLKS
GTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

35 SEQ ID NO: 4

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada quimérica

40 EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTNYIHWVKQEPGQGLEWIGYFNPYNHGTKY
NEKFKGRATLTADKSSNTAYMDLSSLTSEDSAIYYCARSGPYAWFDTWGQQGTTVSSAS
TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVTVPSSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPEKTISAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNOVS
50 LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

55 SEQ ID NO: 5

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

60 GACATTCTGCTGACCCAGTCTCCAGCCATCGTGTCTGTGAGTCCAGGAGAAAGAGTCA
GTTTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAACATTGGCACAAGCATAACGTGGTATCAACAAAGA
ACAAATGGTTCTCCAAGGCTCTCATAAGGTCTTCTGAGTCTATCTCTGGGATCCCT
TCCAGGTTAGGGCAGTGGATCAGGGACAGTTTACTCTTAGCATCAACAGTGTGGA
65 GTCTGAAGAATTTGCAGATTACTGTCAACAAAGTAATACCTGGCCATTACGTTCGG
CTCGGGGACCAAGCTTGAAATCAA

ES 2 341 341 T3

SEQ ID NO: 6

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

5 GAGGTGCAGCTGCAGCAGTCAGGACCTGAACCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAG
ATGTCCTGCAAGGCCTCTGGATACACATTCACTAATTATATTATCCACTGGGTGAAGCA
GGAGCCTGGTCAGGGCCTTGAATGGATTGGATATTAACTCCCTACAAATCATGGTACTA
10 AGTACAATGAGAAGTTCAAAGGCAGGGCCACACTAACTGCAGACAAATCCCAACACA
GCCTACATGGACCTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCATCTACTACTGTGCAA
GATCAGGACCCATGCCTGGTTGACACCTGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTC
CTCA

15 SEQ ID NO: 7

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

20 DILLTQSPAT LSLSPGERAT FSCRASONIG TSIQWYQQKT NGAPRLLIRS SSESISIGIPS
RFSGSGSGTD FTLTISSE LEP EDFAVYYCQQ SNTWPFTFGQ GTKLEIK

25 SEQ ID NO: 8

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

30 DILLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQNIG TSIQWYQQKP GQAPRLLIRS SSESISIGIPS
RFSGSGSGTD FTLTISSE LEP EDFAVYYCQQ SNTWPFTFGQ GTKLEIK

SEQ ID NO: 9

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

EVQLVESGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYIIHWVKQE PGQGLEWIGY
40 FNPYNHGT KY NEKFKGRTL TANKSISTAY MELSSLRSED TAVYYCARSG
PYAWFDTWGQ GTTVTVSS

SEQ ID NO: 10

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

QVQLVESGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYIIHWVKQE PGQGLEWIGY
50 FNPYNHGT KY NEKFKGRTL TANKSISTAY MELSSLRSED TAVYYCARSG
PYAWFDTWGQ GTTVTVSS

SEQ ID NO: 11

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

60 GAGGTGCAGCTGGTGAGTCAGGAGCCGAAGTAAAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAG
GTGTCCTGCAAGGCCTCTGGATACACATTCACTAATTATATTATCCACTGGGTGAAGCA
GGAGCCTGGTCAGGGCCTTGAATGGATTGGATATTAACTCCCTACAAATCATGGTACTA
AGTACAATGAGAAGTTCAAAGGCAGGGCCACACTAACTGCACAAACAAATCCATCAGCACA
GCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGCCTGAGGACACTGCGGTCTACTACTGTGCAA
65 GATCAGGACCCATGCCTGGTTGACACCTGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTC
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 AGTACAATGAGAAGTTCAAAGGCAGGCCACACTAACTGCAAACAAATCCATCAGCACA
GCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGCGCTCTGAGGACACTGCGGTCTACTACTGTGCAA
GATCAGGACCCATGCCTGGTTGACACCTGGGCAAGGGACCACGGTCACCGTCTC
15 CTCA

SEQ ID NO: 13

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

25 GACATTCTGCTGACCCAGTCTCCAGCCACCCCTGTCTTGAGTCCAGGAGAAAGAGCCA
CTTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAACATTGGCACAAGCATAAGTGGTATCAACAAAAAA
ACAAATGGTGCCTCCAAGGCTTCTCATAGGTCTTCTGAGTCTATCTCTGGGATCCC
30 TTCCAGGTTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACTCTTACCATCAGCAGTCTGG
AGCCTGAAGATTTGCAGTGTATTACTGTCAACAAAGTAATACCTGGCCATTACGTT
GCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA

35 SEQ ID NO: 14

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

40 GACATTCTGCTGACCCAGTCTCCAGCCACCCCTGTCTTGAGTCCAGGAGAAAGAGCCA
CTCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAACATTGGCACAAGCATAAGTGGTATCAACAAAAAA
CCAGGTCAAGGCTCCAAGGCTTCTCATAGGTCTTCTGAGTCTATCTCTGGGATCCC
45 TTCCAGGTTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACTCTTACCATCAGCAGTCTGG
AGCCTGAAGATTTGCAGTGTATTACTGTCAACAAAGTAATACCTGGCCATTACGTT
50 GCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA

55

60

65

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

1 AGCTTTTGC AAAAGCCTAG GCCTCCAAA AAGCCTCCTC ACTACTCTG
51 GAATAGCTCA GAGGCCGAGG CGGCCTCGGC CTCTGCATAA ATAAAAAAA
10 101 TTAGTCAGCC ATGGGGCGGA CAATGGGCGG AACTGGGCGG AGTTAGGGGC
151 GGGATGGGCG GAGTTAGGGG CGGGACTATG GTTGCTGACT AATTGAGATG
201 CATGCTTGC ATACTCTGC CTGCTGGGA GCCTGGTGC TGACTAATTG
251 AGATGCATGC TTTGCATACT TCTGCCTGCT GGGGAGCCTG GGGACTTTCC
301 ACACCCCTAAC TGACACACAT TCCACAGCTG CCTCGCGCGT TTGGTGTATG
351 ACGGTGAAA CCTCTGACAC ATGCAGCTCC CGGAGACGGT CACAGCTTGT
401 CTGTAAGCGG ATGCCGGGAG CAGACAAAGCC CGTCAGGGCG CGTCAGCGGG
451 TGTTGGCGGG TGTCGGGGCG CAGCCATGAC CCAGTCACGT AGCGATAGCG
501 GAGTGTATAC TGGCTTAACG ATGCGGCATC AGAGCAGATT GTACTGAGAG
551 TGGCACCATAAT GCGGTGTGAA ATACCGCACA GATGCGTAAG GAGAAAATAC
601 CGCATCAGGC GCTCTCCGC TTCCCTCGCTC ACTGACTCGC TGCGCTCGGT
651 CGTTCGGCTG CGGCGAGCGG TATCAGCTCA CTCAAAGGGG GAAATACGGT
701 TATCCACAGA ATCAGGGGAT AACGCAGGAA AGAACATGTG AGCAAAAGGC
751 CAGCAAAAGG CCAGGAACCG TAAAAAGGCC GCGTTGCTGG CGTTTTCCA
801 TAGGCTCCGC CCCCCCTGACG AGCATCACAA AAATCGACGC TCAAGTCAGA
851 GGTGGCGAAA CCGGACAGGA CTATAAAGAT ACCAGGCCTT TCCCCCTGGA
901 AGCTCCCTCG TGCGCTCTCC TGTTCCGACC CTGCCGCTTA CCGGATACCT
951 GTCCGCCTT CTCCCTCGG GAAGCGTGGC GCTTCTCAT AGCTCACGCT
1001 GTAGGTATCT CAGTTGGTG TAGGTCGTTG GCTCCAAGCT GGGCTGTGTG
1051 CACGAACCCC CCGTTCAAGCC CGACCGCTGC GCCTTATCCG GTAACTATCG
1101 TCTTGAGTCC AACCCGGTAA GACACGACTT ATGCCACTG GCAGCAGCCA
1151 CTGGTAACAG GATTAGCAGA CGGAGGTATG TAGGCCGTGC TACAGAGTT
1201 TTGAAGTGGT GGCGCTAACTA CGGCTACACT AGAAGGACAG TATTTGGTAT
1251 CTGCGCTCTG CTGAAGCCAG TTACCTTCGG AAAAAGAGTT GGTAGCTCTT
1301 GATCCGGCAA ACAAAACCAACC GCTGGTAGCG GTGGTTTTT TGTTTGCAAG

55

60

65

ES 2 341 341 T3

1351	CAGCAGATT A CGCGCAGAAA AAAAGGATCT CAAGAAGATC CTTTGATCTT
1401	TTCTACGGGG TCTGACGCTC AGTGGAACGA AAACTCACGT TAAGGGATT
5	1451 TGGTCATGAG ATTATCAAAA AGGATCTTC A CCTAGATCCT TTTAAATTAA
1501	AAATGAAGTT TTAAATCAAT C TAAAGTATA TATGAGTAAA CTTGGTCTGA
1551	CAGTTACCAA TGCTTAATCA GTGAGGGACCC TATCTCAGCG ATCTGTCTAT
10	1601 TTCGTTTCATC C ATAGTTGCC TGACTCCCCG TCGTGTAGAT AACTACGATA
1651	CGGGAGGGCT TACCATCTGG CCCCAGTGCT GCAATGATAC CGCGAGACCC
1701	ACGCTCACCG GCTCCAGATT TATCAGCAAT AAACCAGCCA GCGGAAAGGG
1751	CCGAGCGCAG AAGTGGTCCT GCAACTTTAT CCGCCTCCAT CCAGTCTATT
1801	AATTGTTGCC GGGAAAGCTAG AGTAAGTAGT TCGCCAGTIA ATAGTTGCC
1851	CAACGTTGTT GCCATTGCTG CAGGCATCGT GGTGTCACGC TCGTCGTTG
20	1901 GTATGGCTTC ATTCA GCTCC GGTCCCAC GATCAAGGCG AGTTACATGA
1951	TCCCCCATGT TGTGCAAAAA AGCGGTTAGC TCCTTCGGTC CTCCGATCGT
2001	TGTCAGAACT AAGTTGGCG CAGTGTATC ACTCATGGTT ATGGCAGCAC
25	2051 TGCATAATTC TCTTA CTGTC ATGCCATCCG TAAGATGCTT TTCTGTGACT
2101	GGTGAGTACT CAACCAAGTC ATTCTGAGAA TAGTGTATGC GCGGACCGAG
2151	TTGCTCTTGC CCGCGTCAA CACGGGATAA TACCGCGCCA CATA GGAGAA
30	2201 CTTTAAAAGT GCTCATCATT GGAAAACGTT CTTGGGGCG AAAACTCTCA
2251	AGGATCTTAC CGCTGTTGAG ATCCAGTTCG ATGTAACCCA CTCGTGCACC
2301	CAACTGATCT TCAGGATCTT TTACTTCAC CAGCGTTCT GGGTGAGCAA
35	2351 AAACAGGAAG GCAAAATGCC GCAAAAAGG GAATAAGGCG GACACGGAAA
2401	TGTTGAATAC TCATACTCTT CCTTTTCAA TAATATTGAA GCATTATCA
2451	GGGTTATTGT CTCATGAGCG GATACATATT TGAATGTATT TAGAAAAATA
40	2501 AACAAATAGG GGTTCCGCG ACATTTCCCC GAAAAGTGCC ACCTGACGTC
2551	TAAGAAACCA TTATTATCAT GACATTAACC TATAAAAATA GGCGTATCAC
45	2601 GAGGCCCTT CGTCTTCAAG AATTCA GCTT GGCTGCAGTG AATAATAAA
2651	TGTGTGTTG TCGAAATAC GCGTTTGAG ATTCTGTGCG CCGACTAAAT
2701	TCATGTCGCG CGATAGTGCT GTTTATCGCC GATAGAGATG GCGATATTGG
50	2751 AAAAATCGAT ATTTGAAAAT ATGGCATATT GAAAATGTCG CCGATGTGAG
2801	TTTCTGTGTA ACTGATATCG CCATTTTCC AAAAGT GATT TTTGGGCATA
2851	CGCGATATCT GGCGATAGCG CTTATATCGT TTACGGGGGA TCGCGATAGA
55	2901 CGACTTTGGT GACTTGGCG ATTCTGTGTC TCGCAAATAT CGCAGTTTCG
2951	ATATAGGTGA CAGACGATAT GAGGCTATAT CGCCGATAGA GCGGACATCA
3001	AGCTGGCACA TGGCAATGC ATATCGATCT ATACATTGAA TCAATATTGG
60	3051 CCATTAGCCA TATTATTCAT TGTTTATATA GCATAAAATCA ATATGGCTA
3101	TTGGCCATTG CATA CGTGT ATCCATATCA TAATATGTAC ATTTATATTG
3151	GCTCATGTCC AACATTACCG CCATGTTGAC ATTGATTATT GACTAGTTAT

ES 2 341 341 T3

3201 TAATAGTAAT CAATTACGGG GTCATTAGTT CATAGCCCAT ATATGGAGTT
 3251 CCGCGTTACA TAACTTACGG TAAATGCCCG GCCTGGCTGA CCGCCCAACG
 3301 ACCCCCGCC ATTGACGTCA ATAATGACGT ATGTTCCCAT AGTAACGCCA
 3351 ATAGGGACTT TCCATTGACG TCAATGGGTG GAGTATTAC GGTAAACTGC
 3401 CCACATTGGCA GTACATCAAG TGTATCATAT GCCAAGTACG CCCCCATTG
 3451 ACGTCAATGA CGGTAAATGG CCCGCCTGGC ATTATGCCCA GTACATGACC
 3501 TTATGGGACT TTCTACTTG GCAGTACATC TACGTATTAG TCATCGCTAT
 3551 TACCATGGTG ATGCGGTTT GGCAGTACAT CAATGGCGT GGATAGCGGT
 3601 TTGACTCAGG GGGATTTCCA AGTCTCCACC CCATTGACGT CAATGGGAGT
 3651 TTGTTTGCG ACCAAAATCA ACGGGACTTT CAAAAATGTC GAAACAACTC
 3701 CGCCCCATTG ACGCAAATGG GCGGTAGGCG TGTACGGTGG GAGGTCTATA
 3751 TAAGCAGAGC TCGTTAGTG AACCGTCAGA TCGCCTGGAG ACGCCATCCA
 3801 CGCTGTTTG ACCTCCATAG AAGACACCGG GACCGATCCA GCCTCCGCAA
 3851 GCTTGCAGCC ACCATGGACT GGACCTGGAG GGTGTTCTGC CTGCTGGCCG
 3901 TGGCCCCCGG CGCCCACAGC CAGGTGCAGC TGGTGGAGTC AGGAGCCGAA
 3951 GTGAAAAAAGC CTGGGGCTTC AGTGAAGGTG TCCTGCAAGG CCTCTGGATA
 4001 CACATTCACT AATTATATTA TCCACTGGGT GAAGCAGGAG CCTGGTCAGG
 4051 GCCTTGAATG GATTGGATAT TTTAATCCCT ACAATCATGG TACTAAGTAC
 4101 AATGAGAAGT TCAAAGGCAG GGCCACACTA ACTGCAAACA AATCCATCAG
 4151 CACAGCCTAC ATGGAGCTCA GCAGCCTGCG CTCTGAGGAC ACTGCGGTCT
 4201 ACTACTGTGC AAGATCAGGA CCCTATGCCT GGTTTGACAC CTGGGGCCAA
 4251 GGGACCACGG TCACCGTCTC CTCAGGTGAG TTCTAGAAGG ATCCCAAGCT
 4301 AGCTTTCTGG CCCAGGCCAG GCCTGACCTT GGCTTTGGGG CAGGGAGGGG
 4351 GCTAAGGTGA GGCAGGTGGC CCCAGCCAGG TGCACACCCA ATGCCCATGA
 4401 GCCCAGACAC TGGACGCTGA ACCTCGCGGAA CAGTTAAGAA CCCAGGGGCC
 4451 TCTGCGCCCT GGGCCCAGCT CTGTCCCACA CCGCGGTCAAC ATGGCACCCAC
 4501 CTCTCTTGCA GCCTCCACCA AGGGCCCATC GGTCTTCCCC CTGGCACCCCT
 4551 CCTCCAAGAG CACCTCTGGG GGCACAGCGG CCCTGGGCTG CCTGGTCAAG
 4601 GACTACTTCC CCGAACCGGT GACGGTGTG TGGAACTCAG GCGCCCTGAC
 4651 CAGCGGCGTG CACACCTTCC CGGCTGTCTC ACAGTCCTCA GGACTCTACT
 4701 CCCTCAGCAG CGTGGTGACC GTGCCCTCCA GCAGCTTGGG CACCCAGACC
 4751 TACATCTGCA ACGTGAATCA CAAGCCCAGC AACACCAAGG TGGACAAGAA
 4801 AGTTGGTGAG AGGCCAGCAC AGGGAGGGAG GGTGTCTGCT GGAAGCCAGG
 4851 CTCAGCGCTC CTGCCCTGGAC GCATCCCCGC TATGCAGCCC CAGTCCAGGG
 4901 CAGCAAGGCA GGCCCCGTCT GCCTCTTCAC CGGGAGGCCT CTGCCCGCCC
 4951 CACTCATGCT CAGGGAGAGG GTCTTCTGGC TTTTCCCCA GGCTCTGGGC
 5001 AGGCACAGGC TAGGTCCCCC TAACCCAGGC CCTGCACACA AAGGGGCCAGG

ES 2 341 341 T3

5051 TGCTGGGCTC AGACCTGCCA AGAGCCATAT CCGGGAGGAC CCTGCCCTG
 5101 ACCTAAGCCC ACCCCAAAGG CCAAACCTCTC CACTCCCTCA GCTCGGACAC
 5151 CTTCTCTCCT CCCAGATTCC AGTAACCTCCC AATCTTCTCT CTGCAGAGCC
 5201 CAAATCTTGT GACAAAACTC ACACATGCCA ACCGTGCCA GGTAAGCCAG
 5251 CCCAGGCCCTC GCCCTCCAGC TCAAGGGGG ACAGGTGCCA TAGAGTAGCC
 5301 TGCATCCAGG GACAGGGCCC AGCCGGGTGC TGACACGTCC ACCTCCATCT
 5351 CTTCCCTCAGC ACCTGAACTC CTGGGGGGAC CGTCAGTCTT CCTCTTCCCC
 5401 CCAAAACCCA AGGACACCCCT CATGATCTCC CGGACCCCTG AGGTACATG
 5451 CGTGGTGGTG GACGTGAGCC ACCAAGACCC TGAGGTCAAG TTCAACTGGT
 5501 ACGTGGACGG CGTGGAGGTG CATAATGCCA AGACAAAGCC GCGGGAGGAG
 5551 CAGTACAACA GCACGTACCG TGTGGTCAGC GTCCTCACCG TCCTGCACCA
 5601 GGACTGGCTG AATGGCAAGG AGTACAAGTG CAAGGTCTCC AACAAAGCCC
 5651 TCCCAGCCCC CATCGAGAAA ACCATCTCCA AAGCCAAAGG TGGGACCGT
 5701 GGGGTGCGAG GGCCACATGG ACAGAGGCCG GCTGGGCCA CCCTCTGCC
 5751 TGAGAGTGAC CGCTGTACCA ACCTCTGTCC CTACAGGCCA GCCCCGAGAA
 5801 CCACAGGTGT ACACCCCTGCC CCCATCCGG GATGAGCTGA CCAAGAACCA
 5851 GGTCAAGCCTG ACCTGCCCTGG TCAAAGGCTT CTATCCCAGC GACATGCCG
 5901 TGGAGTGGGA GAGCAATGGG CAGCCGGAGA ACAACTACAA GACCACGCC
 5951 CCCGTCTGG ACTCOGACGG CTCCCTCTTC CTCTACAGCA AGTCACCGT
 6001 GGACAAAGAGC AGGTGGCAGC AGGGGAACGT CTTCTCATGC TCCGTGATGC
 6051 ATGAGGCTCT GCACAAACAC TACACGCAGA AGAGCCTCTC CCTGTCTCCG
 6101 GGTAAATGAG TGGGACGGCC GGCAGGGCCC CGCTCCCCGG GCTCTGGGG
 6151 TCGCACGAGG ATGCCTGGCA CGTACCCCCCT GTACATACTT CCCGGCGCC
 6201 CAGCATGGAA ATAAAGCACC CAGCGCTGCC CTGGGCCCCCT GCGAGACTGT
 6251 GATGGTTCTT TCCACGGGTC AGGCCGAGTC TGAGGCCTGA GTGGCATGAG
 6301 ATCTGATATC ATCGATGAAT TCGAGCTCGG TACCCGGGGAA TCGATCCAGA
 6351 CATGATAAGA TACATTGATG AGTTGGACA AACCCACAAT AGAATGCACT
 6401 GAAAAAAATG CTTTATTGT GAAATTGTG ATGCTATTGC TTTATTGTA
 6451 ACCATTATAA GCTGCAATAA ACAAGTTAAC AACACAATT GCATTCAATT
 6501 TATGTTTCAG GTTCAGGGGG AGGTGTGGGA GGTTTTTAA AGCAAGTAAA
 6551 ACCTCTACAA ATGTGGTATG GCTGATTATG ATCTCTAGTC AAGGCACATAT
 6601 ACATCAAATA TTCTTATTAA ACCCTTTAC AAATTAAGGAA GCTAAAGGTA
 6651 CACAATTGTT GAGCATAGTT ATTAATAGCA GACACTCTAT GCGTGTGTGG
 6701 AGTAAGAAAA AACAGTATGT TATGATTATA ACTGTTATGC CTACTTATAA
 6751 AGGTTACAGA ATATTTTCC ATAATTCTCT TGTATAGCAG TGCAGCTTT
 6801 TCCCTTGTCG TGTAAATAGC AAAGCAAGCA AGAGTTCTAT TACTAAACAC
 6851 AGCATGACTC AAAAAACTTA GCAATTCTGA AGGAAAGTCC TTGGGGTCTT

ES 2 341 341 T3

6901 CTACCTTTCT CTTCTTTTT GGAGGAGTAG AATGTTGAGA GTCAGCAGTA
 6951 GCCTCATCAT CACTAGATGG CATTCTTCT GAGCAAAACA GGTTTCCCTC
 5 7001 ATTAAGGCA TTCCACCACT GCTCCCATTG ATCAGTTCCA TAGGTTGGAA
 7051 TCTAAAATAC ACAAAACAATT AGAATCAGTA GTTTAACACA TTATACACTT
 10 7101 AAAAATTTA TATTIACCTT AGAGCTTTAA ATCTCTGTAG GTAGTTGTC
 7151 CAATTATGTC ACACCACAGA AGTAAGGTTG CTTCACAAAG ATCCGGGACC
 7201 AAAGCGGCCA TCGTGCCTCC CCACTCCTGC AGTTGGGGGG CATGGATGCC
 15 7251 CGGATAGCCG CTGCTGGTTT CCTGGATGCC GACGGATTG CACTGCCGGT
 7301 AGAACTCCGC GAGGTCGTCC AGCCTCAGGC AGCAGCTGAA CCAACTCGCG
 7351 AGGGGATCGA GCCCCGGGTG GGCAGAAC TCCAGCATGA GATCCCCGCG
 20 7401 CTGGAGGATC ATCCAGCCGG CGTCCGGAA AACGATTCCG AAGCCCAACC
 7451 TTTCATAGAA GCGGGGGTG GAATCGAAAT CTCTGTGATGG CAGGTTGGGC
 7501 GTCGCTTGTT CGGTCAITTC GAACCCCAGA GTCCCGCTCA GAAGAACTCG
 25 7551 TCAAGAAGGC GATAGAAGGC GATGCGCTGC GAATCGGGAG CGGGGATACC
 7601 GTAAAGCACC AGGAAGCGGT CAGCCCATTG GCGGCCAAGC TCTTCAGCAA
 7651 TATCACGGGT AGCCAACGCT ATGTCCTGAT AGCCGTCCGC CACACCCAGC
 30 7701 CGGCCACAGT CGATGAATCC AGAAAAGCGG CCATTTCCA CCATGATATT
 7751 CGGCAAGCAG GCATGCCAT GGGTCACCGAC GAGATCCTCG CGTCGGGCA
 7801 TGCGCGCTT GAGCCTGGCG AACAGTTCGG CTGGCGCGAG CCCCTGATGC
 35 7851 TCTTCGTCCA GATCATCCTG ATCGACAAGA CCGGCTTCCA TCCGAGTACG
 7901 TGCTCGCTCG ATGCGATGTT TCGCTTGGTG GTCGAATGGG CAGGTAGCCG
 7951 GATCAAGCGT ATGCAAGCCGC CGCATTGCAT CAGCCATGAT GGATACTTTC
 40 8001 TCGGCAGGAG CAAGGTGAGA TGACAGGAGA TCCTGCCCG GCACTTCGCC
 8051 CAATAGCAGC CAGTCCTTC CCGCTTCAGT GACAACGTCG AGCACAGCTG
 8101 CGCAAGGAAC GCGCGTCGTG GCCAGCCACG ATAGCCGCGC TGCCCTCGCC
 45 8151 TGCAGTTCAT TCAGGGCACC GGACAGGTG TGCTTGACAA AAAGAACCGG
 8201 GCGCCCCCTGC GCTGACAGCC GGAACACGGC GGCATCAGAG CAGCCGATTG
 8251 TCTGTTGTGC CCAGTCATAG CCGAATAGCC TCTCCACCCA AGCGGGCGGA
 50 8301 GAAACCTGCGT GCAATCCATC TTGTTCAATC ATGCGAAACG ATCCTCATCC
 8351 TGTCTCTTGA TCAGATCTTG ATCCCTGCG CCATCAGATC CTGGCGGCA
 8401 AGAAAAGCCAT CCAGTTTACT TTGCAGGGCT TCCCAACCTT ACCAGAGGGGC
 55 8451 GCGCCAGCTG GCAATTCCGG TTGCGCTTGCT GTCCATAAAA CGGCCAGTC
 8501 TAGCTATCGC CATGTAAGCC CACTGCAAGC TACCTGCTTT CTCTTGCAGC
 8551 TTGCGTTTTC CCTTGTCCAG ATAGCCCACT AGCTGACATT CATCGGGGT
 60 8601 CAGCACCGTT TCTGCGGACT GGCTTTCTAC GTGTTCCGCT TCCTTGTAGCA
 8651 GCGCTTGCAGC CCTGAGTGCT TGCGGCAGCG TGAAGCT

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 AGCTTTTGCAAAAGCTAG CCCTCCAAAA AAGCCTCCCTC ACTACTTCTG
51 GAATAGCTCA GAGGCCGAGG CGGCCTCGGC CTCTGCATAA ATAAAAAAA
10 101 TTAGTCAGCC ATGGGGCGGA GAATGGGCAG AACTGGCGG AGTTAGGGC
151 GGGATGGCG GAGTTAGGGG CGGGACTATG GTTGCTGACT AATTGAGATG
201 CATGCTTGCA ATACTTCTGC CTGCTGGGGA GCCTGGTGC TGACTAATTG
251 AGATGCATGC TTTGCATACT TCTGCCTGCT GGGGAGCCTG GGGACTTTCC
301 ACACCCCTAAC TGACACACAT TCCACAGCTG CCTCGCGCGT TTCCGGTGTG
351 ACGGTGAAAA CCTCTGACAC ATGCAGCTCC CGGAGACGGT CACAGCTTGT
401 CTGTAAGCGG ATGCCGGGAG CAGACAAGCC CGTCAGGGCG CGTCAGCGGG
451 TGTTGGCGGG TGTCGGGGCG CAGCCATGAC CCAGTCACGT AGCGATAGCG
501 GAGTGTATAAC TGGCTTAAC ATGCCGGCATC AGAGCAGATT GTACTGAGAG
551 TGCACCATAT GCGGTGTGAA ATACCGCACA GATGCGTAAG GAGAAAATAC
601 CGCATCAGGC GCTCTTCCGC TTCCCTCGCTC ACTGACTCGC TGCGCTCGGT
651 CGTTGGCGTC CGGCCAGCGG TATCAGCTCA CTCAAAAGCG CTAATAACGGT
701 TATCCACAGA ATCAGGGGAT AACGCAGGAA AGAACATGTG AGCAAAAGGC
751 CAGCAAAAGG CCAGGAACCG TAAAAAGGCC GCGTTGCTGG CGTTTTTCCA
801 TAGGCTCCGC CCCCCCTGACG AGCATCACAA AAATCGACGC TCAAGTCAGA
851 GGTGGCGAAA CCCGACAGGA CTATAAAAGAT ACCAGGCCTT TCCCCCTGGA
901 AGCTCCCTCG TGCGCTCTCC TGTTCCGACC CTGCCGCTTA CGGGATAACCT
951 GTCCGCCTTT CTCCCTTCCGG GAACCGTGGC GCTTTCTCAT AGCTCACGCT
1001 GTAGGTATCT CAGTTGGTG TAGTCGTTG CTCAGCTGGTGGTGGTGC
1051 CACGAACCCC CCGTTCAAGCC CGACCGCTGC GCCTTATCCG GTAACATATCG
1101 TCTTGAGTCC AACCCGGTAA GACACGACTT ATCGCCACTG GCAGCAGCCA
1151 CTGGTAACAG GATTAGCAGA CGGAGGTATG TAGGCGTGC TACAGACTTC
1201 TTGAAGTGGT GGCTAAACTA CGGCTACACT AGAAGGACAG TATTITGGTAT
1251 CTGCGCTCTG CTGAAGCCAG TTACCTTCGG AAAAAGAGTT GGTAGCTCTT
1301 GATCCGGCAA ACAAAACCACC GCTGGTAGCG GTGGTTTTT TGTGCAAG
1351 CAGCAGATTA CGCGCAGAAA AAAAGGATCT CAAGAAGATC CTTTGATCTT
1401 TTCTACGGGG TCTGACGCTC AGTGGAAACGA AAACCTCACGT TAAGGGATTT
1451 TGGTCATGAG ATTATCAAAA AGGATCTTCA CCTAGATCCT TTTAAATTAA
1501 AAATGAAGTT TTAAATCAAT CTAAGTATA TATGAGTAAA CTTGGTCTGA

ES 2 341 341 T3

1551 CAGTTACCAA TGCTTAATCA GTGAGGCACC TATCTCAGCG ATCTGTCTAT
 1601 TTCGTTCATC CATAAGTTGCC TGACTCCCCG TCGTGTAGAT AACTACGATA
 1651 CGGGAGGGCT TACCATCTGG CCCCCAGTGCT GCAATGATAAC CGCGAGACCC
 1701 ACGCTCACCG GCTCCAGATT TATCAGCAAT AAACCAGCCA GCCGGAAGGG
 1751 CCGAGGCCAG AAGTGGTCCT GCAACTTTAT CCGCCTCCAT CCAGCTTATT
 1801 AATTGTTGCC GGGAAAGCTAG AGTAAGTAGT TCGCCAGTTA ATAGTTGCG
 1851 CAAAGTTGTT GCCATTGCTG CAGGCATCGT GGTGTCACGC TOGTOGTTTG
 1901 GTATGGCTTC ATTCAAGCTCC GGTTCCCAAC GATCAAGGGCG AGTTACATGA
 1951 TCCCCCATGT TGTGCAAAAA AGCGGTTAGC TCCTTCGGTC CTCCGATCGT
 2001 TGTCAAGT AAGTTGGCCG CAGTGTATC ACTCATGGTT ATGGCAGCAC
 2051 TGCATAATTG TCTTACTGTC ATGCCATCCG TAAGATGCTT TTCTGTGACT
 2101 GGTGAGTACT CAACCAAGTC ATTCTGAGAA TAGTGTATGC GGCGACCGAG
 2151 TTGCTCTTGC CCGGCGTCAA CACGGATAA TACCGCGCCA CATAGCAGAA
 2201 CTTAAAAAGT GCTCATCATT GGAAAACGTT CTTCGGGGCG AAAACTCTCA
 2251 AGGATCTTAC CGCTGTTGAG ATCCAGTTCG ATGTAACCCA CTCGTGCACC
 2301 CAACTGATCT TCAGCATCTT TTACTTCAC CAGCGTTTCT GGGTGAGCAA
 2351 AAACAGGAAG GCAAAATGCC GCAAAAAGG GAATAAGGGC GACACGGAAA
 2401 TGTTGAATAC TCATACTCTT CCTTTTCAA TATTATTGAA GCATTATCA
 2451 GGGTTATTGT CTCATGAGCG GATACATATT TGAATGTATT TAGAAAAATA
 2501 AACAAATAGG GGTTCCGCGC ACATTTCCCC GAAAAGTGCC ACCTGACGTC
 2551 TAAGAAACCA TTATTATCAT GACATTAACC TATAAAAATA GGCGTATCAC
 2601 GAGGCCCTTT CGTCTTCAAG AATTCAAGT TTACTGAGTG AATAATAAAA
 2651 TGTGTGTTG TCCGAAATAC GCGTTTGAG ATTTCTGTGCG CCGACTAAAT
 2701 TCATGTGCG CGATAGTGGT GTTATCGCC GATAGAGATG GCGATAATTGG
 2751 AAAAATCGAT ATTTGAAAAT ATGCCATATT GAAAATGTGCG CCGATGTGAG
 2801 TTTCTGTGTA ACTGATATCG CCATTTTCC AAAAGTGATT TTTGGGCATA
 2851 CGCGATATCT CGCGATAGCG CTTATATCGT TTACGGGGCA TGGCGATAGA
 2901 CGACTTTGGT GACTTGGCG ATTCTGTGTC TCGCAAATAT CGCAGTTCG
 2951 ATATAGGTGA CAGACCATAT GAGGCTATAT CGCCGATAGA GGCGACATCA
 3001 AGCTGGCACA TGGCCAATGC ATATCGATCT ATACATTGAA TCAATATTGG
 3051 CCATTAGCCA TATTATTCAT TGGTTATATA GCATAAAATCA ATATTGGCTA
 3101 TTGGCCATTG CATACTGTTGT ATCCATATCA TAATATGTAC ATTTATATTG
 3151 GCTCATGTCC AACATTACCG CCATGTTGAC ATTGATTATT GACTAGTTAT
 3201 TAATAGTAAT CAATTACGGG GTCATTAGTT CATAGCCCATTATGGAGTT
 3251 CCGCGTTACA TAACTTACGG TAAATGGCCC GCCTGGCTGA CCGCCCCAACG
 3301 ACCCCCGCCC ATTGACGTCA ATAATGACGT ATGTTCCCAT AGTAACGCCA
 3351 ATAGGGACTT TCCATTGACG TCAATGGGTG GAGTATTIAC GGTAAACTGC

ES 2 341 341 T3

3401 CCACTGGCA GTACATCAAG TGTATCATAT GCCAAGTACG CCCCCTATTG
 3451 ACGTCAATGA CGGTAAATGG CCCGCCTGGC ATTATGCCCA GTACATGACC
 5 3501 TTATGGGACT TTCCTACTTG GCAGTACATC TACGTATTAG TCATCGCTAT
 3551 TACCATGGTG ATGCGGTTTT GGCAGTACAT CAATGGCGT GGATAGCGGT
 10 3601 TTGACTCACG GGGATTTCCA AGTCTCCACC CCATTGACGT CAATGGGAGT
 3651 TTGTTTGGC ACCAAAATCA ACGGGACTTT CCAAAATGTC GTAAACAACTC
 3701 CGCCCCATTG ACGCAAATGG GCGGTAGGCG TGTACGGTGG GAGGTCTATA
 15 3751 TAAGCAGAGC TCGTTTAGTG AACCGTCAGA TCGCCTGGAG ACGCCATCCA
 3801 CGCTGTTTG ACCTCCATAG AAGACACCGG GACCGATCCA GCCTCCGCAA
 3851 GCTTGGCGCC ACCATGGACT GGACCTGGAG GGTGTTCTGC CTGCTGGCG
 20 3901 TGGCCCCCGG CGCCCACAGC GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC AGGAGCCGAA
 3951 GTGAAAAAAGC CTGGGGCTTC AGTGAAGGTG TCCGTCAAGG CCTCTGGATA
 4001 CACATTCACT AATTATATTA TCCACTGGGT GAAGCAGGAG CCTGGTCAGG
 4051 GCCTTGAATG GATTGGATAT TTTAATCCTT ACAATCATGG TACTAAGTAC
 25 4101 AATGAGAAGT TCAAAGGCAG GGCCACACTA ACTGCAAACA AATCCATCAG
 4151 CACAGCCTAC ATGGAGCTCA GCAGCCTGGG CTCTGAGGAC ACTGCGGTCT
 4201 ACTACTGTGC AAGATCAGGA CCCTATGCCCT GGTTGACAC CTGGGGCCAA
 30 4251 GGGACCACGG TCACCGTCTC CTCAGGTGAG TTCTAGAAGG ATCCCAAGCT
 4301 AGCTTCTGG GCCAGGCCAG GCCTGACCTT GGCTTGGGG CAGGGAGGGG
 4351 GCTAAGGTGA GGCAGGTGGC GCCAGCCAGG TGCAACACCA ATGCCCATGA
 4401 GCCCAGACAC TGGACGCTGA ACCTCGGGGA CAGTTAAGAA CCCAGGGGCC
 4451 TCTGCGCCCT GGGCCCAGCT CTGTCCTACA CCGGGTCAC ATGGCACCAC
 4501 CTCTCTTGCA GCCTCCACCA AGGGCCATC GGTCTTCCCC CTGGCACCCCT
 4551 CCTCCAAGAG CACCTCTGGG GGCACAGCGG CCCTGGGCTG CCTGGTCAAG
 4601 GACTACTTCC CCGAACCGGT GACGGTGTCC TGGAACTCAG GCGCCCTGAC
 4651 CAGGGCGTG CACACCTTCC CGCTGTCCT ACAGTCCTCA GGACTCTACT
 4701 CCCTCAGCAG CGTGGTGACC GTGCCCTCCA GCAGCTTGGG CACCCAGACC
 4751 TACATCTGCA ACGTGAATCA CAAGCCCAGC AACACCAAGG TGGACAACAA
 50 4801 AGTTGGTGAG AGGCCAGCAC AGGGAGGGAG GGTGCTGCT GGAAGGCCAGG
 4851 CTCAGCGCTC CTGCCTGGAC GCATCCCGGC TATGCAGCCC CAGTCCAGGG
 4901 CAGCAAGGCA GGCCCCGTCT GCCTCTTCAC CCGGAGGCCT CTGGCCGCC
 55 4951 CACTCATGCT CAGGGAGAGG GTCTCTGGC TTTTCCCCA GGCTCTGGGC
 5001 AGGCACAGGC TAGGTGCCCT TAACCCAGGC CCTGCACACA AAGGGGCAGG
 5051 TGCTGGCTC AGACCTGCCA AGAGCCATAT CCGGGAGGAC CCTGCCCTG
 60 5101 ACGTAAGCCC ACCCCAAAGG CCAAACCTCTC CACTCCCTCA GCTCGGACAC
 5151 CTTCTCTCCT CCCAGATTCC AGTAACTCCC AATCTTCTCT CTGCAGAGCC
 5201 CAAATCTTGT GACAAAACTC ACACATGCCA ACCGTGCCA GTAAAGCCAG

ES 2 341 341 T3

5251 CCCAGGCCTC GCCCTCCAGC TCAAGGCAGG ACAGGTGCC TAGAGTAGCC
 5301 TGCATCCAGG GACAGGCCAG AGCCGGGTGC TGACACGTCC ACCTCCATCT
 5351 CTTCCCTCAGC ACCTGAACTC CTGGGGGGAC CGTCAGTCTT CCTCTTCCCC
 5401 CCAAAACCCA AGGACACCCCT CATGATCTCC CGGACCCCTG AGGTACATG
 5451 CGTGGTGGTG GACGTGAGCC ACCAAGACCC TGAGGTCAAG TTCAACTGGT
 5501 ACGTGGACGG CGTGGAGGTG CATAATGCCA AGACAAAGCC GCGGGAGGAG
 5551 CAGTACAAACA GCACGTACCG TGTGGTCAGC GTCTCACCG TCCTGCACCA
 5601 GGACTGGCTG AATGGCAAGG AGTACAAGTG CAAGGTCTCC AACAAAGCCC
 5651 TCCCCAGCCCC CATGAGAAA ACCATCTCCA AAGCCAAAGG TGGGACCCGT
 5701 GGGGTGCGAG GGCCACATGG ACAGAGGCCG GCTCGGCCCC CCCTCTGCC
 5751 TGAGAGTGAC CGCTGTACCA ACCTCTGTCC CTACAGGGCA GCCCCGAGAA
 5801 CCACAGGTGT ACACCCCTGCC CCCATCCCG GATGAGCTGA CCAAGAACCA
 5851 GGTCAAGCCTG ACCTGCCTGG TCAAAGGCCTT CTATCCCAGC GACATGCCG
 5901 TGGAGTGGGA GAGCAATGGG CAGCCGGAGA ACAACTACAA GACCACGCC
 5951 CCCGTGCTGG ACTCCGACGG CTCCCTCTTC CTCTACAGCA AGCTCACCGT
 6001 GGACAAGAGC AGGTGGCAGC AGGGGAACGT CTCTCTCATGC TCCGTGATGC
 6051 ATGAGGCTCT GCACAAACAC TACACGCAGA AGAGCCTCTC CCTGTCTCCG
 6101 GGTAAATGAG TCGCACGGCC GGCAAGCCCC CGCTCCCCGG GCTCTCGCG
 6151 TCGCACGAGG ATGCTTGGCA CGTACCCCT GTACATACTT CCCGGGGCGCC
 6201 CAGCATGGAA ATAAAGCACC CAGCGCTGCC CTGGGCCCC GCGAGACTGT
 6251 GATGGTTCTT TCCACGGGTC AGGCCGAGTC TGAGGCCTGA GTGGCATGAG
 6301 ATCTGATATC ATCGATGAAT TCGAGCTCGG TACCCGGGGAA TCGATCCAGA
 6351 CATGATAAGA TACATTGATG AGTTGGACA AACACAACT AGAATGCAGT
 6401 GAAAAAAATG CTTTATTTGT GAAATTGTG ATGCTATTGC TTTATTTGTA
 6451 ACCATTATAA GCTGCAATAA ACAAGTTAAC AACACAAATT GCATTCAATT
 6501 TATGTTCAAG GTTCAGGGGG AGGTGTGGGA GGTTTTTAA AGCAAGTAAA
 6551 ACCTCTACAA ATGTGGTATG GCTGATTATG ATCTCTAGTC AAGGCACTAT
 6601 ACATCAAATA TTCTTATTAA ACCCTTTAC AAATTAAAAA GCTAAAGGTA
 6651 CACAATTTT GAGCATAGTT ATTAATAGCA GACACTCTAT GCGTGTGTGG
 6701 AGTAAGAAAA AACAGTATGT TATGATTATA ACTGTTATGC CTACTTATAA
 6751 AGGTTACAGA ATATTTTCC ATAATTTCT TGTATAGCAG TGCAGCTTT
 6801 TCCCTTGTGG TGTAAATAGC AAAGCAAGCA AGAGTTCTAT TACTAAACAC
 6851 AGCATGACTC AAAAAACTTA GCAATTCTGA AGGAAAGTCC TTGGGGTCTT
 6901 CTACCTTTCT CTTCTTTTT GGAGGAGTAG AATGTTGAGA GTCAGCAGTA
 6951 GCCTCATCAT CACTAGATGG CATTCTCTCT GAGCAAAACA GGTTTCC
 7001 ATAAAGGCA TTCCACCACT GCTCCCATTC ATCAGTTCCA TAGGTTGGAA
 7051 TCTAAAATAC ACAACAAATT AGAATCAGTA GTTTAACACA TTATACACTT

ES 2 341 341 T3

7101 AAAAATTITA TATTACCTT AGAGCTTAA ATCTCTGTAG GTAGTTGTC
7151 CAATTATGTC ACACCACAGA AGTAAGGTTG CTPCACAAAG ATCCGGGACCC
7201 AAAGCGGCCA TCGTGCCTCC CCACTCCTGC AGTTCGGGGG CATGGATGCG
7251 CCGATAGCCG CTGCTGGTTT CCTGGATGCC GACGGATTG CACTGCCGGT
7301 AGAAACTCCGC GAGGTGTCAGC AGCCTCAGGC AGCAGCTGAA CCAACTCGCG
7351 AGGGGATCGA GCCCGGGGTG GCGGAAGAAC TCCACCATGA GATCCCCCGG
7401 CTGGAGGATC ATCCAGCCGG CGTCCCCGAA AACGATTCCG AAGCCCAACC
7451 TTTCATAGAA GGCGCGGGTG GAATCGAAAT CTGGTGTAGG CAGGTTGGGC
7501 GTCGCTTGGT CGGTCATTTC GAACCCAGA GTCCCGCTCA GAAGAACTCG
7551 TCAAGAAGGC GATAGAAGGC GATGCGCTGC GAATCGGGAG CGGCGATAACC
7601 GTAAAGCACG AGGAAGCGGT CAGCCCCATTC GCGCCAAGC TCTTCAGCAA
7651 TATCACGGGT AGCCAACGCT ATGTCCTGAT AGCGGTCCGC CACACCCAGC
7701 CGGCCACAGT CGATGAATCC AGAAAAGCGG CCATTTCCA CCATGATATT
7751 CGGCAAGCAG GCATCGCCAT GGGTCACGGAC GAGATCCTCG CGTCGGGCA
7801 TCGCGGCCCTT GAGCCTGGCG AACAGTTCGG CTGGCGCGAG CCCCTGATGC
7851 TCTTCGTCGA GATCATCCTG ATCGACAAAGA CGCGCTTCCA TCCGAGTACG
7901 TGCTCGCTCG ATGGCATGTT TCGCTTGGTG GTCGAATGGG CAGGTAGCCG
7951 GATCAAGCGT ATGCAGCCGC CGCATTGCAT CAGCCATGAT GGATACTTTG
8001 TCGGCAGGAG CAAGGTGAGA TGACAGGAGA TCCCTGCCCG GCACTTCGCC
8051 CAATAGCAGC CAGTCCCTTC CCGCTTCAGT GACAACGTCG AGCACAGCTG
8101 CGCAAGGAAC GCCCCTGCGT GCCAGCCACG ATAGCCGCGC TCCCTCGTCC
8151 TCCAGTTCAT TCAGGGCACC GGACACGGTGC GTCTTGACAA AAAGAACCGG
8201 GCGCCCCCTGC CCTGACAGCC GGAACACGGG GGCATCAGAG CAGCCGATTG
8251 TCTGTTGTGC CCAGTCATAG CCGAATAGCC TCTCCACCCA AGCGGGCCGGA
8301 GAAACCTGCGT GCAATCCATC TTGTTCAATC ATGCGAAACG ATCCCTCATCC
8351 TGTCTCTTGA TCAGATCTTG ATCCCCCTGCG CCATCAGATC CTTGGCGGCA
8401 AGAAAGCCAT CCAGTTTACT TTGCAAGGCT TCCCAACCTT ACCAGAGGGC
8451 GCCCCAGCTG GCAATTCCGG TTGCTTGCT GTCCATAAAA CGCCCGAGTC
8501 TAGCTATCGC CATGTAAGCC CACTGCAAGC TACCTGCTTT CTCTTTGCGC
8551 TTGCGTTTTC CCTTGTCCAG ATAGCCCAAGT AGCTGACATT CATCCGGGGT
8601 CAGCACCGTT TCTGCGGAAT GGCCTTCTAC GTGTTCCGCT TCCCTTGTGCA
8651 GCGCTTGCAGC CCTGAGTGCT TGCGGCAGCG TGAAGCT

50

55

60

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 3964-5 4284)

1 CTAGCTTTT GCAAAAGCCT AGGCCTCCAA AAAAGCCTCC TCAC TACTTC
10 51 TGGAATAGCT CAGAGGCCGA GGCGGCCTCG GCCTCTGCAT AAATAAAAAA
101 AATTAGTCAG CCATGGGGCG GAGAATGGGC GGAAC TGGGC GGAGTTAGGG
15 151 GCGGGATGGG CGGAGTTAGG GGCAGGGACTA TGGTTGCTGA CTAATTGAGA
201 TGCATGCTTT GCATACTTCT GCCTGCTGGG GAGCCTGGTT GCTGACTAAT
251 TGAGATGCAT GCTTGCATA CTTCTGCTG CTGGGGAGCC TGGGGACTTT
301 CCACACCCTA ACTGACACAC ATTCCACAGC TGCCCTCGCGC GTTTCGGTGA
20 351 TGACGGTGAA AACCTCTGAC ACATGCAGCT CCCGGAGACG GTCACAGCTT
401 GTCTGTAAGC GGATGCCGG AGCAGACAAG CCCGTCAGGG CGCGTCAGCG
451 GGTGTTGGCG GGTGTCGGGG CGCAGCCATG ACCCAGTCAC GTAGCGATAG
501 CGGAGTGTAT ACTGGCTTAA CTATGCGGCA TCAGAGCAGA TTGTACTGAG
551 AGTGCACCAT ATGCGGTGTG AAATACCGCA CAGATGCGTA AGGAGAAAAT
601 ACCGCATCAG GCGCTCTTCC GCTTCCTCGC TCAC TGA CTC GCTGCGCTCG
30 651 GTCGTTCGGC TGCGGGAGC GGTATCAGCT CACTCAAAGG CGGTAATACG
701 GTTATCCACA GAATCAGGGG ATAACGCAGG AAAGAACATG TGAGCAAAAG
751 GCCAGCAAAA GGCCAGGAAC CGTAAAAAAGG CGCGTTGCT GGC GTTTC
801 CATAAGGCTCC GCCCCCCCTGA CGAGC ATC AC AAAAATCGAC GCTCAAGTCA
851 GAGGTGGCGA AACCCGACAG GACTATAAAG ATACCA GGGCG TTTCCCCCTG
901 GAAGCTCCCT CGTGCCTCT CCTGTTCCGA CCCTGCCGCT TACCGGATAC
40 951 CTGTCCGCCT TTCTCCCTTC GGGAAAGCGTG GCGCTTCTC ATAGCTCACG
1001 CTGTAGGTAT CTCAGTTCGG TGTAGGTGT TCGCTCCAAG CTGGGCTGTG
1051 TGCACGAACC CCCC GTTCAG CCCCACCGCT GCGCCTTATC CGGTAACATAT
1101 CGTCTTGAGT CCAACCCGGT AAGACACCGAC TTATGCCAC TGGCAGCAGC
1151 CACTGGTAAC AGGATTAGCA GAGCGAGGTA TGTAGGCGGT GCTACAGAGT
1201 TCTTGAAGTG GTGGCTAAC TACGGCTACA CTAGAAGGAC AGTATTGGT
50 1251 ATCTGCGCTC TGCTGAAGCC AGTTACCTTC GGAAAAAGAG TTGGTAGCTC
1301 TTGATCCGGC AAACAAACCA CGCGTGGTAG CGGTGGTTTT TTGTTTGCA
1351 AGCAGCAGAT TACGCGCAGA AAAAAGGAT CTCAAGAAGA TCCCTTGATC
1401 TTTTCTACGG GGTCTGACGC TCAGTGGAAC GAAAAC TCAAC GCTAAGGGAT
1451 TTTGGTCATG AGATTATCAA AAAGGATCTT CACCTAGATC CTTTAAATT
1501 AAAAATGAAG TTTTAAATCA ATCTAAAGTA TATATGAGTA AACTTGGTCT

ES 2 341 341 T3

1551 GACAGTTACC AATGCTTAAT CAGTGAGGCA CCTATCTCAG CGATCTGTCT
 1601 ATTTCGTTCA TCCATAGTTG CCTGACTCCC CGTCGTGTAG ATAACCTACGA
 1651 TACGGGAGGG CTTACCATCT GGCCCCAGTG CTGCAATGAT ACCGCGAGAC
 1701 CCACGGTCAC CGGCTCCAGA TTTATCAGCA ATAAACCAGC CAGCCGGAAG
 1751 GGGCGAGCGC AGAAGTGGTC CTGCAACTT ATCCGCCTCC ATCCAGTCTA
 1801 TTAATTGTTG CCGGGAAAGCT AGAGTAAGTA GTTCCGCAGT TAATAGTTG
 1851 CGCAACGTTG TTGCCATTGC TGCAGGCATC GTGGTGTAC C GCTCGTCGTT
 1901 TGGTATGGCT TCATTCAGCT CCGGTTCCCA ACGATCAAGG CGAGTTACAT
 1951 GATCCCCCAT GTTGTGCAAA AAAGCGGTTA GCTCCTTCGG TCCTCCGATC
 2001 GTTGTCAAGAA GTAAAGTTGGC CGCAGTGTAA TCACTCATGG TTATGGCAGC
 2051 ACTGCCATAAT TCTCTTACTG TCATGCCATC CGTAAGATGC TTTTCTGTGA
 2101 CTGGTGAGTA CTCAACCAAG TCATTCTGAG AATAGTGTAT GCGGCGACCG
 2151 AGTTGCTCTT GCCCGGCGTC AACACGGGAT AATACCGCGC CACATAGCAG
 2201 AACTTTAAAAA GTGCTCATCA TTGGAAAACG TTCTTCGGGG CGAAAACCTCT
 2251 CAAGGATCTT ACCGCTGTTG AGATCCAGIT CGATGTAACC CACTCGTGCA
 2301 CCCAACTGAT CTTCAGCATC TTTACTTTC ACCAGCGTTT CTGGGTGAGC
 2351 AAAAACAGGA AGGCAAAATG CCGCAAAAAA GGGATAAAGG GCGACACGGA
 2401 AATGTTGAAT ACTCATACTC TTCCCTTTTC AATATTATTG AAGCATTAT
 2451 CAGGGTTATT GTCTCATGAG CGGATACATA TTTGAATGTA TTTAGAAAAA
 2501 TAAACAAATA GGGCTTCGGC GCACATTTC CCGAAAAGTG CCACCTGACG
 2551 TCTAAGAAAC CATTATTATC ATGACATTAA CCTATAAAA TAGGCGTATC
 2601 ACGAGGCCCT TTGCTCTTCA AGAATTCAAGC TTGGCTGCAG TGAATAATAA
 2651 AATGTGTGTT TGTCCGAAAT ACGCGTTTG AGATTCTGT CGCCGACTAA
 2701 ATTCACTGTCG CGCGATAGTG GTGTTATCG CCGATAGAGA TGGCGATATT
 2751 GGAAAAATCG ATATTGAAA ATATGGCATA TTGAAAATGT CGCCGATGTG
 2801 AGTTTCTGTG TAACTGATAT CGCCATTTTT CCAAAAGTGA TTTTGGGCA
 2851 TACGGCATAT CTGGCGATAG CGCTTATATC GTPTACGGGG GATGGCGATA
 2901 GACGACTTTG GTGACTTGGG CGATTCTGTG TGTGCAAAT ATCGCAGTTT
 2951 CGATATAGGT GACAGACGAT ATGAGGCTAT ATCGCCGATA GAGGCCACAT
 3001 CAAGCTGGCA CATGGCCAAT GCATATCGAT CTATACATTG AATCAATATT
 3051 CGCCATTAGC CATATTATTC ATTGGTTATA TAGCATAAAAT CAATATTGGC
 3101 TATTGGCCAT TGCATACTGTT GTATCCATAT CATAATATGT ACATTTATAT
 3151 TGGCTCATGT CCAACATTAC CGCCATGTG ACATGATTA TTGACTAGTT
 3201 ATTAATAGTA ATCAATTACG GGGTCATTAG TTCAAGGCC ATATATGGAG
 3251 TTCCCGCGTTA CATAACTTAC GGTAAATGCC CCGCCTGGCT GACCGCCCAA
 3301 CGACCCCCCGC CCATTGACGT CAATAATGAC GTATGTTCCC ATAGTAACGC
 3351 CAATAGGGAC TTTCCATTGA CGTCAATGGG TGGACTATTT ACGGTAAACT

ES 2 341 341 T3

3401	GCCTCACTTGG CAGTACATCA AGTGTATCAT ATGCCAAGTA CGCCCCCTAT
3451	TGACGTCAAT GACGGTAAAT GGCCCGCCTG GCATTATGCC CAGTACATGA
5 3501	CCTTATGGGA CTTTCTACT TGGCAGTACA TCTACGTATT AGTCATCGCT
3551	ATTACCATGG TGATGCGGTT TTGGCAGTAC ATCAATGGGC GTGGATAGCG
10 3601	GTTTGACTCA CGGGGATTTC CAAGTCTCCA CCCCATTGAC GTCAATGGGA
3651	GTTTGTTTG GCACCAAAAT CAACGGGACT TTCCAAAATG TCGTAACAAC
15 3701	TCCGCCCAT TGACGCAAAT GGGCGGTAGG CGTGTACGGT GGGAGGTCTA
3751	TATAAGCAGA GCTCGTTAG TGAACCGTCA GATCGCTGG AGACGCCATC
20 3801	CACGCTGTT TGACCTCCAT AGAAGACACC GGGACOGATC CAGCCTCCGC
3851	AAGCTTGATA TCGAATTCT GCAGCCCCGG GGATCGGCC GCTTGCCGCC
25 3901	ACCATGGAGA CCCCCGCCA GCTGCTGTT CTGCTGCTGC TGTGGCTGCC
3951	CGACACCACC GGCAGACATT TGCTGACCCA GTCTCCAGCC ACCCTGTCTC
4001	TGAGTCCAGG AGAAAGAGCC ACTCTCTCCT GCAGGGCCAG TCAGAACATT
4051	GGCACAAAGCA TACAGTGGTA TCAACAAAAA CCAGGTCAGG CTCCAAGGCT
25 4101	TCTCATAAGG TCTTCTCTG AGTCTATCTC TGGGATCCCT TCCAGGTTA
4151	GTGGCAGTGG ATCAGGGACA GATTTTACTC TTACCATCAG CAGTCTGGAG
4201	CCTGAAGATT TTGCAGTGTAA TTACTGTCAA CAAAGTAATA CCTGGCCATT
30 4251	CACGTTCGGC CAGGGGACCA AGCTGGAGAT CAAACGTGAG TATTCTAGAA
4301	AGATCCTAGA ATTCTAAACT CTGAGGGGCT CGGATGACGT GGCCATTCTT
4351	TGCCCTAAAGC ATTGAGTTA CTGCAAGGTC AGAAAAGCAT GCAAAGCCCT
4401	CAGAATGGCT GCAAAGAGCT CCAACAAAAC AATTAGAAC TTTATTAAAGG
35 4451	AATAGGGGGA AGCTAGGAAG AAACCTAAAAA CATCAAGATT TTAAATACGC
4501	TTCTGGTCT CCTTGCTATA ATTATCTGGG ATAAGCATGC TGTTTCTGT
4551	CTGTCCCTAA CATGCCCTGT GATTATCCGC AAACAACACA CCCAAGGGCA
4601	GAACTTGTT ACTTAAACAC CATCCTGTT GCTCTTTCC TCAGGAACIG
4651	TGGCTGCACC ATCTGTCTTC ATCTCCCGC CATCTGATGA GCAGTTGAAA
4701	TCTGGAACTG CCTCTGTTGT GTGCCTGCTG AATAACTTCT ATCCCAGAGA
4751	GGCCAAAGTA CAGTCCAAGG TGGATAACGC CCTCCAATCG GGTAACCTCCC
4801	AGGAGAGTGT CACAGAGCAG GACAGCAAGG ACAGCACCTA CAGCCTCAGC
4851	AGCACCCCTGA CGCTGAGCAA AGCAGACTAC GAGAAACACA AAGTCTACGC
50 4901	CTGCGAAGTC ACCCATCAGG GCCTGAGCTC GCCCGTCACA AAGAGCTTC
4951	ACAGGGGAGA GTGTTAGAGG GAGAAGTGCC CCCACCTGCT CCTCAGTTCC
5001	AGCCTGACCC CCTCCCATCC TTTGGCCTCT GACCTTTTT CCACAGGGGA
55 5051	CCTACCCCTA TTGCGGTCT CCAGCTCATC TTTCACCTCA CCCCCCTCCCT
5101	CCTCCTTGGC TTTAATTATG CTAATGTTGG AGGAGAATGA ATAAATAAAAG
5151	TGAATCTTG CACCTGTGGT TTCTCTCTT CCTCAATTAA TAATTATTAT
60 5201	CTGTTGTTA CCAACTACTC AATTCTCTT ATAAGGGACT AAATATGTAG

ES 2 341 341 T3

5251 TCATCCTAAG GCGCATAACC ATTTATAAAA ATCATCCTTC ATTCTATTT
 5301 ACCCTATCAT CCTCTGCAAG ACAGTCCTCC CTCAAACCCA CAAGCCTCT
 5351 GTCCTCACAG TCCCCTGGGC CATGGTAGGA GAGACTTGCT TCCTTGTTT
 5401 CCCCTCCTCA GCAAGCCCTC ATAGTCCTTT TTAAGGGTGA CAGGTCTTAC
 5451 AGTCATATAT CCTTGTGATT AATTCCCTGA GAATCAACCA AAGCAAATTT
 5501 TTCAAAAGAA GAAACCTGCT ATAAAGAGAA TCATTCAATTG CAACATGATA
 5551 TAAAATAACA ACACAATAAA AGCAATTAAA TAAACAAACA ATAGGGAAAT
 5601 GTTTAAGTTC ATCATGGTAC TTAGACTTAA TGGAATGTCA TGCCCTATTT
 5651 ACATTTTAA ACAGGTACTG AGGGACTCCT GTCTGCCAAG GGCGTATTG
 5701 AGTACTTTCC ACAACCTAAT TTAATCCACA CTATACTGTG AGATTAAAAAA
 5751 CATTGATTAA AATGTTGCAA AGGTTCTATA AAGCTGAGAG ACAAAATATAT
 5801 TCTATAACTC AGCAATCCCA CTCCTAGATG ACTGAGTGTC CCCACCCACC
 5851 AAAAAACTAT GCAAGAATGT TCAAAGCAGC TTTATTTACA AAAGCCAAAAA
 5901 ATTGGAAATA GCCCGATTGT CCAACAATAG AATGAGTTAT TAAACTGTGG
 5951 TATGTTTATA CATTAGAATA CCCAATGAGG AGAATTAAACA AGCTACAAC
 6001 ATACCTACTC ACACAGATGA ATCTCATAAA AATAATGTT CATAAGAGAA
 6051 ACTCAATGCA AAAGATATGT TCTGTATGT TTCATCCATA TAAAGTTCAA
 6101 AACCCAGTAA AAATAAAGTT AGAAAATTGG ATGGAAATTAA CTCCTTAGCTG
 6151 GGGGTGGGCG AGTTAGTGCC TGGGAGAAGA CAAGAAGGGG CTTCTGGGTT
 6201 CTTGGTAATG TTCTGTTCCCT CGTGTGGGT TGTGCAGTTA TGATCTGTGC
 6251 ACTGTTCTGT ATACACATTA TGCTTCAAAA TAACTTCACA TAAAGAACAT
 6301 CTTATAACCA GTTAATAGAT AGAAGAGGAA TAAGTAATAG GTCAAGACCA
 6351 CGCAGCTGGT AAGTGGGGGG GCCTGGGATC AAATAGCTAC CTGCCCTAAC
 6401 CTGCCCTCTT GAGCCCTGAA TGAGTCTGCC TTCCAGGGCT CAAGGTGCTC
 6451 AACAAAACAA CAGGCCTGCT ATTTCTGG CATCTGTGCC CTGTTGGCT
 6501 AGCTAGGAGC ACACATACAT AGAAAATTAAA TGAAACAGAC CTTCAGCAAG
 6551 GGGACAGAGG ACAGAAATTAA CCTTGCCAG ACACTGGAAA CCCATGTATG
 6601 AACACTCACA TGTTGGGAA GGGGGAAAGGG CACATGTAAA TGAGGACTCT
 6651 TCCTCATTCT ATGGGGCACT CTGGCCCTGC CCCTCTCAGC TACTCATCCA
 6701 TCCAACACAC CTTTCTAAGT ACCTCTCTCT GCCTACACTC TGAAGGGGTT
 6751 CAGGAGTAAC TAACACAGCA TCCCTTCCCT CAAATGACTG ACAATCCCTT
 6801 TGTCTGCTT TGTTTTCTT TCCAGTCAGT ACTGGGAAAG TGGGAAAGGA
 6851 CAGTCATGGA GAAACTACAT AAGGAAGCAC CTTGCCCTTC TGCTCTTGA
 6901 GAATGTTGAT GAGTATCAAA TCTTCAAAAC TTTGGAGGTT TGAGTACGGG
 6951 TGAGACTCAG TAATGTCCT TCCAATGACA TGAACCTGCT CACTCATCCC
 7001 TGGGGGCCAA ATTGAACAAT CAAAGGCAGG CATAATCCAG CTATGAATT
 7051 TAGGATCGAT CCAGACATGA TAAGATACAT TGATGAGTTT GGACAAACCA

ES 2 341 341 T3

7101 CAACTAGAAT GCAGTGAAAA AAATGCTTTA TTTGTGAAAT TTGTGATGCT
 7151 ATTGCTTTAT TTGTAACCAT TATAAGCTGC AATAAACAAAG TTAACAAACAA
 5 7201 CAATTGCATT CATTATGTGTT TTCAGGTTCA GGGGGAGGTG TGGGAGGTTT
 7251 TTTAAAGCAA GTAAAACCTC TACAAATGTG GTATGGCTGA TTATGATCTC
 10 7301 TAGTCAGGGC ACTATACATC AAATATTCTT TATTAACCCC TTTACAAATT
 7351 AAAAAGCTAA AGGTACACAA TTTTGAGCA TAGTTATTAA TAGCAGACAC
 7401 TCTATGCCTG TGTGGAGTAA GAAAAAACAG TATGTTATGA TTATAACTGT
 15 7451 TATGCCTACT TATAAAGGTT ACAGAATATT TTTCCATAAT TTTCTTGTAT
 7501 AGCAGTGCAG CTTTTTCCTT TGTGGTGTAA ATAGCAAAGC AAGCAAGAGT
 7551 TCTATTACTA AACACAGCAT GACTCAAAAA ACTTAGCAAT TCTGAAGGAA
 7601 AGTCCTTGGG GTCTCTTACCC TTTCTCTTCT TTTTTGGAGG AGTAAATGT
 20 7651 TGAGAGTCAG CAGTAGCCTC ATCATCACTA GATGGCATTT CTTCTGAGCA
 7701 AAACAGGTTT TCCTCATTAA AGGCATTCCA CCACTGCTCC CATTCACTAG
 7751 TTCCATAGGT TGGAATCTAA AATACACAAA CAATTAGAAT CAGTAGTTA
 25 7801 ACACATTATA CACTAAAAAA TTTTATATTT ACCTTAGAGC TTTAAATCTC
 7851 TGTAGGTAGT TTGTCCTAATT ATGTCACACC ACAGAAGTAA GGTTCCPTCA
 7901 CAAAGATCCG GGACCAAAGC GGCCATCGTG CCTCCCCACT CCTGCAGTTC
 30 7951 GGGGGCATGG ATGCCGCGGAT AGCCGCTGCT GGTTTCTGG ATGCCGACGG
 8001 ATTTGCCTTG CCGGTAGAAC TCCGCGAGGT CGTCCAGCCT CAGGCAGCAG
 8051 CTGAACCAAC TCCGCGAGGGG ATCGAGCCCCG GGGTGGGCCA AGAACTCCAG
 35 8101 CATGAGATCC CCGCGCTGGA GGATCATCCA GCGGGCGTCC CGGAAAACGA
 8151 TTCCGAAGCC CAACCTTCA TAGAAGGCGG CGTGGAAATC GAAATCTCGT
 8201 GATGGCAGGT TGGGCGTCGC TTGGTGGTC ATTTCGAACC CCAGAGTCCC
 40 8251 GCTCAGAAGA ACTCGTCAAG AAGGCGATAG AAGGCGATGC GCTGCGAATC
 8301 GGGAGCGGGC ATACCGTAAA GCACGAGGAA GCGGTCAGCC CATTGCCCGC
 8351 CAAGCTCTTC AGCAATATCA CGGGTAGCCA ACGCTATGTC CTGATAGCGG
 45 8401 TCCGCCACAC CCAGCCGGCC ACAGTCGATG AATCCAGAAA AGCGGCCATT
 8451 TTCCACCATG ATATTCGGCA AGCAGGCATC GCCATGGGTC ACGACCGAGAT
 8501 CCTCGCCGTC GGGCATGGC GCCTTGAGCC TGGCGAACAG TTGGGCTGGC
 8551 GCGAGCCCT GATGCTCTTC GTCCAGATCA TCCTGATCGA CAAGACCGGC
 8601 TTCCATCCGA GTACGTGCTC GCTCGATGCG ATGTTTCGCT TGGTGGTCGA
 8651 ATGGGCAGGT AGCCGGATCA AGCGTATGCA GCAGCCCGCAT TGCATCAGCC
 55 8701 ATGATGGATA CTTTCCTCGGC AGGAGCAAGG TGAGATGACA GGAGATCCTG
 8751 CCCCGGCACT TCGCCCAATA GCAGCCAGTC CCTTCCCGCT TCAGTGACAA
 8801 CGTCGAGCAC AGCTGCGCAA GGAACGCCCG TCGTGGCCAG CCACGGATAGC
 8851 CGCGCTGCCT CGTCCTGCAG TTCAATTAGG GCACCGGACA GGTGGGTCTT
 8901 GACAAAAAGA ACCGGGCGCC CCTGCGCTGA CAGCCGGAAC ACGGCAGGCAT

ES 2 341 341 T3

5 8951 CAGAGCAGCC GATTGTCTGT TGTGCCAGT CATAGCCGAA TAGCCTCTCC
9001 ACCCAAGCGG CCGGAGAACCC TGGGTGCAAT CCATCTTGTT CAATCATGCG
9051 AAACGATCCT CATCCCTGTCT CTTGATCAGA TCTTGATCCC CTGGGCCATC
9101 AGATCCTTGG CGGCAAGAAA GCCATCCAGT TTACTTGCA GGGCTTCCCA
9151 ACCTTACCAAG AGGGCGCCCC AGCTGGCAAT TCCGGTTCGC TTGCTGTCCA
10 9201 TAAAACCGCC CAGTCTAGCT ATCGCCATGT AAGCCCACGT CAAGCTACCT
9251 GCTTCTCTT TGCGCTTGCCTG TTTTCCCTTG TCCAGATAGC CCAGTAGCTG
9301 ACATTCATCC GGGGTCAAGCA CCGTTTCTGC GGACTGGCTT TCTACGTGTT
9351 CCGCTTCCCTT TAGCAGCCCT TGCGCCCTGA GTGCTTGCCTG CAGCGTGAAG

15

20 SEQ ID NO: 18

25 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)

30 1 CTAGCTTTT GCAAAAGCCT AGGCCTCCAA AAAAGCCCTCC TCACTACTTC
51 TGGAAATAGCT CAGAGGCCGA GGCAGGCCTCG GCCTCTGCAT AAATAAAAAAA
101 AATTAGTCAG CCATGGGGCG GAGAATGGGC GGAACCTGGGC CGAGTTAGGG
151 GCGGGATGGG CGGAGTTAGG GGCAGGGACTA TGGTTGCTGA CTAATTGAGA
201 TGCATGCTTT GCATACTTCT GCCTGCTGGG GAGCCTGGTT GCTGACTAAT
251 TGAGATGCAT GCTTGCATA CTTCTGCCTG CTGGGGAGCC TGGGGACTTT
301 CCACACCCCTA ACTGACACAC ATTCCACAGC TGCCCTCGCGC GTTTCGGTGA
351 TGACGGTGAA AACCTCTGAC ACATGCAGCT CCCGGAGACG GTCACAGCTT
401 GTCTGTAAGC GGATGCCGGG AGCAGACAAG CCCGTCAGGG CGCGTCAGCG
451 GGTGTTGGCG CGTGTGGGG CGCAGCCATG ACCCAGTCAC GTAGCGATAG
501 CGGAGTGTAT ACTGGCTTAA CTATGCCGCA TCAGAGCAGA TTGTACTGAG
551 AGTGCACCAT ATGCCGTGTG AAATACCGCA CAGATGCGTA AGGAGAAAAT
601 ACCGCATCAG GCGCTCTTCC GCTTCTCGC TCAC TGACTC GCTGCGCTCG
651 GTCGTTCGGC TGCGGGAGC CGTATCAGCT CACTCAAAG CGGTAATACG
701 GTTATCCACA GAATCAGGGG ATAACGCAGG AAAGAACATG TGAGCAAAG
751 GCCAGAAAA GGCAGGAAC CGTAAAAGG CCGCGTGCT GGCCTTTTC
801 CATAGGCTCC GCCCCCTGA CGAGCATCAC AAAAATCGAC GCTCAAGTCA
851 GAGGTGGCGA AACCCGACAG GACTATAAAG ATACCAGGGG TTTCCCCCTG
901 GAAGCTCCCT CGTGCCTCT CCTGTTCCGA CCCTGCGCT TACCGGATAC
951 CTGTCCGGCT TTCTCCCTTC GGGAAAGCGTG GCGCTTCTC ATAGCTCACG
1001 CTGTAGGTAT CTCAGTTCGG TGTAGGTGCT TCGCTCCAAG CTGGCTGTG

60

65

ES 2 341 341 T3

1051 TGCACGAACC CCCC GTTCAG CCCGACCGCT GCGCCTTATC CGGTAACAT
 1101 CGTCTTGAGT CCAACCCGGT AAGACACGAC TTATGCCAC TGGCAGCAGC
 1151 CACTGGTAAC AGGATTAGCA GAGCGAGGTA TGTAGGCGGT GCTACAGAGT
 1201 TCTTGAAGTG GTGGCCTAAC TACGGCTACA CTAGAAGGAC AGTATTGGT
 1251 ATCTGCGCTC TGCTGAAGCC AGTTACCTTC GGAAAAAGAG TTGGTAGCTC
 1301 TTGATCCGGC AAACAAACCA CCGCTGGTAG CGGTGGTTTT TTTGTTGCA
 1351 AGCAGCAGAT TACGCGCAGA AAAAAAGGAT CTCAGAAGA TCCTTGTAC
 1401 TTTTCTACGG GGTCTGACGC TCAGTGGAAC GAAAACCTAC GTTAAGGGAT
 1451 TTPGGTCATG AGATTATCAA AAAGGATCTT CACCTAGATC CTTTAAATT
 1501 AAAATGAAG TTTTAAATCA ATCTAAAGTA TATATGAGTA AACTTGGTCT
 1551 GACAGTTACC AATGCTTAAT CAGTGAGGCA CCTATCTCAG CGATCTGTCT
 1601 ATTCGTTCA TCCATAGTTG CCTGACTCCC CGTCGTGTAG ATAACATACGA
 1651 TACGGGAGGG CTTACCATCT GGCCCCAGTG CTGCAATGAT ACCGCGAGAC
 1701 CCACGCTCAC CGGCTCCAGA TTTATCAGCA ATAAACCAGC CAGCCGGAAG
 1751 GGCCGAGCGC AGAAGTGGTC CTGCAACTTT ATCCGGCTCC ATCCAGTCTA
 1801 TTAATTGTTG CCGGGAAAGCT AGACTAAGTA GTTCGCCAGT TAATAGTTG
 1851 CGCAACGTTG TTGCCATTGC TGCAGGCATC GTGGTGTAC GCTCGTCGTT
 1901 TGGTATGGCT TCATTCAGCT CCGGTTCCCA ACCATCAAGG CGAGTTACAT
 1951 GATCCCCCAT GTGTGCAAA AAAGCGGTTA GCTCCTTCGG TCCTCCGATC
 2001 GTTGTCAAGAA GTAAGTTGGC CGCAGTGTAA TCACTCATGG TTATGGCAGC
 2051 ACTGCATAAT TCTCTTACTG TCATGCCATC CGTAAGATGC TTTTCTGTGA
 2101 CTGGTGAGTA CTCAACCAAG TCATTCTGAG AATAGTGTAT GCGGCGACCG
 2151 AGTTGCTCTT GCCCCGGCGTC AACACGGGAT AATACCGCGC CACATAGCAG
 2201 AACTTTAAAAA GTGCTCATCA TTGGAAAACG TTCTTCGGGG CGAAAACCT
 2251 CAAGGATCTT ACCGCTGTTG AGATCCAGTT CGATGTAACC CACTCGTGCA
 2301 CCCAACTGAT CTTCAAGCATC TTTTACTTTC ACCAGCGTTT CTGGGTGAGC
 2351 AAAAACAGGA AGGCAAAATG CCGCAAAAAA CGGAATAAGG GCGACACGGA
 2401 AATGTTGAAT ACTCATACTC TTCTTTTTC AATATTATTG AAGCATTIAT
 2451 CAGGGTTATT GTCTCATGAG CGGATACATA TTTGAATGTA TTTAGAAAAA
 2501 TAAACAAATA GGGGTCCGC GCACATTTC CCGAAAAGTG CCACCTGACG
 2551 TCTAAGAAC CATTATTATC ATGACATTAA CCTATAAAAA TAGGGTATC
 2601 ACGAGGCCCT TTCGTCTTCA AGAATTCAAGC TTGGCTGCAG TGAATAATAA
 2651 AATGTGTGTT TGTCCGAAAT ACGCGTTTG AGATTTCTGT CGCCGACTAA
 2701 ATTCAATGTGCG CGCGATAGTG GTGTTATCG CCGATAGAGA TGGCGATATT
 2751 GGAAAAATCG ATATTTGAAA ATATGGATA TTGAAAATGT CGCCGATGTG
 2801 AGTTTCTGTG TAACTGATAT CGCCATTTT CCAAAAGTGA TTTTGGGCA
 2851 TACGCGATAT CTGGCGATAG CGCTTATATC GTTACGGGG GATGGCGATA

ES 2 341 341 T3

2901 GACGACTTTG GTGACTTGGG CGAATTCTGTG TGTCGCAAAT ATCGCAGTTT
 2951 CGATATAGGT GACAGACGAT ATGAGGCTAT ATCGCCGATA GAGGCGACAT
 3001 CAAGCTGGCA CATGGCCAAT GCATATCGAT CTATACATTG AATCAATATT
 3051 GGCCATTAGC CATATTATTC ATTGGTTATA TAGCATAAAT CAATATTGGC
 3101 TATTGGCCAT TGCATACTT GTATCCATAT CATAATATGT ACATTTATAT
 3151 TGGCTCATGT CCAACATTAC CGCCATGTTG ACATTGATTA TTGACTAGTT
 3201 ATTAATAGTA ATCAATTACG GGGTCATPTAG TTCATAGCCC ATATATGGAG
 3251 TTCCCGCGTTA CATAACTTAC GGTAAATGGC CGGCCTGGCT GACCGCCCAA
 3301 CGACCCCCCGC CCATTGACGT CAAATAATGAC GTATGTTCCC ATAGTAACGC
 3351 CAATACGGAC TTTCCATTGA CGTCAATGGG TGGAGTATT ACGGTAAACT
 3401 GCCCAGTTGG CAGTACATCA AGTGTATCAT ATGCCAAGTA CGCCCCCTAT
 3451 TGACGTCAAT GACGGTAAAT GGCCCGCCTG GCATTATGCC CAGTACATGA
 3501 CCTTATGGGA CTTTCCTACT TGGCAGTACA TCTACGTATT AGTCATCGCT
 3551 ATTACCATGG TGATGCGGTT TTGGCAGTAC ATCAATGGC GTGGATAGCG
 3601 GTTTGACTCA CGGGGATTTG CAAGTCTCCA CCCCCATTGAC GTCAATGGGA
 3651 GTTTGTTTTG GCACCAAAAT CAACGGGACT TTCCAAAATG TCGTAACAAC
 3701 TCCGCCCAT TGACGGAAAT GGGCGGTAGG CGTGTACGGT GGGAGGTCTA
 3751 TATAAAGCAGA GCTCGTTAG TGAACCGTCA GATCGCCCTGG AGACGCCATC
 3801 CACGCTGTTT TGACCTCCAT AGAAGACACC GGGACCGATC CAGCCTCOGC
 3851 AAGCTTGCCG CCACCATGGA GACCCCCGCC CAGCTGCTGT TCCCTGCTGCT
 3901 GCTGTGGCTG CCCGACACCA CCGGCGACAT TCTGCTGACC CAGTCTCCAG
 3951 CCACCCCTGTC TCTGAGTCCA GGAGAAAAGAG CCACTTTCTC CTGCAGGGCC
 4001 AGTCAGAAACA TTGGCACAAG CATAACAGTGG TATCAACAAA AAACAAATGG
 4051 TGCTCCAAGG CTTCTCATAA GGTCTTCTTC TGAGTCTATC TCTGGGATCC
 4101 CTTCCAGGTT TAGTGGCACT GGATCAGGGG CAGATTTAC TCTTACCATC
 4151 AGCAGTCTGG AGCCTGAAGA TTTTGCAGTG TATTACTGTC AACAAAAGTAA
 4201 TACCTGGCCA TTCACGTTG GCCAGGGGAC CAAGCTGGAG ATCAAACGTG
 4251 AGTATTCTAG AAAGATCCTA GAATTCTAAA CTCTGAGGGG GTCGGATGAC
 4301 GTGGCCATTC TTTGCCTAAA GCATTGAGTT TACTGCAAGG TCAGAAAAGC
 4351 ATGCCAAGGCC CTCAGAAATGG CTGCAAAGAG CTCCAACAAA ACAATTAGA
 4401 ACTTTATTAA GGAATAAGGGG GAAGCTAGGA AGAAAATCAA AACATCAAGA
 4451 TTTTAAATAC GCTTCTTGGT CTCCCTGCTA TAATTATCTG GGATAAGCAT
 4501 GCTGTTTCT GTCTGTCCT AACATGCCCT GTGATTATCC GCAAACAAACA
 4551 CACCCAAAGGG CAGAACTTTG TTACTTAAAC ACCATCCTGT TTGCTTCTTT
 4601 CCTCAGGAAC TGTGGCTGCA CCATCTGTCT TCATCTTCCC GCCATCTGAT
 4651 GAGCAGTTGA AATCTGGAAC TGCCTCTGTT GTGTGCCTGC TGAATAACTT
 4701 CTATCCCAGA GAGGCCAAAG TACAGTGGAA GGTGGATAAC GCCCTCCAAT

ES 2 341 341 T3

4751 CGGGTAACTC CCAGGAGAGT GTCACAGAGC AGGACAGCAA GGACAGCACC
 4801 TACAGCCTCA GCAGCACCCCT GACGCTGAGC AAAGCAGACT ACGAGAAACA
 4851 CAAAGTCTAC GCCTGCGAAG TCACCCATCA GGGCCTGAGC TCGCCCGTCA
 4901 CAAAGAGCTT CAACAGGGGA GAGTGTAGA GCGAGAAGTG CCCCCACCTG
 4951 CTCCTCAGTT CCAGCCTGAC CCCCTCCCCT CTTTTGGCCT CTGACCCCTT
 5001 TTCCACAGGG GACCTACCCC TATTGCGGTC CTCCAGCTCA TCTTCACCT
 5051 CACCCCCCTC CTCCTCCTTG GCTTTAATTA TGCTAATGTT GGAGGAGAAT
 5101 GAATAAATAA AGTGAATCTT TGCACCTGTG GTTTCTCTCT TTCCCTCATTT
 5151 AATAATTATT ATCTGTTGTT TACCAACTAC TCAATTCTC TTATAAGGGA
 5201 CTAATATATGT AGTCATCTA AGGGCGATAA CCATTTATAA AAATCATCCT
 5251 TCATTCTATT TTACCCCTATC ATCCCTGTCA AGACAGTCCT CCCTCAAACC
 5301 CACAAGCCTT CTGTCCTCAC AGTCCCCCTGG GCCATGGTAG GAGAGACTTG
 5351 CTTCCCTGTT TTCCCCCTCCT CAGCAAGCCC TCATAGTCCT TTTTAAGGGT
 5401 GACAGGTCTT ACAGTCATAT ATCCTTGTAT TCAATTCCCT GAGAATCAAC
 5451 CAAAGCAAAT TTTTCAAAAG AAGAAACCTG CTATAAAGAG AATCATTCAT
 5501 TGCAACATGA TATAAAATAA CAACACAATA AAACCAATTA AATAAACAAA
 5551 CAATACGGAA ATGTTTAAGT TCATCATGGT ACTTAGACTT AATGGAATGTT
 5601 CATGCCCTAT TTACATTTT AAACAGGTAC TGAGGGACTC CTGTCCTGCCA
 5651 AGGGCCGTAT TGAGTACTTT CCACAAACCTA ATTTAATCCA CACTATACTG
 5701 TGAGATTAAG AACATTCAATT AAAATGTTGC AAAGGTTCTA TAAAGCTGAG
 5751 AGACAAATAT ATTCTATAAC TCAGCAATCC CACTTCTAGA TGACTGAGTG
 5801 TCCCCACCCA CCAAAAAACT ATGCAAGAAT GTCAAAGCA GCTTATTTA
 5851 CAAAAGCCAA AAATTGGAAA TAGCCCGATT GTCCAACAAT AGAATGAGTT
 5901 ATTAAACTGT GGTATGTTA TACATTAGAA TACCCCATGA GGAGAATTAA
 5951 CAAGCTACAA CTATACCTAC TCACACAGAT GAATCTCATA AAAATAATGTT
 6001 TACATAAGAG AAACCTCAATG CAAAGATAT GTTCTGTATG TTTTCATCCA
 6051 TATAAAGTTC AAAACCAGGT AAAAATAAAG TTAGAAATTG GGATGGAAAT
 6101 TACTCTTAGC TGGGGGTGGG CGAGTTAGTG CCTGGGAGAA GACAAGAAGG
 6151 GGCTTCTGGG GTCTTGGTAA TGTTCTGTTC CTCGTGTGGG GTTGTGCAGT
 6201 TATGATCTGT GCACTGTTCT GTATACACAT TATGTTCAA AATAACTTCA
 6251 CATAAAAGAAC ATCTTATACC CAGTTAATAG ATAGAACAGG AATAAGTAAT
 6301 AGGTCAAGAC CACGCAGCTG GTAAAGTGGG GGGCCTGGGA TCAAATAGCT
 6351 ACCTGCCTAA TCCTGCCCTC TTGAGCCCTG AATGAGTCTG CCTTCCAGGG
 6401 CTCAAGGTGC TCAACAAAAC AACAGGCCTG CTATTTCCCT GGCATCTGTG
 6451 CCCTGTTGG CTAGCTAGGA GCACACATAC ATAGAAATTAA AATGAAACAG
 6501 ACCTTCAGCA AGGGGACAGA GGACAGAATT AACCTTGCCC AGACACTGGA
 6551 AACCCATGTA TGAACACTCA CATGTTGGG AAGGGGAAAG GGCACATGTA

ES 2 341 341 T3

6601 AATGAGGACT CTTCCCTCATT CTATGGGGCA CTCTGGCCCT GCCCCTCTCA
 6651 GCTACTCATC CATCCAACAC ACCTTTCTAA GTACCTCTCT CTGCCTACAC
 5 6701 TCTGAAGGGG TTCAGGAGTA ACTAACACAG CATCCCTTCC CTCAAATGAC
 6751 TGACAATCCC TTTGTCTGC TTTGTTTTC TTTCCAGTCA GTACTGGGAA
 6801 AGTGGGGAAG GACAGTCATG GAGAAACTAC ATAAGGAAGC ACCTTGCCT
 10 6851 TCTGCCTCTT GAGAATGTTG ATGAGTATCA AATCTTCAA ACTTTGGAGG
 6901 TTTGAGTAGG GGTGAGACTC AGTAATGTCC CTTCCAATGA CATGAACCTG
 6951 CTCACTCATC CCTGGGGGCC AAATTGAACA ATCAAAGGCA GGCATAATCC
 15 7001 AGCTATGAAT TCTAGGATCG ATCCAGACAT GATAAGATAC ATTGATGAGT
 7051 TTGGACAAAC CACAACCTAGA ATGCAGTGAA AAAATGCTT TATTGTGAA
 7101 ATTTGTGATG CTATTGCTT ATTGTAAACC ATTATAAGCT GCAATAAACCA
 20 7151 AGTTAACAAAC AACAAATTGCA TTCATTTAT GTTTCAGGTT CAGGGGGAGG
 7201 TGTGGGAGGT TTTTTAAAGC AAGTAAACCC TCTACAAATG TGCTATGGCT
 7251 GATTATGATC TCTAGTCAAG GCACTATACA TCAAAATATTC CTTAATAACC
 25 7301 CCCTTACAAA TTAAAAAGCT AAAGGTACAC AATTTTGAG CATAGTTATT
 7351 AATAGCAGAC ACTCTATGCC TGTGTGGAGT AAGAAAAAAC AGTATGTTAT
 7401 GATTATAACT GTTATGCCCTA CTTATAAAGG TTACAGAATA TTTTCCATA
 30 7451 ATTTTCTTGT ATAGCAGTGC AGCTTTTCC TTTGTGGTGT AAATAGCAAA
 7501 GCAAGCAAGA GTTCTATTAC TAAACACAGC ATGACTCAAA AAACCTTAGCA
 7551 ATTCTGAAGG AAAGTCCTTG GGGCTTCTA CCTTTCTCTT CTTTTTGGA
 35 7601 GGAGTAGAAT GTTGAGAGTC AGCAGTAGCC TCATCATCAC TAGATGGCAT
 7651 TTCTTCTGAG CAAAACAGGT TTTCTCATT AAAGGCATTG CACCACTGCT
 7701 CCCATTCATC AGTTCCATAG GTTGGAAATCT AAAATACACA AACAAATTAGA
 40 7751 ATCAGTAGTT TAACACATTA TACACTAAA AATTTTATAT TTACCTTACA
 7801 GCTTTAAATC TCTGTAGGTA GTTTGTCCAA TTATGTCACA CCACAGAAAGT
 7851 AAGGTTCCCTT CACAAAGATC CGGGACCAAA CGGGCCATCG TGCCTCCCCA
 45 7901 CTCCTGCAGT TCGGGGGCAT GGATGCGCGG ATAGCCGCTG CTGGTTTCT
 7951 GGATGCCGAC GGATTTGCAC TGCGCGTAGA ACTCCCGCAG GTCGTCCAGC
 8001 CTCAGGCAGC AGCTGAACCA ACTCGCGAGG GGATCGAGCC CGGGGTGGGC
 50 8051 GAAGAACTCC AGCATGAGAT CCCCCGGCTG GAGGATCATC CAGCCGGCGT
 8101 CCCGGAAAAC GATTCCGAAG CCCAACCTTT CATAGAAGGC GGCGGTGGAA
 8151 TCGAAATCTC GTGATGGCAG GTTGGCGTC GCTTGGTCGG TCATTTCAA
 55 8201 CCCCAGAGTC CCGCTCAGAA GAACTCGTCA AGAAGGCGAT AGAAGGCGAT
 8251 GCGCTGCAGA TCGGGAGCGG CGATACCGTA AAGCACGAGG AAGCGGTGAG
 8301 CCCATTCGCC GCGCAAGCTCT TCAGCAATAT CACGGTAGC CAAACGCTATG
 60 8351 TCCTGATAGC GGTCCGCCAC ACCCAGCCGG CCAACAGTCGA TGAATCCAGA
 8401 AAAGCGGCCA TTTTCCACCA TGATATTGG CAAGCAGGCA TCGCCATGGG

ES 2 341 341 T3

8451 TCACGACGAG ATCCTCGCCG TCGGGCATGC GCGCCPTGAG CCTGGCGAAC
8501 AGTTCGGCTG GCGCGAGCCC CTGATGCTCT TGTCCAGAT CATCCTGATC
8551 GACAAGACCG GCTTCCATCC GAGTACGTGC TCGCTCGATG CGATGTTTCG
8601 CTTGGTGGTC GAATGGGCAG GTAGCCGGAT CAAGCGTATG CAGCCGCCCG
8651 ATTGCATCAG CCATGATGGA TACTTTCTCG GCAGGAGCAA GGTGAGATGA
8701 CAGGAGATCC TCCCCCGCA CTTCCCCCAA TAGCAGCCAG TCCCTTCCCG
8751 CTTCAGTGCAC AACGTCGAGC ACAGCTGCGC AAGGAACGCC CGTCGTGGCC
8801 AGCCACGATA GCGCGCTGC CTCGTCCTGC AGTTCAATTCA GGGCACCGGA
8851 CAGGTCGGTC TTGACAAAAA GAACCGGGCG CCGCTCGCT GACAGCCGGA
8901 ACACGGCGGC ATCAGAGCAG CCGATTGTCT GTTGTGCCCA GTCATAGCCG
8951 AATAGCCTCT CCACCCAAGC GGCGGAGAA CCTGCCTGCA ATCCATCTTG
9001 TTCAATCATG CGAAACGATC CTCATCCTGT CTCTGATCA GATCTGATC
9051 CCCTGCGCCA TCAGATCCTT GCGGCAAGA AAGCCATCCA GTTTACTTGT
9101 CAGGGCTTCC CAACCTTACC AGAGGGCGCC CCAGCTGGCA ATTCCGGTTC
9151 GCTTGCTGTC CATAAAACCG CCCAGTCAG CTATGCCAT GTAAGCCAC
9201 TGCAAGCTAC CTGCTTCTC TTTGGCTTG CGTTTCCCT TGTCCAGATA
9251 GCGCAGTAGC TGACATTCA CCGGGGTCAAG CACCGTTCT GCGGACTGGC
9301 TTTCTACGTG TTCCGCTTCC TTTAGCAGCC CTTGCCTCC GAGTGCCTGC
9351 GGCAGCGTGA AG

30 SEQ ID NO: 31

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

35 EVQLVESGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYIHWVKQE PGQGLEWIGY
FNPYNHGKY NEKFKGRLATL TADKSISTAY MELSSLRSED TAVYYCARS
G
40 PYAWFDTWGQ GTTVTVSS

SEQ ID NO: 32

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

50 QVQLVESGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYIHWVKQE PGQGLEWIGY
FNPYNHGKY NEKFKGRLATL TADKSISTAY MELSSLRSED TAVYYCARS
G
55 PYAWFDTWGQ GTTVTVSS

SEQ ID NO: 33

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

60 GACATTCTGCTGACCCAGTCTCCAGCCACCCCTGCTCTGAGTCCAGGAGAAAGAGCCA
CTCTCTCTGCAAGGGCCAGTCAGAACATTGGCACAAGCATAAGTGGTATCAACAAAAA
CCAGGTCAAGGCTCCAAGGCTTCTATAAGGTCTTCTGAGTCTATCTCTGGGATCCC
TTCCAGGTTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACTCTTACCATCAGCAGTCTGG
65 AGCCTGAAGATTTGCAGTGTATTACTGTCAACAAAGTAATACCTGGCCATTACGTTC
GGCCAGGGACCAAGCTGAAATCAA

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 GGAGCCTGGTCAGGGCCTTGAATGGATTGGATATTTAATCCTTACAATCATGGTACTA
 AGTACAATGAGAAGTTCAAAGGCAGGCCACACTAACTGCAGACAAATCCATCAGCACA
 GCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGCCTCTGAGGACACTGCAGGTCTACTACTGTGCAA
15 GATCAGGACCTATGCCTGGTTGACACCTGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTC
 CTCA

20 SEQ ID NO: 35

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

25 CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCAGGAGCCGAAGTGAAAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAG
 GTGTCCTGCAAGGCCTCTGGATACACATTCACTAATTATATTATCCACTGGGTGAAGCA
 GGAGCCTGGTCAGGGCCTTGAATGGATTGGATATTTAATCCTTACAATCATGGTACTA
30 AGTACAATGAGAAGTTCAAAGGCAGGCCACACTAACTGCAGACAAATCCATCAGCACA
 GCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGCCTCTGAGGACACTGCAGGTCTACTACTGTGCAA
 GATCAGGACCTATGCCTGGTTGACACCTGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTC
35 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 TCCAATATTA GAAGATGTTG CTTTTACTCT
 101 TAAGTTGGTT CCTAGGAAAA ATAGTTAAAT ACTGTGACTT TAAAATGTGA

50

55

60

65

ES 2 341 341 T3

5 151 GAGGGTTTTC AAGTACTCAT TTTTTAAAT GTCCAAAATT TTTGTCAATC
201 AATTGAGGT CTTGTTGTG TAGAACTGAC ATTACTTAA GTTTAACCGA
251 GGAATGGGAG TGAGGCTCTC TCATAACCTA TTCAAGAACTG ACTTTTAACA
301 ATAATAAAATT AAGTTAAAAA TATTTTTAAA TGAATTGAGC AATGTTGAGT
351 TGGAGTCAAG ATGGCCGATC AGAACCCAGAA CACCTGCAGC AGCTGGCAGG
401 AAGCAGGTCA TGTGGCAAGG CTATTGGGG AAGGGAAAAT AAAACCACTA
451 GGTAAACTTG TAGCTGTGGT TTGAAGAACT GTTGTGAAA CACTCTGTCC
501 AGCCCCACCA AACCGAAAGT CCAGGCTGAG CAAAACACCA CCTGGGTAAT
551 TTGCATTCTC AAAATAAGTT GAGGATTCAAG CGAAAACCTGG AGAGGTCTC
601 TTTTAACCTA TTGAGTTCAA CCTTTTAATT TTAGCTTGAG TAGTTCTAGT
651 TTCCCCAAC TTAAGTTAT CGACTTCTAA AATGTATTTA GAACTCATT
701 TCAAAATTAG GTTATGTAAG AAATTGAAGG ACTTTAGTGT CTTTAATTTC
751 TAATATATTAG AAAAAACTTC TTAAAATTAC TCTATTATTC TTCCCTCTGA
801 TTATTGGCTC CCATTCAATT CTTTCCAAT ACCCGAAGCA TTTACAGTGA
851 CTTGTTCAT GATCTTTTT AGTTGTTGT TTGCCCCAAC TATTAAGACT
901 TTGACATTCT GGTCAAAACG CCTTCACAAA TCTTTTCAA GACCACTTTC
951 TGAGTATTCA TTTAGGAGA AATACTTTT TTTAAATGA ATGCAATTAT
1001 CTAGGACCTG CAGGCATGCT GTTTCTGTC TGCCCTAAC ATGCCCTGTG
1051 ATTATCCGCA AACAAACACAC CCAAGGGCAG AACTTTGTTA CTTAAACACC
1101 ATCCTGTTG CTTCTTCCT CAGGAACGTG GGCTGCACCA TCTGTCCTCA
1151 TCTCCCGCC ATCTGATGAG CAGTTGAAAT CTGGAACGTG CTCTGTTGTG
1201 TGCCTGCTGA ATAACCTCTA TCCCAGAGAG GCCAAAGTAC AGTGGAAAGGT
1251 GGATAACGCC CTCCAATCGG GTAACCTCCA GGAGAGTGTG ACAGAGCAGG
1301 ACAGCAAGGA CAGCACCTAC AGCCTCAGCA GCACCCCTGAC GCTGAGCAAA
1351 GCAGACTACG AGAAACACAA AGTCTACGCC TGCGAAGTCA CCCATCAGGG
1401 CCTGAGCTCG CCCGTACAA AGAGCTTCAA CAGGGGAGAG TGTTAGAGGG
1451 AGAAAGTCCCC CCACCTGCTC CTCAGTTCA GCCTGACCCC CTCCCATCCT
1501 TTGGCCTCTG ACCCTTTTC CACAGGGGAC CTACCCCTAT TGCGGTCTC
1551 CAGCTCATCT TTCACCTCAC CCCCCTCCTC CTCCCTGGCT TTAATTATGC
1601 TAATGTTGGA GGAGAATGAA TAAATAAGT GAACTTTGC ACCTGTGGTT
1651 TCTCTCTTTC CTCATTAAAT AATTATTATC TGTGTTTTA CCAACTACTC
1701 AATTGCTCTT ATAAGGGACT AAATATGTAG TCATCCTAAG GCGGGATATC
1751 GAGATCTGAA GCTGATCCAG ACATGATAAG ATACATTGAT GAGTTTGGAC
1801 AAACCCACAA TAGAAATGCAG TGAAAAAAAT GCTTTATTG TGAAATTGT
1851 GATGCTATTG CTTTATTGT AACCATTATA AGCTGCAATA AACAAAGTAA
1901 CAACACAAT TGCATTCAATT TTATGTTCA GGTCAGGGG GAGGTGTGGG
1951 AGGTTTTIA AAGCAAGTAA AACCTCTACA AATGTGGTAT GGCTGATTAT

ES 2 341 341 T3

2001	GATCTCTAGT CAAGGCACCA TACATCAAAT ATTCCCTTATT AACCCCTTAA
2051	CAAATTAAAA AGCTAAAGGT ACACAATTTC TGAGCATAGT TATTAATAGC
5 2101	AGACACTCTA TGCCTGTGTG GAGTAAGAAA AAACAGTATG TTATGATTAT
2151	AACTGTTATG CCTACTTATA AAGCTTACAG AATATTTTC CATAATTTC
10 2201	TTGTATAGCA GTGCAGCTTT TCCCTTGTC GTGTAATAG CAAAGCAAGC
2251	AAGAGTTCTA TTACTAAACA CAGCATGACT CAAAAAACTT AGCAATTCTG
2301	AAGGAAAAGTC CTTGGGGTCT TCTACCTTTC TCTTCTTTT TCGAGGAGTA
15 2351	GAATGTTGAG AGTCAGCAGT AGCCTCATCA TCACTAGATG GCATTTCTC
2401	TGAGCAAAAC AGGTTTCCT CATTAAAGGC ATTCCACAC TGCTCCATT
2451	CATCAGTTCC ATAGGTTGGA ATCTAAAATA CACAAACAAT TAGAATCAGT
2501	AGTTAACAC ATTATACACT TAAAAATTTC ATATTTACCT TAGAGCTTTA
20 2551	AATCTCTGTA GGTAGTTGT CCAATTATGT CACACCACAG AAGTAAGGTT
2601	CCTTCACAAA GATCCGGACC AAAGCGGCCA TCGTGCCTCC CCACTCCTGC
2651	AGTCGGGGG CATGGATGCG CGGATAGCCG CTGCTGGTT CCTGGATGCC
2701	GACGGATTTG CACTGCCGGT AGAACTCCGC GAGGTCGTCC AGCCTCAGGC
25 2751	AGCAGCTGAA CCAACTCGCG AGGGGATCGA GCATCCCCA TGGTCTTATA
2801	AAAATGCATA GCTTTAGGAG GGGAGCAGAG AACTTGAAAG CATCTCCTG
2851	TTAGTCTTTC TTCTCGTAGA CTTCAAACCTT ATACTTGATG CCTTTTCTCCT
30 2901	CCTGGACCTC AGAGAGGACG CCTGGGTATT CTGGGAGAAG TTTATATTTC
2951	CCCAAATCAA TTTCTGGAA AAACGTGTCA CTTTCAAATT CCTGCATGAT
3001	CCTTGTCACA AAGAGTCTGA GGTGGCCTGG TTGATTCTAG GCTTCCTGGT
35 3051	AAACAGAACT GCCTCCGACT ATCCAAACCA TGTCTACTTT ACTTGCCAAT
3101	TCCGGTTGTT CAATAAGTCT TAAGGCATCA TCCAAACTTT TGGCAAGAAA
3151	ATGAGCTCCT CGTGGTGGTT CTTTGAGTTC TCTACTGAGA ACTATATTAA
40 3201	TTCGTCTTT TAAAGGTGCA TTCTTCTCAG GAATGGAGAA CCAGGTTTTC
3251	CTACCCATAA TCACCAAGATT CTGTTTACCT TCCACTGAAG AGGTTGTGGT
3301	CATTCTTGG AAGTACTTGA ACTCGTTCCCT GAGCGGAGGC CAGGGCTCGCT
45 3351	CTCCGTTCTT GCCAATCCCC ATATTTGGG ACACGGCGAC GATGCAGTTC
3401	AATGGTCGAA CCATGATGGC AGCGGGGATA AAATCTTACCC AGCCTTCACG
3451	CTAGGATTGC CGTCAAGTTT GGGGGTACCG AGCTCGAATT AGCTTTTGC
50 3501	AAAAGCTAG GCCTCCAAA AAGCCTCTC ACTACTCTG GAATAGCTCA
3551	GAGGGCCGAG CGGGCCTCGG CCTCTGCATA AATAAAAAAA ATTAGTCAGC
3601	CATGGGGCGG AGAATGGCG GAACTGGCG GAGTTAGGGG CGGGATGGGC
3651	GGAGTTAGGG CGGGGACTAT GGTGCTGAC TAATGAGAT GCATGCTTGC
55 3701	CATACTTCTG CCTGCTGGGG AGCCTGGGG A CTTCCACAC CTGGTTGCTG
3751	ACTAATTGAG ATGCATGCTT TGCATACTTC TGCCCTGCTGG GGAGCCTGGG
60 3801	GACTTTCCAC ACCCTAACTG ACACACATTG CACAGCTGCC TCGCGCGTTT

ES 2 341 341 T3

3851	CGGTGATGAC GGTGAAAACC TCTGACACAT GCAGCTCCCG GAGACGGTCA
3901	CAGCTTGTCT GTAAGCGGAT GCGGGAGCA GACAAGCCCG TCAGGGCGCG
3951	TCAGCGGGTG TTGGCGGTG TCGGGGCGCA GCCATGACCC AGTCACGTAG
4001	CGATAGCGGA GTGTATACTG GCTTAACATAT GCGGCATCAG AGCAGATTGT
4051	ACTGAGAGTG CACCATATGC GGCGCATAT GCGGTGTGAA ATACOGCACA
4101	GATGCGTAAG GAGAAAATAC CGCATCAGGC GCTCTCCGC TTCTCGCTC
4151	ACTGACTCGC TGCGCTCGGT CGTTGGCTG CGCGAGCGG TATCAGCTCA
4201	CTCAAAGGCG GTAATACGGT TATCCACAGA ATCAGGGGAT AACGCAGGAA
4251	AGAACATGTG ACCAAAAGGC CAGCAAAAGG CCAGGAACCG TAAAAAGGCC
4301	GGTTGCTGG CGTTTTCCA TAGGCTCCGC CCCCCTGAAC AGCATCACAA
4351	AAATCGACGC TCAAGTCAGA GGTGGCGAAA CCCGACAGGA CTATAAAAGAT
4401	ACCAGGCCTT TCCCCCTGGA AGCTCCCTCG TGCGCTCTCC TGTTCCGACC
4451	CTGCCGCTTA CCGGATAACCT GTCCGCCTT CTCCCTTCGG GAAGCGTGGC
4501	GCTTCTCAT AGCTCACGCT GTAGGTATCT CAGTTGGTG TAGGTCGTTC
4551	GCTCCAAGCT GGGCTGTGTG CACGAACCCC CGGTTCAAGCC CGACCGCTGC
4601	GCCTTATCCG GTAACATATCG TCTTGAGTCC AACCCGGTAA GACACGACTT
4651	ATCGCCACTG GCAGCAGCCA CTGGTAACAG GATTAGCAGA GCGAGGTATG
4701	TAGGCGGTGC TACAGAGTTC TTGAAGTGGT GGCCTAACTA CGGCTACACT
4751	AGAAGGACAG TATTGGTAT CTGCGCTCTG CTGAAGCCAG TTACCTCGG
4801	AAAAAGAGTT GGTAGCTCTT GATCCGGCAA ACAAAACCACC GCTGGTAGCG
4851	GTGGTTTTTT TGTTGCAAG CAGCAGATTA CGCGCAGAAA AAAAGGATCT
4901	CAAGAAGATC CTTTGATCTT TTCTACGGGG TCTGACGCTC AGTGGAACGA
4951	AAACTCACGT TAAGGGATTT TGGTCATGAG ATTATCAAAA AGGATCTTCA
5001	CCTAGATCCT TTTAAATTAA AAATGAAGTT TTAAATCAAT CTAAAGTATA
5051	TATGAGTAAA CTTGGTCTGA CAGTTACCAA TGCTTAATCA GTGAGGCACC
5101	TATCTCAGCG ATCTGTCTAT TTCTTCATC CATACTTGCC TGACTCCCCG
5151	TCGTGTAGAT AACTACGATA CGGGAGGGCT TACCATCTGG CCCAGTGCT
5201	GCAATGATAC CGCGAGACCC ACGCTCACCG GCTCCAGATT TATCAGCAAT
5251	AAACCAGCCA GCGGAAGGG CCGAGCCAG AAGTGGTCCT GCAACTTTAT
5301	CCGCCTCCAT CCAGTCTATT AATTGTTGCC GGGAAAGCTAG ACTAAGTAGT
5351	TCGCCAGTTA ATAGTTGCCG CAACGTTGTT GCCATTGCTG CAGGCATCGT
5401	GGTGTACCGC TCGTCGTTTG GTATGGCTTC ATTCAAGCTCC GGTCCCCAAC
5451	GATCAAGGGCG AGTTACATGA TCCCCCATGT TGTGAAAAA AGCGGTTAGC
5501	TCCTTCGGTC CTCCGATCGT TGTCAGAACT AAGTTGGCCG CAGTGTATC
5551	ACTCATGGTT ATGGCAGCAC TGCATAATTG TCTTACTGTC ATGCCATCCG
5601	TAAGATGCTT TTCTGTGACT GGTGAGTACT CAACCAAGTC ATTCTGAGAA
5651	TAGTGTATGC GCGGACCGAG TTGCTCTTGC CGGGCGTCAA CACGGGATAAA

ES 2 341 341 T3

5	5701	TACCGCGCCA CATAGCAGAA CTTAAAAAGT GCTCATCATT GGAAAACGTT
	5751	CTTCGGGGCG AAAACTCTCA AGGATCTTAC CGCTGTTGAG ATCCAGTTCG
	5801	ATGTAACCCA CTCGTGCACC CAACTGATCT TCAGCATCTT TTACTTTCAC
	5851	CAGCGTTCTC GGGTGAGCAA AAACAGGAAG GCAAAATGCC GCAAAAAAGG
10	5901	GAATAAGGGC GACACGGAAA TGTTGAATAC TCATACTCTT CCTTTTCAA
	5951	TATTATTGAA GCATTTATCA GGGTTATTGT CTCACTGAGCG GATACATATT
	6001	TGAATGTATT TAGAAAAATA AACAAATAGG GGTCGGCGC ACATTTCCC
	6051	AAAAAGTGCC ACCTGACGTC TAAGAAAACCA TTATTATCAT GACATTAACC
15	6101	TATAAAAATA GGCGTATCAC GAGGCCCTTT CGTCTTCAGG AATTCAAGCTG
	6151	CTCGAGGAAG AGCTCAAACC CATGCTACTC TCTGGCTTGA TGGAAAGCAAC
	6201	GCTTCATAG CTGAGCTGTC ATAAATAATA AAGAGATTTT TTTATTAATA
20	6251	TTGAAAAGAT GGGTTATTAA TGTAAGACTC TGTCTTCATT TTAAAAACCA
	6301	CACCTTCAG TAGTATTCTG TIACTGTTCT GGCAATCACT GTGATCAAGA
	6351	AGCTACACGG TGAGTTGTGC TTCTCAGTCC TAAGGGATAC ATCTACAAGA
25	6401	GGCTCCCATA CTCGAAGCTC AGGAAACATT GTAGAAAAGG AGGCAAAAGA
	6451	CTGACAGAGC CAGAGGACCA AGAAATTGTG TGTGAGGTTG TGTCTCCTAC
	6501	TAACAATATA AGCAATATCT ATAAATTGTT GATATCAIAGG CTACTAAAAT
30	6551	GTGAGTTGAA CGAGGAGGAC ACAAAATGAAC ATGACAATCA GAATGAGGCC
	6601	TCTCACCTGC AAAAAACACT ATAGAGAACG AGATAAAGCT GTCAGCAGAA
	6651	GAGGCCGCACC TCCCTATAGA AGAAGCCTAC CAGGTTGAT ATATCAGCCT
35	6701	TGAAAACCTA CATAGTATT ACATTATATC GAGTCTATGA GACATATTTA
	6751	GTAATGCATA TGTATGTGTG TGTGTGCATG TATGTGTGTA AATACATATG
	6801	TTCACTAGAAA AATGTGTAAA AAGAGATCAT GAATTAAAGA GAGAACTGGG
40	6851	ACAATTTTT TCAGGGAGTT GTAATCAGGA AAGTTAAGGG AAAAATGTTG
	6901	TAATTAAAAT TCAGGCTCAG AAACAAACAA AGGAAAAGAA AAAAAAACAA
	6951	CAACAACAAAC AAAAAAACAA AACAAAGGAG AAGCTGTATG GCCACAATAG
45	7001	CATCTACAGC TAACTGTGAA AGGATAATGG AACAAAGTTAT GTACTGCCTA
	7051	GAGCAGTATG ATGCCAAAT CATCTCGACA TGGAGGAAAA TAGACAAAG
	7101	ACACTCTACA TAGACTATGA TAGAAATCAA AATAAGGTGT AAGACATAGA
	7151	ACATTAGTT TGTTTGTGT TCAAAGAGAC TCACATTCCC ACAAAAAAAT
50	7201	CTGTGGGATT TTACAGGTCT GCAATAAGCT GCTGACCTGA TGATTTCTGC
	7251	AGCTGTGCCT ACCCTTGCT GATTTGCATG TACCCAAAGC ATAGCTTACT
	7301	GACATGAGGA TTTCTTCATA GTCAAGGTAC ACCCTTGCT GGAGTCAGAA
55	7351	TCACACTGAT CACACACAGT CATGAGTGTG CTCACTCAGG TCCTGGCGTT
	7401	GCTGCTGCTG TGGCTTACAG GTAATGAAGA CAGCACTAGA ATTTTATTGA
	7451	GCTTCCTGTA CACTGTGCTG CTGTCTCTG TGAAAATTCT CTTGTGAATT
60	7501	AATCATGTGG GGATCTGTT TCAATTTC AATPGTAGGT ACGCGTTGTG

ES 2 341 341 T3

5 7551 ACATTCTGCT GACCCAGTCT CCAGCCACCC TGTCTCTGAG TCCAGGAGAA
 7601 AGAGCCACTC TCTCCTGCAG GGCCAGTCAG AACATTGGCA CAAGCATAACA
 7651 GTGGTATCAA CAAAAAACCAG GTCAGGCCTCC AAGGCTTCTC ATAAGGTCTT
 7701 CTTCTGAGTC TATCTCTGGG ATCCCTTCCA GGTTTAGTGG CAGTGGATCA
 7751 GGGACAGATT TTACTCTTAC CATCAGCAGT CTGGAGCCTG AAGATTTGC
 10 7801 AGTGTATTAC TGTCAACAAA GTAATACCTG GCCATTACCG TTGGGCCAGG
 7851 GGACCAAGCT TGAAATCAA CGTAAGTAGA ATCCAAAGTC TCTTTCTTCC
 7901 GTTGTCTATG TCTGTGGCTT CTATGTCTAA AAATGATGTA TAAAAATCTTA
 15 7951 CTCTGAAACC AGATTCTGGC ACTCTCCAAG GCAAAGATAC AGAGTAACTC
 8001 CGTAAGCAA GCTGGGAATA GGCTAGACAT GTTCTCTGGA GAATGAATGC
 8051 CAGTGTAAATA ATTAACACAA GTGATAGTTT CAGAAATGCT CTAGTT

20

SEQ ID NO: 37

25 Secuencia de nucleótido de la expresión del vector HCVHEN73DSp20

30 1 ctagagaggt ctgggtggagc ctgcaaaagt ccagcttca aaggaacaca gaagtatgtg
 61 tatggaatat tagaagatgt tgctttact ctaagttgg ttcttaggaa aatagttaa
 121 atactgtgac tttaaaatgt gagagggttt tcaagtactc atttttttaa atgtccaaaa
 181 ttttgc当地 tcaatttgaq gtcttgggg ttagaaactg acattactt aagttttaacc
 241 gaggaatggg agtgaggctc tctcataccc tattcagaac tgacttttaa caataataaa
 301 ttaagtttaa aatattttta aatgaattga gcaatgttga gttggagtca agatggccga
 361 tcagaaccag aacacccgtca gcaatggca ggaagcaggt catgtggcaaa ggctatttgg
 421 ggaaggaaaa ataaaaaccac tagttaaact ttagtgcgtg gtttgaagaa gtgggtttga
 481 aacactctgt ccagccccac caaaccgaaa gtcaggctg agcaaaacac cacctgggta
 541 attgcattt ctaaaataag ttgaggattc agccgaaaact ggagaggctc ttttttact
 601 tattgatgtc aacccctttaa ttttagcttgc agtagtttca gtttccccaa acttaagttt
 661 atcgacttct aaaaatgtatt taagcttctt gggccaggcc aggcctgacc ttgggtttgg
 721 ggcaggagg gggctaaggt gaggcagggtg ggcctggccca ggtgcacaccc caatgcaccat
 781 gagcccaagac actggacgtt gaaacctggcg gacagtttaag aacccagggg cctctggcc
 841 ctggcccccag ctctgtccccca caccggggtc acatggcacc acctcttcttgc cagccctccac
 901 caagggccca tccgttccccc cccctggcacc ctcttccaaag agcacctctg ggggcacagc
 961 ggcctgggc tgcctgggtca aggactactt ccccgaaaccg gtgacgggtgt cgtggaaactc
 1021 aggcccccgt accagcggcg tgcacacott cccgggtgtc ctacagtctt caggactcttca
 1081 ctccttcaggc agcgtgggtga cccgtccctc cagcagtttg ggcaccacaga cttacatctg
 1141 caacgtgaat cacaagccca gcaacacccaa ggtggacaag agagttggg agaggccagc
 1201 acagggaggg aggggtgtctg ctggaaagcca ggctcaggcgc tccctgcctgg aacgcattcccg
 1261 gctatgcagt cccagtcagg ggcagcaagg caggccccgt ctgccttcc acocggaggc
 1321 ctctgccccgc cccactcatg ctcaaggaga gggctttctg gcttttccc caggtctgg
 1381 gcaggcacag gctaggtgcc cctaaaccag gcccgtgcaca caaaggggca ggtgctgggc
 1441 tcagacccat caagagccat atccgggagg accctgcccc tgcacctaagc ccacccaaaa

65

ES 2 341 341 T3

1501 ggccaaactc tccactccct cagctggac accttcttc ctccccagatt ccagtaactc
 1561 ccaatcttt ctctgcagag cccaaatctt gtgacaaaac tccacacatgc ccaccgtgcc
 1621 caggtaagcc agcccaggcc tccgcctcca gtcacaggcg ggacagggtgc cctagatgt
 1681 cctgcaccca gggacaggcc ccagccgggt gtcacacgt ccacccatcttcc
 1741 gcacctgaac tccctggggg accgtcaagtc tcccttccccc cccaaaaacc caaggacacc
 1801 ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtgggg tggacgttag ccacgaagac
 1861 cctgagggtca agttcaactg gtacgtggac gggtgtggagg tgcataatgc caagacaaag
 1921 ccggggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtggtca gcgtccctcac cgtccctgcac
 1981 caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaagggtct ccaacaaagc cctcccaagcc
 2041 cccatcgaga aaaccatctc czaagccaaa gggtggaccc gtgggggtgcg agggccacat
 2101 ggacagagggc cggctcgcc caccctctgc cctgagagtg accgtgtac caacctctgt
 2161 ccctacaggg cagccccagag aaccacagt gtacacccctg ccccaatccc gggaggagat
 2221 gaccaagaac caggteagcc tgcacctgcct ggtcaaaggc ttatataccca ggcacatcg
 2281 cgtggagttgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctccctgtgt
 2341 ggactccgac ggctcccttct tccctctatag caagctcacc gtggacaaga gcagggtggca
 2401 gcaggggaac gtcttctat gtcctgtat gcatgaggct ctgcacaaacc actacacgc
 2461 gaagacccctc tccctgtccc cgggtaaatg agtgcacgg cccggcaagcc cccgcctcccc
 2521 gggctctcgc ggtegcacga ggtatgtttgg caacgtacccc gtctacatac ttcggaggca
 2581 cccagcatgg aaataaaagca cccaccactg cccctggccccc ctgcggagact gtgtatggtcc
 2641 ttccacggg tccggccagat ttcgtggcatg gagtggcatg agggggggcag aggggggtcccc
 2701 actgtccccca cactggccca ggctgtgcag gtgtgcctgg ggcgcctagg gtggggctca
 2761 gccaggggtt gcccctggca ggggtgggggaa ttgcctggcgg tggccctccccc tccagcagca
 2821 gctgccttgg gctggccac gagaagccctt aggacccctt gggacacac acacacccccc
 2881 tgcctctgtt ggagactgtc ctgcctgtt agcgcctgtt ctcctgcaccc cgtatgcaccc
 2941 tccggggcat gcccgttcca tgcgcgttgg gagacggccctt cccctcacccca tctacccca
 3001 cggcaactaac cccctggcagc ctgcacccac cttgcaccccg catggggaca caaccgactc
 3061 cggggacatg cacttcggg cccctgtggag ggacttgggtc agatgcaccc acacacactc
 3121 agccccagacc cgttcaacaa accccccactt gaggttgggtc gagcggggaggt gggcccgag
 3181 cctgcctcgg cccgtcaggga ggactccccc gtcactcga aggagggtgc accatttcag
 3241 ctttggtagc ttttcttctt cttttaaattt tttttaaaatgt cattaaatgtt tttttagtgg
 3301 ttttttgttga tgacaataaaa atatcccttt tttttaaaatgtt acttgcgtat gggagccggcc
 3361 ttcctgtgtc caacgcgcctc ctgcctccccc tggaaagcac ggtcaggagg agggtgggtcc
 3421 agctgcaccc cgggggttcc ctgcactcgc ccccccgcctc ctgcacccac acgcattgc
 3481 cggccggacc tccctggccc ctgcactac atggacccctt gggcttctc ctctttctca
 3541 catggatgtca gtttcttctc ctgcgtggca cgggtgtgtcc tgcctggtc actctgcgggg
 3601 ggacaggggcc tccagggaaa gtcgggtcga ggttggggcgc tggctcaggcc tggccaggca
 3661 gagccacagg gagggcccttc cagaacccaaac catggccgcga agcggagaggt ggggtgtcaga
 3721 tccagacatg ataagataaca ttgtatgttggacaaa accaactagaa tgcagtggaaa
 3781 aaaatgtttt atttggaaa ttgtatgttgc tattgtttta ttgttaaccca ttataagctg
 3841 caataaaacaa gtttacaaaca acaattgtcat tcatttatg tttcagggttc agggggaggt
 3901 gtggggaggtt ttttaaagca agtaaaacat ctacaaatgt ggtatgggtt attatgtatct

60

65

ES 2 341 341 T3

3961 ctagtcaagg cactatacat caaatattcc ttatthaaccc ctttacaaat taaaaagcta
 4021 aaggcacaca atttttgaggc atagtttata atagcagaca ctctatgcgt gtgtggagta
 4081 agaaaaaaaca gtatgtttagt attataactg ttatgcctac ttataaaggt tacagaatat
 4141 ttttccataa ttttcttgc tagcagtgcgac gctttttcct ttgtgggtgtaaatagcaag
 4201 caagcaagag ttcttattact aaacacagca tgactcaaaa aacttagcaa ttctgaagga
 4261 aagtcccttgg ggtcttctac ctttccttc tttttggag gagtagaaatg ttgagagtca
 4321 gcaatgttgcct catcatcaact agatggcatt tcttcgtgc aaaaacagggtt ttcttcattaa
 4381 aaggcattcc accactgttc ccattcatca gttccatagg ttggaaatcta aaatacacaca
 4441 acaatttagaa tcagtagttt aacacattat acacttaaaa attttatatt tacatttagag
 4501 cttaaatct ctgttaggttag tttgtccat tatgtcacac cacagaagta aggttccttc
 4561 acaaaagatcc ggaccaaaagc ggccatcggt cctccccactt cctgcgttc gggggcatgg
 4621 atgcgcggat agccgtgtgtt ggtttcttgg atgcgcacgg atttgcactg ccggtagaaac
 4681 tccgcgaggt cgtccagcct caggcagcag ctgaaccaac tccgcgaggggg atcgagcccc
 4741 gggtggggcga agaactccag catgagatcc cccgcgtggc ggtatcatcca gccggcgtcc
 4801 cggaaaaacga ttccgaagcc caacctttca tagaaggcgg cggtggaaatc gaaatctcg
 4861 gatggcaggt tgggcgtcgc ttgggtcggtc atttcgaacc ccagagtccc gtcagaaga
 4921 actcgtaaag aaggcgatag aaggcgatgc gctgagaatc gggagcggcg ataccgtaaa
 4981 gcaacgaggaa gccgtcagcc catcgccgc caagcttttc agcaatataca cgggttagcca
 5041 acgctatgtc ctgatagcgg tccgcacac ccagccggcc acagtcgtatc aatccagaaa
 5101 agcggccatt ttccaccatg atattcgca agcaggcata gccatgggtc acgacgagat
 5161 cctcgccgtc gggcatgcgc gcttgcgc tggcgaacag ttcgggtggc gcgagcccc
 5221 gatgttccgcgtc gtcagatca ttcgtatcgca caagacggc ttcatccgc gtaatgtgtc
 5281 gtcgtatgcg atgtttcgat tgggtggcga atgggcaggt agccggatca agcgatgc
 5341 gcccgcgtatc tgcattcgcgat atgatggata cttttcgcgc aggagcaagg tgagatgaca
 5401 ggagatcccgccccggcaact tcgccccataa gcagccagtc cttcccgatc tcagtgacaa
 5461 cgtcgagcac agctcgccaa ggaacggcccg tggcgtccag ccacgtatgc cgcgtgtgc
 5521 cgttcgtcag ttcattcagg gcacccggaca ggtcggtttt gacaaaaaaga accggggcc
 5581 cctgcgtgcgatc cagccggaaac acggcggtatc cagagcagcc gattgtgtgt tggcccgatc
 5641 catagccgaa tgcgttcgc acccaagegg cccggagaacc tgcgtgcataat ccattttgtt
 5701 caatcatgcg aaacgtatctt ctcgtgtat ttcgtatcgatc ttttgcgttcgc
 5761 agatcccttgg cggcaagaaaa gccatccgtt ttactttgcgatc gggcttccca accttaccag
 5821 agggcgcccccc agctggcaat tccgggttcgc ttgcgtgcataa taaaacccgc cagtctatgt
 5881 atcgccatgt aagcccaactg caagctacct gtttttcgtt tgcgttcgc tttttcccttg
 5941 tccagatage ccagtagtcg acatccatcc ggggttcagca ccgttttcgc ggactggcc
 6001 ttcacgtgtt ccgttccat ttcgtatccat tgcgttcgc gttgcgtgcgg cagcgatgc
 6061 ctttttgcataa aagccctggc ctcacaaaaa gcttccttcac ttcgtatccat ttcgtatgc
 6121 ggcggaggcg gcctcggtatc ctcgtatccat aaaaaaaaaat agtcagccat ggggggggaga
 6181 atggggcgaaat cttggggggggat ttagggggggat gatggggggat gtttagggggggat ggcactatgg
 6241 tgcgtactaa ttgcgtatcgc tgcgttcgc ttcgtatccat gtcgtggggggat cttggggggat
 6301 tccacacccatc gttgcgtatcgc aatttgcgtatcgc ttcgtatccat ttcgtatccat
 6361 gcttggggac ttccacaccc cttactgaca cacatccac agctgcgttcgc cgcgttttcgg

60

65

ES 2 341 341 T3

ES 2 341 341 T3

ES 2 341 341 T3

SEQ ID NO: 38

Secuencia de nucleótido de la expresión del vector HCVHQN73DSp20

5
1 CTAGAGAGGT CTGGTGGAGC CTGCAAAAGT CCACCTTC AAGGAACACA GAACTATGTG
61 TATGGAATAT TAGAAGATGT TGCTTTACT CTTAAGTGG TTCCTAGGAA AATAGTTAA
121 ATACTGTGAC TTTAAAATGT GAGAGGGTT TCAAGTACTC ATTTTTTAA ATGTCGAA
10 181 TTTTGTCAA TCAATTGAG GTCTTGTG TGTAAGAACTG ACATTTACTA AAGTTAAC
241 GAGGAATGGG AGTGAGGCTC TCTCATACCC TATTCAGAAC TGACTTTAA CAAATAAAA
301 TTAAGTTAA AATATTTAA AATGAATTGA GCAATGTGAG GTTGGACTCA AGATGCCGA
361 TCAGAACCAAG AACACCTGCA GCAGCTGCCA GCAAGCAGGT CATGTGGCAA CGCTATTTGG
421 GGAAGGGAAA ATAAAACAC TAGGTAACG TGTAGCTGTG GTTGAAGAA GTGGTTTGA
481 AACACTCTGT CCAGCCCCAC CAAACCGAA GTCCAGGCTG AGCAAAACAC CACCTGGTA
541 ATTTGATTT CTAAAATAAG TTGAGGATTC AGCCGAAACT CGAGAGGTCC TCTTTAACT
20 601 TATTGAGTTC AACCTTTAA TTTTAGCTTG AGTAGTTCTA GTTCCCCAA ACTTAAGTT
661 ATCGACTTCT AAAATGTATT TAAGCTTCTC GGGGCAGGCC AGGCCTGACC TTGGCTTGG
721 GGCAGGGAGG GGCCTAAGGT GAGGCAGGTG GGCAGGCCA GGTGCACACC CAATGCCAT
781 GAGCCCAGAC ACTGGACGCT GAAACCTGGG GACAGTTAACG AACCCAGGGG CCTCTGGCC
841 CTGGGCCAG CTCTGTCCCCA CACCGGGTC ACATGGCACC ACCTCTCTTG CAGCCTCCAC
901 CAAGGGCCCA TCGGTCTTCC CCCTGGCACC CTCCCTCCAAG AGCACCTCTG GGGGCACAGC
961 GGCCTGGGC TGCCTGGTCA AGGACTACTT CCCCCAACCG GTGACGGTGT CCTGGAACTC
1021 AGGCGCCCTG ACCAGCGGGG TGCACACCTT CCGGGCTGTG CTACAGTCCT CAGGACTCTA
1081 CTCCCTCAGC AGCGTGGTGA CGTGCCCCC CAGCAGCTTG GGCACCCAGA CCTACATCTG
1141 CAACGTGAAT CACAAGCCCCA GCAACACCAA GGTGACAAAG AGAGTTGGTG AGAGGCCAGC
1201 ACAGGGAGGG AGGGTGTCTG CTGGAAACCA GGCTCAGGGC TCCCTGCTTGG ACCGATCCCC
1261 GCTATGCACT CCCAGTCCAG GGCAGCAAG CAGGGCCCGT CTGCCTCTTC ACCCGGAGGC
1321 CTCTGCCCGC CCCACTCATG CTCAGGGAGA GGGTCTTCTG GCTTTTCCCG CAGGCTCTGG
1381 GCAGGCACAG GCTAGGTGCC CCTAACCCAG GCCCTGCACA CAAAGGGGCA GGIGCTGGGC
1441 TCAGACTTSC CAAGAGCCAT ATCCGGGAGG ACCCTGCCCC TGACCTAACG CCACCCAAA
40 1501 GGCCAAACTC TCCACTCCCCP CAGCTGGAC ACCCTCTCTC CTCCCAGATT CCAGTAACTC
1561 CCAATCTTCT CTCTGGAGAG CCCAAATCTT GTGACAAAAC TCACACATGC CCACCGTGCC
1621 CAGGTAAGCC AGCCCAGGCC TCGCCCTCCA GCTCAAGGCG GGACAGGTGC CCTAGAGTAG
1681 CCTGCATCCA GGGACAGGCC CCAGGGGGT GCTGACACGT CCACCTCCAT CTCTTCCCTCA
1741 GCACCTGAAC TCCTGGGGGG ACCGTCAGTC TTCTCTTCC CCCCCAAACCC CAAGGACACC
1801 CTCATGATCT CCCCCAACCC TGAGGTCACTA TGCGTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC
1861 CCTGAGGTCA AGTTCAACTG CTACGTGGAC GGCCTGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG
50 1921 CCGGGGGAGG AGCACTACAA CAGCACGTAC CGTGTGGTCA GCGTCCTCAC CGTCCCTGCC
1981 CAGGACTGGC TGAATGGCAA GGAGTACAAG TGCAAGGTCT CCAACAAAGC CCTCCCCAGCC

55

60

65

ES 2 341 341 T3

2041	CCCATCGAGA AAACCATCTC CAAAGCCAAA GTGGGGACCC GTGGGGTGC GAGGGCACAT
2101	GGACAGAGGC CGGCTCGGCC CACCCCTCTGC CCTGAGAGTG ACCGCTGTAC CAACCTCTGT
2161	CCCTACAGGG CAGCCCCGAG AACCACAGGT GTACACCCCTG CCCCCATCCC GGGAGGAGAT
2221	GACCAAGAAC CAGGTCAAGCC TGACCTGCCT GGTCAAAGGC TTCTATCCCA GCGACATCGC
2281	CCTGGAGTGG GAGAGCAATG GGCAGCCCCA GAAACAACTAC AAGACCACGC CTCCCGTGT
2341	GGACTCCGAC GGCTCCCTCT TCCCTCTATAG CAAGCTCACC GTGGACAAGA GCAGGTGGCA
2401	CGAGGGAAC GTCTTCTCAT GCTCCGTGAT CCATGAGGCT CTGCACAAACC ACTACACGCA
2461	GAAGAGCCTC TCCCTGTCCC CGGGTAAATG AGTGGGACGG CGGGCAAGGC CCGCTCCCC
2521	GGGCTCTCGC GGTGGCACGA GGATGCTTGG CACGTACCCC GTCTACATAC TTCCCCAGGCA
2581	CCCAGCATGG AATAAAGCA CCCACCACTG CCCTGGGGCC CTGGAGAGACT GTGATGGTT
2641	TTTCCACGGG TCAGGCCCCAG TCTGAGGCCT GAGTGGCATG AGGGAGGCAG AGCGGGTCCC
2701	ACTGTCCCCA CACTGGGCCA GGCTGTGCAG GTGTCCTCTGC CGCGCTTAGG GTGGGGCTCA
2761	CGCAGGGGCT CGCCTCGGCA GGGTGGGGGA TTTGCCAGGG TGGCCCTCCC TCCAGCAGCA
2821	GCTGCCCTGG GCTGGGCCAC GAGAAGCCCT AGGAGCCCT GGGGACAGAC ACACACCCCC
2881	TGCCTCTGTA GGAGACTGTC CTGTCCTGTG AGCGCCCTGT CCTCCGACCC CGATGCCCAC
2941	TCGGGGGCAT GCCTAGTCCA TGGCGCTAGG GACAGGCCCT CGCTCACCCA TCTACCCCCA
3001	CGGCACTAAC CCCTGGCAGC CCTGCCAGC CTCGCACCCG CATGGGGACA CAACCGACTC
3061	CGGGGACATG CACTCTCGGG CGCTGTGGAG GGACTGGTGC AGATGCCAC ACACACACTC
3121	AGCCCCAGACC CGTTCAACAA ACCCCGCACT GAGGTTGGTC GAGCGGGAGT CGGGCCAGAG
3181	CCTGCCTCGG CGTCAGGGG GGACTCCCGG GCTCACTGGA AGGAGGTGCC ACCATTTCA
3241	CTTGGTAGC TTTCTCTTCTT CTTTAAATT TTCTAAAGCT CATTAAATTGT CTTTGATGTT
3301	TCTTTGTGA TGACAATAAA ATATCCTTT TAAGTCTTGT ACTTCGTGAT GGGAGCCGCC
3361	TTCCCTGTGC CACGCCCTC CTGCCCCCGG TGGGAACACAC GGTCAAGGAGC AGGCTGGTCC
3421	AGCTGCACCT CGGGGGCTCC CTGCACTCGC CCCCCCGCTC CTGCAGCCAC AGGCATTGCC
3481	CGAGCCACCC TCCCTGGCCC CTGCACTAC ATGGACCCCT GGGGCTCTC CTCTTTCTA
3541	CATGGATGCA GTTTCTCCCTC CTGCTGGCA CGGTGCTGCC TGGCCCTGGTC ACTCTGGGG
3601	GGACAGGGCC TCCAGGGAAA GCTGGTCGA GGCTGGGAGC TGGCTCAGGC TGGCCAGGCA
3661	GAGCCACAGG GAGGGCCTTC CAGAACCAAC CATGCTCCGA AGCGAGAGGT GGGTGTCA
3721	TCCAGACATG ATAAGATACA TTGATGAGTT TGGACAAACC ACAACTAGAA TCCAGTGAAA
3781	AAATGCTTT ATTTGTAAA TTGATGATGC TATTGCTTTA TTTGTAACCA TTATAAGCTG
3841	CAATAAACAA GTTAAACAACA ACAATTGCAT TCATTTATG TTTCAGGTTC AGGGGGAGGT
3901	GTGGGAGGTT TTTAAAGCA AGTAAACCT CTACAAATGT GGATGCGTG ATTATGATCT
3961	CTAGTCAGG CACTATACAT CAAATATTCC TTATTAACCC CTTTACAAAT TAAAGCTA
4021	AAGGTACACA ATTTTGAGC ATAGTTATTA ATAGCAGACA CTCTATGCC GTGTGGAGTA
4081	AGAAAAAAACA GTATGTTATG ATTATAACTG TTATGCCAC TTATAAAGGT TACGAAATAT
4141	TTTCCATAA TTTCTCTGTA TAGCAGTGCA GCTTTTCCCT TTGTGGTGTAA TATAGCAAAG
4201	CAAGCAAGAG TTCTATTACT AAACACAGCA TGACTCAAAA AACTTAGCAA TTCTGAAGGA
4261	AAGTCCTGG GGTCTCTAC CTTTCTCTTC TTTTTGGAG GAGTAGAATG TTCAAGACTCA
4321	GCAGTAGCCT CATCATCACT AGATGGCATT TCTCTGAGC AAAACAGGTT TTCCCTCATTA
4381	AAGGCATTCC ACCACTGCTC CCATTCATCA GTTCCATAGG TTGGAATCTA AAATACACAA
4441	ACAATTAGAA TCAGTAGTTT AACACATTAT ACACCTAAAA ATTTTATATT TACCTTAGAG

60

65

ES 2 341 341 T3

4501	CTTTAAATCT CTGTAGGTAG TTTGTCCAAT TATGTCACAC CACAGAAGTA AGGTTCTTC
4561	ACAAAGATCC GCACCAAAGC GGCCATCGTGC CCTCCCCACT CCTGCAGTTC GGGGGCATGG
4621	ATGCGGGAT AGCCGCTGCT GGTTTCTTGG ATGCCGACGG ATTTGCACTG CGCGTAGAAC
5 4681	TCCCGCAGGT CGTCCAGCCT CAGGCAGCAG CTGAACCAAC TCGCGAGGGG ATCGAGCCCG
4741	GGGTGGGCGA AGAACTCCAG CATGAGATCC CCGCGCTGGA GGATCATCCA GCGGGCGTCC
4801	CGGAAACCA TTCCGAAGCC CAACCTTTCAGAAGGGG CGGTGGAATC GAAATCTCGT
10 4861	GATGCCAGGT TGGCGTCGC TTGGTGGTC ATTTGAAACC CCAGAGTCCC GCTCAGAAGA
4921	ACTCGTCAAG AAGGCAGATAG AAGGCAGATGC GCTCGAATC GGGAGCGGGG ATACCGTAAA
4981	GCACGGAGGA GCGGTCAAGCC CATTGCGCGC CAAGCTTTCAGCAATATCA CGGGTAGCCA
15 5041	ACGCTATGTC CTGATAGCGG TCCGCCACAC CCAGCCGGCC ACAGTCGATG AATCCAGAAA
5101	AGCGGCCATT TTCCACCATG ATATTCGGCA AGCAGGCATC CCCATGGGTC ACCGACGAGAT
5161	CCTCGCCGTC GGGCATGCGC GCCTTGAGCC TGGCGAACAG TTCCGCTGGC GCGAGGCCCT
5221	GATGCTCTTC GTCCAGATCA TCCTGATGCA CAAGACCGGC TTCCATCCGA GTACGTGCTC
20 5281	GCTCGATGCG ATGTTTGGT TGGTGGTCGA ATGGCGAGGT AGCCGGATCA AGCGTATGCA
5341	CCCGCCGCAT TGCATCAGCC ATGATGGATA CTTTCTGGC AGGAGCAAGG TGAGATGACA
5401	GGAGATCTG CCCCCGGCACT TCGCCCAATA GCAGCCAGTC CCTTCCCGCT TCAGTGACAA
5461	CGTCGAGCAC AGCTGCGCAA GGAACGCCCG TCGTGGCCAG CCACGATAGC CGCGCTGCGCT
25 5521	CGTCCCTGGAG TTCAATTCAAG GCACCGGACA GGTGGTCTT GACAAAAAGA ACCGGGGCGCC
5581	CCTGGCTGAA CAGCCGGAC ACGGCGCAT CAGAGCAGCC GATTGTCTGT TGTGCCCCAGT
5641	CATAGCCGAA TAGCCTCTCC ACCCAAGCGG CCGGAGAACCC TGCCTGCAAT CCATCTTGT
5701	CAATCATGCG AACCGATCCT CATTCTGTCT CTGATCAGA TCTTGATCCC CTGCCGCATC
30 5761	AGATCTTGG CCGCAAGAAA GCATCCAGT TIACTTGTCA GGGCTTCCCA ACCTTACCRG
5821	AGGGCGCCCC AGCTGGCAAT TCGGGTTCGC TTGCTGTCCA TAAACCGGCC CAGTCTAGCT
5881	ATCGCCATGT AAGCCCACTG CAAGCTACCT GCTTCTCTT TGCGCTTGCG TTTCCCTTG
5941	TCCAGATAGC CCAGTAGCTG ACATTGATCC GGGGTCAAGCA CGTCTCTGC GGAATGGCTT
35 6001	TCTACGTGTT CCGCTTCCCT TAGCAGCCCT TGGCCCTGGA GTGCTTGCAG CAGCGTGAAG
6061	CTTTTGCAA AAGCCTAGGC CTCCAAAAAA GCCTCTCAC TACTTCTGGA ATAGCTCAGA
6121	GGCCGAGGCG GCCTCGGCCT CTGCATAAAT AAAAATAGT AGTCAGGCAT GGGGGCGAGA
6181	ATGGGGCGAA CTGGGGGGAG TTAGGGGGGG GATGGCGGA CTTAGGGGGG GGAATATGGT
40 6241	TGCTGACTAA TTGAGATGCA TGCCTTGCAT ACTTCTGCCT GCTGGGGAGC CTGGGGACTT
6301	TCCACACCTG GTTGCTGACT AATTGAGATG CATGCTTGC ATACTTCTGC CTGCTGGGGCA
6361	GCCTGGGGAC TTTCCACACCC CTAACTGACA CACATCCAC AGCTGCCCTG CGCGTTTOGG
45 6421	TGATGACGGT GAAAACCTCT GACACATGCA GCTCCGGAG ACGGTCACAG CTTGTCTGTA
6481	AGCGGATGCC GGGAGCAGAC AAGCCCGTCA GGGCGCGTCA GGGGGTGTTC GCGGGTGTGCG
6541	GGGGCGAGCC ATGACCCAGT CACGTAGGCA TAGGGAGTG TATACTGGCT TAACTATGCG
6601	GCATCAGAGC AGATTTGACT GAGACTGCAC CATATGCCGT GTGAAATACC GCACAGATGC
50 6661	GTAAGGAGAA AATACCGCAT CAGGCCTCT TCGCTTCCCT CGCTCACTGA CTCGCTGCC
6721	TCGGTCGTTG GGCTGCGCGAG AGCGGTATCA GCTCACTCAA AGGGCGTAAT ACGGTTATCC
6781	ACAGAACGAG GGGATAACGC AGGAAAGAAC ATGTGAGCAA AAGGCCAGCA AAAGGCCAGG
6841	AACCGTAAAA AGGCCCGTT GCTGGCGTT TTCCATAGGC TCCGGCCCCC TGACGAGCAT
55 6901	CACAAAAATC GACGCTCAAG TCAGAGGTGG CGAACCCGA CAGGACTATA AAGATACCAAG

ES 2 341 341 T3

6961	GGGTTTCCCC CTGGAAAGCTC CCTCGTGCAGC TCTCCGTGTC CGACCCGTGCC GCTTACCGGA
7021	TACCTGTCCG CCTTTCTCCC TTGGGAAGC GTGGCGCTTT CTCATAAGCTC ACGCTGTAGG
7081	TATTCAGTT CGGTGTAGGT CGTTGCTCC AAGCTGGGCT GTGTGACCGA ACCCCCCGTT
7141	CAGCCCCACC GCTGCGCTT ATCCGGTAAC TATCGTCTTG AGTCCAACCC GGTAAGACAC
7201	GACTTATCGC CACTGGCAGC AGCCACTGGT AACAGGATTAA GCAGAGCGAG GTATGTAGGC
7261	GGTGCTACAG AGTTCCTGAA GTGGTGGCTT AACTACGGCT ACACATAGAAG GACAGTATT
7321	GGTATCTGCG CTCTGCTGAA GCCAGTTACC TTGGGAAAAA GAGTTGGTAG CTCTTGATCC
7381	GGCAAAACAAA CCACCGCTGG TAGCGGTGGT TTTTTTGTGT GCAAGCAGCA GATTACCGCC
7441	AGAAAAAAAG GATCTCAAGA AGATCCCTTG ATCTTTCTA CGGGGCTGAG CGCTCAGTGG
7501	AAACAAAAACT CACGTTAAGG GATTTGGTC ATGAGATTAT CAAAAACGGAT CTTCACCTAG
7561	ATCCTTTAA ATTAAAAATG AAGTTTTAAA TCAATCTAA GTATATATGA GTAAACCTGG
7621	TCTGACAGTT ACCAATGCTT AATCAGTGAG GCACCTATCT CAGCGATCTG TCTATTCGT
7681	TCATCCATAG TTGCTGCACT CCCCCGCGTG TAGATAACTA CGATAACGGGA GGGCTTACCA
7741	TCTGGCCCCA GTGCTGCAAT GATAACGGCA GACCCACGGT CACCGGCTCC AGATTTATCA
7801	GCAATTAACC AGCCAGCCCG AAGGGCCCGAG CCCAGAAAGTG GTCTGCAAC TTTATTCGCC
7861	TCCATCCAGT CTATTAATTG TTGGCGGGAA CCTAGAGTAA GTAGTTCGCC AGTTAATAGT
7921	TTGGCCAACG TTGTTGGCCAT TGCTGCGAGC ATCGTGGGTGT CACGCTCGTC GTTGGGTATG
7981	GCTTCATTCA GCTCCGGTTC CCTAACGATCA ACCCGAGTTA CATGATCCCC CATGTTGTGC
8041	AAAAAAAGCGG TTAGCTCTT CGGTCTCTCG ATCGTTGTCA GAAGTAAGTT GGCCCCAGTG
8101	TTATCACTCA TGGTTATGGC AGCACTGCAT AATTCCTCTA CTGTCATGCC ATCCGTAAGA
8161	TGCTTTCTG TGACTGGTGA GTACTCAACG AGTCATTCT CAGAATAGTG TATGGGGCGA
8221	CCGAGTTGCT TTGCCCCGGC GTCAACACGG GATAATACCG CGCCACATAG CAGAACCTTA
8281	AAAGTGCTCA TCATTGGAAA ACGTTCTCG CGCCGAAAC TCTCAAGGGAT CTTACCGCTG
8341	TTGAGATCCA GTTCCGATGTA ACCGACTCGT CGACCCAACT GATCTTCAGC ATCTTTTACT
8401	TTCACCAAGCG TTTCTGGGTG AGCAAAAACA GGAAGGCMAA ATGCCGAAA AAAGGGATA
8461	AGGGCGACAC GGAAATGTG AATACTCTA CTCTTCCCTT TTCAATATTA TTGAAGCATT
8521	TATCAGGGTT ATTGTCTCAT GAGCGGATAC ATATTTGAA GTATTTAGAA AAATAAACAA
8581	ATAGGGGTTG CGCGCACATT TCCCCGAAA GTGCCACCTG ACGTCTAAGA AACCAATTATT
8641	ATCATGACAT TAACCTATAA AAATAGGGGT ATCAAGGAGGC CCTTTGGTCT TCAAGAAC
8701	GAGCTGGTA CCCATCAGCC AAAAACGATG CCTGCCACAC AACATCAATT TCTGGAAAC
8761	GCTACACTTA AATTTTCTA GTAGAACAGC TCTTTGGTTT GCCAAAAAGA ATCACCTATA
8821	GTGGCATCTA AGCACAAAAA GGAGAAAAAA ATCACAAAGA AATGATTGAG AGGCATAATA
8881	AAATTTATCA AAAAATTATG AGTTTACGA TTTCATCTTT TTCCAAGTTG AAATCATAGG
8941	GTGGCTTTAA CACAGTGACA AGGAATGTGC ATGCTGCCAT TATGGTGCTC TGCCTAARAT
9001	GGTGGGAGCC TTGTCATGCT ACAGAGAAAC TGTCTACAG CAGGGGGTGC CAAATTTCCA
9061	TATTTTTTA TATCATGAG CAGGTGCAAGA GAAGACCGAGA AAGCACTTTC TATCAGGGCTG
9121	GCCTTCCCTCT TCCCTTCCAG TATGAAGCAA AAACGCCAA TGAAACTAGC AATTGTTAAA
9181	TTCTTTTTTC AAACAGTATT TGTGCTATCA GAACATAGTG CATTCAAAAG TCTAGCCTGA
9241	GAGAACAAACC CAGTTTTATT CATTCTCTCT ACTACCTCTC TCAATTCCAC TGTGGTGTGTT
9301	CTCCCTCCCC TTAAATTGT CTATCTAGTC CAAACTAAGC ACACGATCCA GTCCACATTA
9361	AACAAACATGT TTTCACTTTA AGTCAAATAC AAGACACCTT TAATATCAGC CCTTGTTCAT

60

65

ES 2 341 341 T3

9421 AATCGTGCTT CTTAGTGACTT AATGTACATG TCAACACTGTA CTGTTGGGTT TTGTGTCTCA
9481 TCATGAACAA TGGTGTGAAG GTATTAAGTG GAGAGTAAGC ACAATTAGAT TCCCTCTAATG
9541 ATGCACACCC ACACTAAGAG CAGAAATAAT ATTTAAAATA GAAAAAAAAG TTTTACATGA
5 9601 GATTTCATAAT ACCCAGGTAT GAGCTGCACT TTCTTCAGT TAAAGCATCG AGGTTGTCAG
9661 TTACACTATT ACAGGAAACA TATGCAGAGT TTTTATTATA GTATATTAGT TTTCACATAT
9721 GTGGAATTAC TATTAACATA TTCTTTCTT TCAAATGCTT ACCATTGTAA ATGAGTTG
9781 GACTTTGTGT AGGTGAGTGC ACATGACTCT GGATGCCCTAA GAGGACTGAA GAAGTGGAG
10 9841 TTATAGGTAG TTTTATCTA CTTGACTGTT CAGTGTAAA AATACAACTG AGGTCCCTTA
9901 AACTGCTGTT CATGAACCTC TTAATTGATA TATCTCATGA GATCTCTAAA CTATTTTAT
9961 TATGACACGT TTCACCATT TCACGTGAA GATTTTATG TTTTATATTA ATGTAACATAT
15 10021 ATGACACTTC CCAAAATCCC CATAATCACA ATTGAACCTGT TPCAAAGTTT TACCTTGACT
10081 TATGGAAAT GAAAACCCAC ATTTTATAAT TTTAAAATGA AATGTTTATT TTATATTCT
10141 GCAAAATTCA CAAGGAAAGA TTAGTCAGT GGTGTGAGA CAGAGGAGC ATAAGAGTTC
10201 AGGAATAGAA TCCATTATGA TTCTGGAGGC AAGGAAGAAC TGATGCCAG GTTTCACTAT
20 10261 AAGAGCAGTA TCCACTGGAA AGGATAAAAGT CACTACATCT GAGCACAGAG CAGGACATCT
10321 ACATAATGAG TGGTCACTAA TGGGCCACTG TTACACTGTT ATATGTTATAA GGCTCAAGAA
10381 TGAGGACTGAA GGCTGIAAGG TGTATGGGTG AGGACATCAG GATGTAACCC CAGCTCAGGT
10441 AGAGGACTCA QAGGACACCA CAGTCAGCAT GAACTAATAA ACATCAGATA AGATAAGGCA
25 10501 CAAGCTCAGC TATATAGGT AAGGGATCTT TGTAAATCTG ATTGTGCATC CAGTCTAGTT
10561 CAATGTGACT TAGGAAGCCC AGTCATATGC AAATCTAGAG AAGACTTTAG AGTAGAAATC
10621 TGAGGCTCAC CTCACATACC AGCAAGCGAG TGACCACTTAA GTCTTAAGGC ACCACTCTT
10681 AGACATCATG GCTTGGGTGT GGACCTTGCC ATTCTGTATG GAGCTGCCA AAGTAAAGAC
30 10741 ATCAGAAAAA AGAGTICCAA GGGGAATTGA AGCAGTTCCA TGAATACTCA CCTTCCGTG
10801 TTCTTTTCAC AGGTGTCCAG GCACAGGTGC AGCTGGTGGA GTCAGGAGCC GAAAGTAAAAA
10861 AGCCTGGGGC TTCACTGAAG GTGTCCTGCA AGGCCTCTGG ATACACATTC ACTAATTTATA
10921 TTATCCACTG GGTGAAGCAG GACCTGGTC AGGGCCTTGA ATGGATTGGA TATTTTAATC
35 10981 CTTACAATCA TGGTACTAAG TACAATGAGA AGTTCAAAGG CAGGGCCACA CTAACTGCAG
11041 ACAAAATCCAT CAGCACACCC TACATGGAGC TCAGCAGCCT GCGCTCTGAG GACACTGCAG
11101 TCTACTACTG TGCAAGATCA GGACCCCTATG CCTGGTTGCA CACCTGGGGC CAAGGGACCA
40 11161 CGGTCACCGT CTCCCTCAGGT AAGAATGCC ACTCTAGGGC CTTTGTGTTTC TGCTGCTGCC
11221 TGTGGGATTT CATGAGCATT GCAAGTTGT CCTGGGACA TGTGGGAGG GGACCTGGGC
11281 GGACTGGCCA GGAGGGGAGC GCCACTGGGG TGCCTTGAGG ATCTGGGAGC CTCTGTGGAT
11341 TTTCCGATGC CTTTGGAAAA TGGGACTGAG GTTGGGTGGC TCTGAGACAG TAACTCAGCC
45 11401 TGGGGCTTG GTGAAGATCG CCCCCACAGCA GCGAGTCCGT GAAATATCTT ATTTAGACTT
11461 GTGAGGTGCG CTGTGTGTCA ATTTACATCT TAAATCCCTT ATTGGCTGGA AAGAGAATTG
11521 TTGGAGTGGG TGAATCCAGC CACGGAGGAC GGGGGGGAT CCA

50

SEQ ID NO: 39

55 Secuencia de nucleótido de la expresión del vector LCVL2Sp20

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

65

ES 2 341 341 T3

101	TAAGTTGGTT CCTAGGAAAA ATAGTTAAAT ACTGTGACTT TAAAATGTGA
151	GAGGGTTTTC AAGTACTCAT TTTTTAAAT GTCCAAAATT TTGTCAATC
201	AATTGAGGT CTTGTTTGTG TAGAACTGAC ATTACTTAAA GTTTAACCGA
251	GGAATGGGAG TGAGGCTCTC TCATACCCCA TTCAAGAACTG ACTTTAAACA
301	ATAATAAAATT AAGTTAAAAA TATTTTAAA TGAATTGAGC AATGTTGAGT
351	TGGACTCAAG ATGCCGATC AGAACCGAGA CACCTGCAGC AGCTGGCAGG
401	AAGCAGCTCA TGTGGCAAGG CTATTTGGG AAGGGAAAAT AAAACCACTA
451	GGTAAACCTG TAGCTGTGGT TTGAAGAAGT GGTTTGAAA CACTCTGTCC
501	AGCCCACCA AACCGAAAGT CCAGGCTGAG CAAAACACCA CCTGGGTAAT
551	TTGCATTTCT AAAATAAGTT GAGGATTCAAG CCGAAAATGG AGAGGTCTC
601	TITTAACCTA TTGAGTTCAA CCTTTAAATT TTAGCTTGAG TAGTTCTAGT
651	TTCCCCAAC TTAAGTTAT CGACTCTAA AATGTATTTA GAACTCAATT
701	TCAAAATTAG GTTATGTAAG AAATGAGG ACTTTAGTGT CTTTAATTTC
751	TAATATATT AGAAAATTC TTAAAATTAC TCTATTATTC TTCCCTCTGA
801	TTATTGGTCT CCATTCATT CTTTCCAAT ACCCGAAGCA TTACAGTGA
851	CTTTGTTCAT GATCTTTTT AGTTGTTGT TTTGCCTTAC TATTAAGACT
901	TTGACATTCT GTCAAAACG GCTTCACAAA TCTTTTCAA GACCACTTTC
951	TGAGTATTCA TTTAGGAGA AATACTTTT TTTTAATGA ATGCAATTAT
1001	CTAGGACCTG CAGGCATGCT GTTTCTGTC TGTCCCTAAC ATGCCCTGTG
1051	ATTATCCGCA AACACACAC CCAAGGGCAG AACTTTGTIA CTTAACACACC
1101	ATCCTGTTTG CTTCTTCCT CAGGAACCTGT GGCTGCACCA TCTGCTTCA
1151	TCTTCCCGCC ATCTGATGAG CAGTTGAAAT CTGGAACCTGC CTCTGTTGTG
1201	TGCCTGCTGA ATAACCTCTA TCCCAGAGAG GCCAAAGTAC AGTGGAAAGGT
1251	GGATAACGCC CTCCAATCGG GTAACTCCCA GGAGAGTGTC ACAGAGCAGG
1301	ACAGCAAGGA CAGCACCTAC AGCCTCAGCA GCACCCCTGAC GCTGAGCAAA
1351	GCAGACTACG AGAAAACACAA AGTCTACGCC TGCGAAGTCA CCCATCAGGG
1401	CCTGAGCTCG CCCGTCACAA AGAGCTTCAA CAGGGGAGAG TGTTAGAGGG
1451	AGAAAGTGCC CCACCTGCTC CTCAGTTCCA GCCTGACCCC CTCCCATCCT
1501	TTGGCCTCTG ACCCTTTTC CACAGGGAC CTACCCCTAT TGGGGTCCTC
1551	CAGCTCATCT TTACACCTCAC CCCCCCTCTC CTCCCTGGCT TTAATTATGC
1601	TAATGTTGGA GGAGAATGAA TAAATAAGT GAATCTTGC ACCTGTGGTT
1651	TCTCTCTTTC CTCAATTAAAT AATTATTATC TGGTGTGTTA CCAACTACTC
1701	AATTCTCTT ATAAGGGACT AAATATGTAG TCATCCTAAC CGGGGATATC
1751	GAGATCTGAA GCTGATCCAG ACATGATAAG ATACATTGAT GAGTTGAGAC
1801	AAACCACAAAC TAGAATGCAG TGAAAAAAAT GCTTTATTTG TGAAATTGT
1851	GATGCTATTG CTTTATTGT AACCATTATA AGCTGCAATA AACAAAGTTAA
1901	CAACAAACAAT TGCATTCAATT TTATGTTCA GGTTCAGGGG GAGGTGTGGG
1951	AGGTTTTTA AAGCAAGTAA AACCTCTACA AATGTGGTAT GGCTGATTAT
2001	GATCTCTAGT CAAGGCACCA TACATCAAAT ATTCCTTATT AACCCCTTTA
2051	CAAATTAAAA AGCTAAAGGT ACACAAATTG TGAGGCATAGT TATTAATAGC
2101	AGACACTCTA TGCCTGTTG GAGTAAGAAA AACACAGTATG TTATGATTAT

ES 2 341 341 T3

2151	AACTGTTATG CCTACTTATA AAGGTTACAG AATATTTTC CATAATTTC
2201	TTGTATAGCA GTGCAGCTTT TTCCCTTGTG GTCTAAATAG CAAACCAAGC
2251	AAGAGTTCTA TTACTAAACA CAGCATGACT CAAAAAACTT AGCAATTCTG
2301	AAGGAAAGTC CTGGGGTCT TCTACCTTC TCTTCTTTT TGGAGGAGTA
2351	GAATGTTGAG AGTCAGCAGT AGCCTCATCA TCACTAGATG GCATTTCTC
2401	TGAGCAAAAC AGGTTTCTT CATTAAAGGC ATTCCACCAAC TGCTCCATT
2451	CATCAGTTCC ATAGGTTGGA ATCTAAAATA CACAAACAAT TAGAATCAGT
2501	AGTTAAACAC ATTATACAT TAAAAATTTC ATATTTACCT TAGAGCTTTA
2551	AATCTCTGTA GGTAGTTTGT CCAATTATGT CACACCACAG AAGTAAGGTT
2601	CCTTCACAAA GATCCGGACC AAAGCGGCCA TCGTGCCTCC CCACTCCCTGC
2651	AGTTCCGGGG CATTGGATGGG CGGATAGCCG CTGCTGGTTT CCTGGATGCC
2701	GACGGATTG CACTGCCGGT AGAACTCCGC GAGGTGTCAGC AGCCTCAGGC
2751	AGCAGCTGAA CCAACTCGCG AGGGCATCGA CCATCCCCCA TGGTCTTATA
2801	AAAATGCATA GCTTTAGGAG GGGAGCAGAG AACTGAAAG CATCTTCCTG
2851	TTAGTCTTTC TTCTCGTACA CTTCAAACCTT ATACTTGATG CCTTTTTCTT
2901	CCTGGACCTC AGAGAGGACG CCTGGTATT CTGGGAGAAG TTTATATTTC
2951	CCCAAATCAA TTTCTGGAA AAACGTGTCA CTTTCAAATT CCTGCATGAT
3001	CCTTGTCAAA AAGAGTCTGA CGTGGCCTGG TTGATTCATG GCTTCCTGGT
3051	AAACAGAACT GCCTCCGACT ATCCAAACCA TGTCTACTTT ACTTGCCAAT
3101	TCCGGTTGTT CAATAAGTCT TAAGGCATCA TCCAAACTTT TGGCAAGAAA
3151	ATGAGCTCCT CGTGGTGGTT CTTTGAGTTC TCTACTGAGA ACTATATTTAA
3201	TTCTGTCCCT TAAAGTCGA TTCTTCTCAG GATGGAGAA CCAGGTTTTC
3251	CTACCCATAA TCACCAAGATT CTGTTTACCT TCCACTGAAG AGGTTGTTGGT
3301	CATTCTTGG AAGTACTTGA ACTCGTTCTT GAGGGGAGGC CAGGGTCGGT
3351	CTCCGTTCTT GCCAATCCCC ATATTTGGG ACACGGCGAC GATGCAGITC
3401	AATGGTCGAA CCATGATGGC AGCGGGGATA AAATCCTACC AGCCTTCACG
3451	CTAGGATTGC CGTCAAGTTT GGGGTACCG AGCTTGAATT AGCTTTTGC
3501	AAAAGCCTAG CCCTCCAAA AAGCCTCCCTC ACTACTCTG GAATAGCTCA
3551	GAGGGCCGAG CGGGCCTCGG CCTCTGCATA AATAAAAAAA ATTAAGTCAGC
3601	CATGGGGCCG AGAATGGCGG CAACTGGCG GAGTTAGGGG CGGGATGGGC
3651	GGAGTTAGGG CGGGGACTAT GTTGCTGAC TAATTGAGAT GCATGCTTG
3701	CATACTCTG CCTGCTGGGG AGCCTGGGA CTTTCCACAC CTGGTTGCTG
3751	ACTAATTGAG ATGCATGCTT TGCATACTTC TGCCGTCTGG GGAGCCTGGG
3801	GACTTCCAC ACCCTAACTG ACACACATTC CACAGCTGCC TCGGGCGTTT
3851	CGGTGATGAC GGTGAAAACC TCTGACACAT GCAGCTCCCG GAGACGGTCA
3901	CAGCTTGTCT GTAGCGGAT CGGGGGAGCA GACAGCCCG TCAGGGCGCC
3951	TCAGCGGGTG TTGGCGGGTG TCGGGCGCA GCCATGACCC AGTCACGTAG
4001	CGATAGCGGA GTGTATACTG GCTTAACATAT CGGGCATCAG AGCAGATPTGT
4051	ACTGAGAGTG CACCATATGC GGCGCATAT CGGGTGTGAA ATACCGCACA
4101	GATGCCTAAG GAGAAAATAC CGCATCAGGC CCTCTTCGGC TTCTCGCTC
4151	ACTGACTCGC TGGCGCTCGGT CGTTGGCTG CGGGAGCGG TATCAGCTCA

ES 2 341 341 T3

4201	CTCAAAGGCG GTAATACGGT TATCCACACA ATCAAGGGAT AACGCAGGAA
4251	AGAACATGTG AGCAAAAGGC CAGCAAAAGG CCAGGAACCG TAAAAAAGGCC
5 4301	GCGTTGCTGG CGTTTTCCA TAGGCTCCGC CCCCCCTGACG AGCATCACAA
4351	AAATCGACGC TCAAGTCAGA GGTGGCCAAA CCCGACAGGA CTATAAAGAT
4401	ACCAGGGCGTT TCCCCCTGGA AGCTCCCTCG TGCGCTCTCC TGTTCCGACC
10 4451	CTGCGGCTTA CGGGATAACCT GTCCCGCTTT CTCCCCCTCGG GAAGCGTGGC
4501	GCTTTCTCAT AGCTCACGCT GTAGGTATCT CAGTTCCGTC TAGGTCGTT
4551	GCTCCAAGCT GGGCTGTGTG CACGAACCCC CGTTTCAGCC CGACCGCTGC
15 4601	GCCTTATCCG GTAACTATCG TCTTGAGTCC AACCCGGTAA GACACGACTT
4651	ATCGCCACTG GCAGCAGCCA CTGGTAACAG GATTAGCAGA GCGAGGTATG
4701	TAGGCGGTTC TACAGAGTTC TTGAAGTGGT GGCTTAACTA CGGCTACACT
4751	AGAAGGACAG TATTGGTAT CTGCGCTCTG CTGAAGGCCAG TTACCTTCGG
20 4801	AAAAAGAGTT GGTAGCTCTT GATCCGGCAA ACAAAACCACC GCTGGTAGCG
4851	GTGGTTTTT TGTGGCAAG CAGCAGATTA CGCGCAGAAA AAAAGGATCT
4901	CAAGAAGATC CTTTGATCTT TTCTACGGGG TCTGACGCTC AGTGGAACGA
25 4951	AAACTCACGT TAAGGGATTG TGGTCATGAG ATTATCAAAA AGGATCTTCA
5001	CCTAGATCCT TTTAAATTAA AAATGAAGTT TAAATCAAT CTAAAGTATA
5051	TATGAGTAAA CTTGGTCTGA CAGTTACCAA TGCTTAATCA GTGAGGCACC
30 5101	TATCTCAGCG ATCTGTCTAT TTCGTTTCATC CTTAGTTGCC TGACTCCCCG
5151	TCGTGTAGAT AACTACGATA CGGGAGGGCT TACCATCTGG CCCCAGTGCT
5201	GCAATGATAC CGCGAGACCC ACGCTCACCG GCTCCAGATT TATCAGCAAT
5251	AAACCAGCCA GCCGGAAGGG CCGAGCCAG AAGTGGTCTT GCAACTTTAT
35 5301	CCGGCTCCAT CCAGTCTATT AATTGTTGCC GGGAAAGCTAG AGTAAGTAGT
5351	TGGCCAGTTA ATAGTTTGCG CAACGTTGTT GCCATTGCTG CAGGCATCGT
5401	GGTGTCAACGC TCGTCGTTTG GTATGGCTTC ATTCAAGCTCC GGTTCCCAAC
40 5451	GATCAAGGCG AGTTACATGA TCCCCCATGT TGTGAAAAAA AGCGGTTAGC
5501	TCCCTCGGTC CTCCGATCGT TGTCAAGAAGT AAGTTGGCCG CAGTGGTATC
5551	ACTCATGGTT ATGGCAGCAC TGCATAATTC TCTTACTGTC ATGCCATCCG
45 5601	TAAGATGCTT TTCTGTGACT CGTGAGTACT CAACCAAGTC ATTCTGAGAA
5651	TAAGTGTATGC GGCAGCCGAG TTGCTCTTGC CGGGCGTCAA CACGGATAAA
5701	TACCGCGCCA CATAGCAGAA CTTTAAAAGT GCTCATCATT GGAAAACGTT
5751	CTTCGGGGCG AAAACTCTCA AGGATCTTAC CGCTGTTGAG ATCCAGTTCG
50 5801	ATGTAACCCA CTCGTGCACC CAACTGATCT TCAGCATCTT TTACTTTCAC
5851	CAGCGTTCTC GGGTGAGCAA AAACAGGAAG GCAAAATGCC GCAAAAAAGG
5901	GAATAAGGGC GACACGGAAA TGTGAAATAC TCATACTCTT CCTTTTCAAA
55 5951	TATTATTGAA GCATTATCA GGGTTATTGT CTCATGAGCG GATAACATATT
6001	TGAATGTATT TAGAAAAATA AACAAATAGG GGTTCCGCGC ACATTTCCCC
6051	GAAGACTGCC ACCTGACGTC TAAGAAACCA TTATTAATCAT GACATTAAACC
6101	TATAAAAATA GCGGTATCAC GAGGCCCTTT CGTCTTCAAG AATTCAGCTG
6151	CTCGAGGAAG AGCTCAAACC CATGCTACTC TCTGGCTTGA TGGAGCAAC
6201	GCTTTCATAG CTGAGCTGTC ATAAATAATA AAGAGATTTT TTTATTAATA

ES 2 341 341 T3

6251	TTGAAAAGAT GGGTTATTTA TGTAAGACTC TGTCTTCATT TTAACCA
6301	CACCTTCCAG TAGTATTCTG TTAATGTTCT GGCAATCACT GTGATCAAGA
6351	AGCTACACGG TGAGTTGTCC TTCTCAGTCC TAAGGGATAC ATCTACAGA
6401	GGCTCCCATA CTCGAAGCTC AGGAAACATT GTAGAAAAGG AGGCAAAAGA
6451	CTGACAGAGC CAGAGGACCA AGAAATTGT TGTGAGGTTG TGTCTCCCTAC
6501	TAACAATATA AGCAATATCT ATAAATTGTT GATATCATGG CTACTAAAT
6551	GTGAGTTGAA CGAGGAGGAC ACAAAATGAAC ATGACAATCA GAATGAGGCC
6601	TCTCACCTGC AAAAAACACT ATAGAGAAGC AGATAAAGCT GTCAGCAGAA
6651	GAGGCGCACC TCCTTATAGA AGAAGCCTAC CAGGTTGAT ATATCAGCCT
6701	TGAAAACCTA CATACTATTT ACATTATATC GAGTCTATGA GACATATTAA
6751	GTAAATGCATA TGTATGTGTG TGTGTGCATG TATGTGTGA AATACATATG
6801	TTCATAGAAA AATGTGTAAA AAGAGATCAT GAATTAAAGA GAGAACTGGG
6851	ACAATTTTT TCAGGGAGTT GTAATCAGGA AAGTTAAGGG AAAAAATGTTG
6901	TAATTAAAAAT TCAGGCTCAG AAACAAACAA AGGAAAAGAA AAAAAAAACAA
6951	CAACAAACAAC AAAAAAAACAA AACAAAGGAG AAGCTGTATG GCCACAATAG
7001	CATCTACAGC TAACTGTGAA AGGATAATGG AACAAAGTTAT GTACTGCCTA
7051	GAGCAGTATG ATGCCAAAT CATCTCGACA TGGAGGAAAA TAGAACAAAG
7101	ACACTCTACA TAGACTATGA TAGAAATCAA AATAAGGTGT AAGACATAGA
7151	ACATTAGTTT TGTTTGTGT TCAAAGAGAC TCACATTCCC ACAAAAAAAT
7201	CTGTGGGATT TTACAGGTCT GCAATAAGCT GCTGACCTGA TGATTTCTGC
7251	AGCTGTGCCT ACCCTTTGCT GATTTGCATG TACCCAAAGC ATAGCTTACT
7301	GACATGAGGA TTCTTCATA GTCAGGTCAAC ACCCTTTGCT GGAGTCAGAA
7351	TCACACTGAT CACACACAGT CATGAGTGTG CTCACTCAGG TCCTGGCGTT
7401	GCTGCTGCTG TGGCTTACAG GTAATGAAGA CAGCACTAGA ATTTTATTGA
7451	GCTTCCCTGTA CACTGTGCTG CTTGTCTCTG TGAAAATTCT CTTGTGATT
7501	AATCATGTGG GGATCTGTT TCAATTTC AATTGTAGGT ACGCGTTGTG
7551	ACATTCTGCT GACCCAGTCT CCAGCCACCC TGTCTCTGAG TCCAGGAGAA
7601	AGAGCCACTT TCTCCGTCAAG GGCCAGTCAG AACATTGGCA CAAGCATACA
7651	GTGGTATCAA CAAAAACAA ATGGTGTCTCC AAGGCTTCTC ATAAGGTCTT
7701	CTTCTGAGTC TATCTCTGGG ATCCCTTCGA GGTTAGTGG CAGTGGATCA
7751	GGGACAGATT TTACTCTTAC CATCAGCAGT CTGGAGCCTG AAGATTTTGC
7801	AGTGTATTAC TGTCAACAAA GTAATACCTG GCCATTCACT TTGGGCCAGG
7851	GGACCAAGCT TGAAATCAA CGTAAGTAGA ATCCAAAGTC TCTTTCTTCC
7901	GTTGTCTATG TCTGTGGCTT CTATGTCTAA AAATGATGTA TAAAATCTTA
7951	CTCTGAAACC AGATTCTGGC ACTCTCCAAG GCAAAAGATAC AGAGTAACTC
8001	CGTAAGCAA GCTGGGAATA GGCTAGACAT GTTCTCTGGA GAATGAATGC
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 51 GAAGTATGTG TATGGAATAT TAGAAGATGT TGCTTTACT CTTAAGTTGG
10 101 TTCCTAGGAA AAATAGTTAA ATACIGTGAC TTTAAAATGT GAGAGGGTTT
15 151 TCAAGTACTC ATTTTTTAA ATGTCCAAAA TTTTTGTCAA TCAATTGAG
20 201 GTCTTGTGTTG TGAGAAGACTG ACATTACITA AAGTTTAACC GACCAATGGG
25 251 AGTGAGGCTC TCTCATACCC TATTCAAGAAC TGACTTTAA CAATAATAAA
30 301 TTAAGTTAA AATATTTTA AATGAATTGA GCAATGTTGA GTTGGAGTCA
35 351 AGATGCCCGA TCAGAACCCAG AACACCTCCA GCAGCTGGCA GGAACGAGCT
40 401 CATGTGCCAA GGCTATTTGG GGAAGGGAAA ATAAAACCAC TAGGTAAACT
45 451 TGTAGCTGTG GTTTGAAGAA GTGGTTTGA AACACTCTGT CCAGCCCCAC
50 501 CAAACCGAAA GTCCAGGCTG AGCAAAACAC CACCTGGTA ATTTGCATT
55 551 CTAAAATAAG TTGAGGATTC AGCCGAAACT GGAGAGGTCC TCTTTAACT
60 601 TATTGAGTTC AACCTTTAA TTTTAGCTTG AGTAGTTCTA GTTTCCCCAA
65 651 ACTTAAGTTT ATCGACTTCT AAAATGTATT TAAGCTTTCT GGGGCAGGCC
70 701 AGGCCTGACC TTGGCTTTGG GGCAGGGAGG GGGCTAAGGT GAGGCAGGTG
75 751 GGGCCAGCCA GGTGCACACC CAATGCCCAT GAGCCCAGAC ACTGGACGCT
80 801 GAACCTCGCG GACAGTTAAG AACCCAGGGG CCTCTGCAGCC CTGGCCCCAG
85 851 CTCTGTCCCA CACCGCGGTC ACATGGCACC ACCTCTCTTG CAGCCTCCAC
90 901 CAAGGGCCCA TCGGTCTTCC CCCTGGCACC CTCCCTCCAAG AGCACCTCTG
95 951 GGGGCACAGC GGCCTGGGC TGCTGGTCA AGGACTACTT CCCCAGAACCG
100 1001 GTGACGGTGT CGTGGAACTC AGGCGCCCTG ACCAGCGGGG TGCACACCTT
105 1051 CCCGGCTGTC CTACAGTCCT CAGGACTCTA CTCCCTCAGC AGCGTGGTGA
110 1101 CCGTGCCCTC CAGCAGCTTG GGCACCCAGA CCTACATCTG CAACGTGAAT
115 1151 CACAAGCCCA GCAACACCAA GGTGGACAG AGAGTTGGTG AGAGGCCAGC
120 1201 ACAGGGAGGG AGGGTGTCTG CTGGAAAGCCA GGCTCAGGCC TCCCTGCTGG
125 1251 ACGCATCCCC GCTATGCAGT CCCAGTCCAG GGCAGCAAGG CAGGCCCCGT
130 1301 CTGCCTCTTC ACCCGGAGGC CTCTGCCCGC CCCACTCATG CTCAGGGAGA
135 1351 GGGTCTTCTG GCTTTTCTCC CAGGCTCTGG GCAGGGCACAG GCTAGGTGCC
140 1401 CCTAACCCAG GCCCTGCACA CAAAGGGCCA GGTGCTGGGC TCAGACCTGC
145 1451 CAAGAGCCAT ATCCGGGAGG ACCCTGCCCT TGACCTAAGC CCACCCCCAAA
150 1501 GGCCAAACTC TCCACTCCCT CAGCTGGAC ACCCTCTCTC CTCCCTGAGT
155 1551 CCAGTAACTC CCAATCTCT CTCTGCAGAG CCCAAATCTT GTGACAAAAC
160 1601 TCACACATGC CCACCGTGCC CAGGTAAGCC AGCCCAGGCC TC3CCCTCCA
165 1651 GCTCAAGGC GGACAGGTGC CCTAGAGTAG CCTGCATCCA GGGACAGGCC
170 1701 CCAGCCGGGT GCTGACACAGT CCACCTCCAT CTCTTCTCTA GCACCTGAAAC
175 1751 TCCTGGGGGG ACCGTCAGTC TTCTCTTCC CCCAAACACC CAAGGACACC
180 1801 CTCATGATCT CCCGGACCCC TGAGGTCAAGA TGGCTGGTCC TGGACGTGAG
185 1851 CCACGAAGAC CCTGAGGTCA AGTTCAACTG GTACGTGGAC GGCCTGGAGG
190 1901 TGCATAATGC CAAGACAAAG CGCGGGAGG AGCACTACAA CAGCACGTAC

ES 2 341 341 T3

1951	CGTGTGGTCA GCGTCCTCAC CGTCCTGCAC CAGGACTGGC TGAATGGCAA
2001	GGAGTACAAG TGCAAGGTCT CCAACAAAGC CCTCCCAGCC CCCATCGAGA
2051	AAACCATCTC CAAAGCCAAA GGTGGGACCC CTGGGCTGCC AGGGCCACAT
2101	GGACAGAGGC CGGCTCGGCC CACCCCTCTGC CCTGAGAGGTG ACCGCTGTAC
2151	CAACCTCTGT CCCTACAGGG CAGCCCCGAG AACACACAGGT GTACACCCG
2201	CCCCATCCC CGGAGGAGAT GACCAAGAAC CAGGTCAGCC TGACCTGCCT
2251	GGTCRAAGGC TTCTATCCCA GGGACATCGC CGTGGAGTGG CAGAGCAATG
2301	GGCAGCCGGA GAACAACATAC AAGACCAACGC CTCCCCTGCT GGACTCCGAC
2351	GGCTCCCTCT TCCTCTATAG CAAAGCTCACC GTGGACRAGA CGAGGTGGCA
2401	GCAAGGGAAC GTCTTCTCAT GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAAACC
2451	ACTACACGCA GAAGAGCCTC TCCCTGTCCC CGGGTAAATG AGTGGGACGG
2501	CGGGCAAGGC CCCGCTCCCC GGGCTCTCGC GGTGGCACCGA GGATGCTTGG
2551	CAAGTACCCCC GTCTACATAC TTCCCAGGCA CCCAGCATGG AATAAAGCA
2601	CCCAACCACTG CCCTGGGGCC CGTGGAGACT GTGATGGTTC TITCCACGGG
2651	TCAGGCCCCAG TCTGAGGCCT GAGTGGCATG AGGGAGGGCAAG AGCGGGTCCC
2701	ACTGTCCCCA CACTGGCCCA GGCTGTGCAG GTGTGCCTGG GCCGCCTAGG
2751	GTGGGGCTCA GCCAGGGGCT GGCCTCGGCA GGCTGGGGGA TTTGCCAGCG
2801	TGGCCCTCCC TCCAGCAGCA GCTGCCCTGG GCTGGGCCAC GAGAAGCCCT
2851	AGGAGCCCCCT GGGGACAGAC ACACAGCCCC TGCCTCTGTA GGAGACTGTC
2901	CTGTCTGTG AGCGCCCTGT CCTCCGACCC CGATGCCAC TCGGGGGCAT
2951	GCCTAGTCCA TGGCGCTAAG GACAGGGCCCT CCCTCACCCCA TCTACCCCCA
3001	CGGCACAAAC CCCTGGCAGC CCTGCCAACG CTCGCACCCG CATGGGACAA
3051	CAACCGACTC CGGGGACATG CACTCTCGGG CCCTGTGGAG GGACTGGTGC
3101	AGATGCCAC ACACACACTC AGCCCAGACC CGTTCAACAA ACCCCGCACT
3151	GAGGGTGGTC GAGGGGGAGT CGGGCCAGAG CCTGCGCTCGG CGTCAGGGAA
3201	GGACTCCGG GCTCACTCGA AGGAGGTGCC ACCATTTCAG CTTTGGTAC
3251	TTTCTTCTT CTTTAAATT TTCTAAAGCT CATTAAATTGT CTTTGATGTT
3301	TCTTTGTGA TGACAATAAA ATATCCTTT TAAGTCTTGT ACTTCGTGAT
3351	GGGAGCCGCC TTCCCTGTGTC CACGGGCCCTC CTGGCCCCGG TGGGAAGCAC
3401	GGTCAGGAGG AGGCTGGTCC AGCTGCACCT CGGGGGCTCC CTGCACCTCGC
3451	CCCCCGCCCTC CTGCAGCCAC ACCTGATGCC CGAGCGACCC TCCCTGGGCC
3501	CTGTCACCTAC ATGGACCCCT GGGGCTTCTC CTCTTTCTA CATGGATGCA
3551	GTTCTCTCTC CTGCTGGGCA CGGTGCTGCC TCCCTGGTC ACTCTGGGG
3601	GGACAGGGCC TCCAGGGAAA GCTGGGTCGA GGCTGGGAGC TGGCTCAGGC
3651	TGGCCAGGCA GAGCCACAGG GAGGGCCTTC CAGAACCAAC CATGGTCCGA
3701	AGGGAGAGGT GGGTGTAGA TCCAGACATG ATAGATACA TTGATGAGTT
3751	TGGACAAACC ACAACTAGAA TGCAGTGAAG AAAATGTTT ATTTGTGAAA
3801	TTTGTGATGC TATTGCTTTA TTGTAACCA TTATAAGCTG CAAATAACAA
3851	GTAAACAACA ACAATTGCAT TCATTITATG TTTCAGGTTC AGGGGGAGGT
3901	GTGGGAGGTT TTTAAAGCA AGTAAAACCT CTACAAATGT GGTATGGCTG
3951	ATTATGATCT CTAGTCAGG CACTATACAT CAAATAATTCC TTATTAACCC

ES 2 341 341 T3

4001	CTTTACAAAT TAAAAAGCTA AAGGTACACA ATTTTGAGC ATAGTTATTA
4051	ATAGCAGACA CTCTATGCCT GTGTGGAGTA AGAAAAAAACA GTATGTTATG
5 4101	ATTATTAATG TTATGCCTAC TTATAAAGGT TACAGAATAT TTTTCCATAA
4151	TTTTCTTGTA TAGCAGTGCA GCTTTTCCT TTGTGGTGTAA ATAGCAAAG
10 4201	CAASCAAGAG TTCTATTACT AAACACAGCA TGACTCAAAA AACCTAGCAA
4251	TTCTGAAGGA AAGTCCTGG GGTCTCTAC CTTCTCTTC TTTTTGGAG
15 4301	GAGTAGAATG TTGAGAGTCA GCGTAGCCT CATCATCACT AGATGGCATT
4351	TCTTCTGAGC AAAACAGGTT TTCTCATTA AAGGCATTCC ACCACTGCTC
4401	CCATTCATCA GTTCCATAGG TTGGAATCTA AAATACACAA ACAATTAGAA
15 4451	TCAGTAGTTT AACACATTAT ACACCTAAAA ATTTTATATT TACCTTAGAG
4501	CTTTAAATCT CTGTAGGTAG TTTGTCCAAT TATGTACACAC CACAGAAGTA
20 4551	AGGTTCCCTTC ACAAAAGATCC GGACCAAAGC GCCCATCGTG CCTCCCCACT
4601	CCTGCAGTTC GGGGGCATGG ATGCGGGGAT AGCGCGTGCT GGTTCTGG
4651	ATGCCGACGG ATTTGCACGT CGCGTAGAAC TCCGCAGGAT CGTCCAGCCT
4701	CAGGCAGCAG CTGAACCAAC TCGCGAGGGG ATCGAGCCCG GGGTGGGCGA
4751	AGAACTCCAG CATGAGATCC CGCGCGTGGA GGATCATCCA GCCGGCGTCC
25 4801	CGGAAAACGA TTCCGAAGCC CAACCTTCA TAGAAGGCGG CGGTGGAATC
4851	GAAATCTCGT GATGGCAGGT TGGGCGTCGC TTGGTGGTC ATTTCGAACCC
4901	CCAGAGTCCC GCTCAGAAGA ACTCGTCAAG AAGGCAGATAG AAGGCAGATGC
4951	GCTCGGAATC GGGAGCGCG ATACCGTAAA GCACCGAGGA GCGGTCAAGCC
30 5001	CATTGCCCGC CAAGCTCTTC AGCAATATCA CGGGTAGCCA ACGCTATGTC
5051	CTGATAGCGG TCCGCCACAC CCAGCGGGCC ACAGTCGATG AATCCAGAAA
5101	AGCGGCCATT TTCCACCATG ATATTCGGCA ACCAGGCATC GCCATGGGTC
35 5151	ACGACGAGAT CCTCGCCGTC GGGCATGCGC GCCTTGAGCC TGGCGAACAG
5201	TTCGGCTGGC GCGAGCCCT GATGCTCTTC GTCCAGATCA TCCTGATCGA
5251	CAAGACCGGC TTCCATCCGA GTACGTGCTC GCTCGATGCG ATGTTTCGCT
40 5301	TGGTGGTCGA ATGGGCAGGT AGCCGGATCA AGCGTATGCA GCCGCCGCAT
5351	TGCATCAGCC ATGATGGATA CTTTCTCAGG AGCAGCAAGG TGAGATGACA
5401	GGAGATCTG CCCCGGCACT TCGCCCAATA GCGAGCCATC CCTTCCCGCT
45 5451	TCAGTGACAA CGTCGAGCAC AGCTGCGCAA GGAACGCCCG TCGTGGCCAG
5501	CCACGATAGC CGCGCTCCCT CGTCTGCAAG TTCAATTGAGG GCACCGGACA
5551	GGTCGGTCTT GACAAAAAGA ACCCGGGCGCC CCTGCCTGAA CAGCCGGAAC
5601	ACGGCGGCAT CAGAGCAGCC GATTGTCTGT TGTGCCAGT CATAGCCAA
50 5651	TAGCCTCTCC ACCAAGCGG CGGGAGAACCG TCGCTGCAAT CCATCTGTT
5701	CAATCATGCG AACCGATCCT CATCCTGCTC TTGATCAGA TCTTGATCCC
5751	CTGCGCCATC AGATCCTGG CGGCAAGAAA GCCATCCAGT TTACTTTGCA
5801	GGGCTTCCCA ACCTTACCAAG AGGGCGCCCG AGCTGGCAAT TCGGTTGCG
5851	TTGCTGTCCA TAAAACCGGC CAGTCTAGCT ATCGCCATGT AAGCCCACGT
5901	CAAGCTACCT GCTTCTCTT TCGCTTGCG TTTTCCCTTG TCCAGATAGC
5951	CCAGTAGCTG ACATTCAATCC GGGGTCAAGCA CGGTTCTGC GGACTGGCTT
60 6001	TCTACGTGTT CCGCTTCCTT TAGCAGCCCT TGCGCCCTGA GTGCTTGCGG

ES 2 341 341 T3

6051	CAGCGTGAAG CTTTTGCAA AAGCCTAGGC CTCCAAAAAA GCCTCCCTCAC
6101	TACTTCTGGA ATAGCTCAGA GGGCGAGGCG GCCTCGGCCT CTGCATAAAT
6151	AAAAAAAATT AGTCAGCCAT GGGCGGAGA ATGGGCGGAA CTGGGCGGAG
6201	TTAGGGGCGG GATGGGCGG GTTGGGGCGG GGACTATGGT TGCTGACTAA
6251	TTGAGATGCA TGCCTTGCAT ACTTCTGCCT GCTGGGAGC CTGGGACTT
6301	TCCACACCTG GTTGTGACT AATTGAGATG CATGCTTGC ATACTCTGC
6351	CTGCTGGGGA GCCTGGGAC TTTCCACACC CTAACTGACA CACATTCCAC
6401	AGCTGCCTCG CGCGTTTCGG TGATGACGGT GAAAACCTCT GACACATGCA
6451	GCTCCCGAG ACGGTACAG CTTGTCTGTA AGCGGATGCC GGGAGCAGAC
6501	AAGCCCGTCA GGGCGCGTCA GCGGGTGTG GCGGGTGTG GGGCGCAGCC
6551	ATGACCCAGT CACGTAGCGA TAGCGGAGTG TATACTGGCT TAACTATGCG
6601	GCATCAGACC AGATTGTAAT GAGAGTGCAC CATATGCGGT GTGAAATACC
6651	GCACAGATGC GAAAGGAGAA AATACCGCAT CAGGCCCTCT TCCGCTTCCT
6701	CGCTCACTGA CTCGCTGCGC TCGGTGTTG GCCTGCGGCG AGCGGTATCA
6751	GCTCACTCAA AGGGCGTAAT ACGGTTATCC ACAGAATCAG GGGATAACGC
6801	AGGAAAGAAC ATGTGAGCAA AAGGCCAGCA AAAGGCCAGG AACCGTAAAA
6851	AGGCCCGGTT GCTGGCGTT TTCCATAGGC TCCGCCCGCC TGACGACCAT
6901	CACAAAATTC GACGCTCAAG TCAGAGGTGG CGAAACCCGA CAGGACTATA
6951	AAGATAACCG AGCGTTCCCC CTGGAAACCTC CCTCGTGCAC TCTCTGTTG
7001	CGACCCCTGCC GCTTACCGGA TACCTGTCCG CCTTTCTCCC TTGGGAAAGC
7051	GTGGCGCTTT CTCATAGCTC ACCGCTGTAGG TATCTCAGTT CGGTGTAGGT
7101	CGTTGCTCC AAGCTGGGCT GTGTGACGGA ACCCCCGTT CGGCCGACCC
7151	GCTGCGCCTT ATCCGGTAAC TATCGTCTTG ACTCCAAACCC GTAAAGACAC
7201	GACTTATCGC CACTGGCAGC AGCCACTGGT AACAGGATTA GCAGAGCGAG
7251	GTATGTAGGC GGTGCTACAG AGTTCTTGAA GTGGTGGCCT AACTACGGCT
7301	ACACTAGAACG CACAGTATTT GGTATCTGCG CTCTGCTGAA GCCAGTTACC
7351	TTGGGAAAAA GAGTTGGTAG CTCTTGATCC GGCAAACAAA CCACCGCTGG
7401	TAGCGGTGGT TTTTTTGTPT GCACCCAGCA GATTACCGCG AGAAAAAAAG
7451	GATCTCAAGA AGATCCTTTG ATCTTTCTA CGGGGCTCTGA CGCTCAGTGG
7501	AACGAAAATC CACGTTAACG GATTTGGTC ATGAGATTAT CAAAAAGGAT
7551	CTTCACCTAG ATCCCTTTAA ATTAAAAATG AAGTTTTAAA TCAATCTAAA
7601	GTATATATGA GTAAACTTGG TCTGACAGTT ACCAATGCTT AATCAGTGA
7651	GCACCTATCT CAGCGATCTG TCTATTTCTG TCATCCATAG TTGGCTGACT
7701	CCCCGTCGTG TAGATAACTA CGATACGGGA GGGCTTACCA TCTGGCCCCA
7751	GTGCTGCAAT GATACCGCGA GACCCACGCT CACCGGCTCC AGATTTATCA
7801	GCAATAAACCC AGCCAGCCGG AAGGGCCGAG CGCAGAAAGTG GTCCCTGCAAC
7851	TTTATCCGCC TCCATCCAGT CTATTAATTG TTGGGGGAA GCTAGAGTAA
7901	GTAGTTCGCC AGTTAATAGT TTGGCGCAACG TTGGTGCCTAT TGCTGCAGGC
7951	ATCGTGGGTGT CACGCTCGTC GTTGGGTATG GCTTCATTCA GCTCCGGTTC
8001	CCAAACGATCA AGGCCAGTTA CATGATCCCC CATGTTGTGC AAAAAAGCGG
8051	TTAGCTCCCT CGGTCCCTCGG ATCGTGTGCA GAAGTAAGTT GGCCGCAGTG

ES 2 341 341 T3

8101	TTATCACTCA TGGTTATGGC AGCACTGCAT AATTCTCTTA CTGTCATGCC
8151	ATCCGTAAGA TGCTTTCTG TGACTGGTGA GTACTCAACC AAGTCATTCT
8201	GAGAATAGTG TATGCGGCCA CGGAGTTGCT CTGCCCCGGC GTCAACACGG
8251	GATAATAACCG CGCCACATAG CAGAACCTTA AAAGTGCTCA TCATTGGAAA
8301	ACGTTCTTCG GGGCGAAAAC TCTCAAGGAT CTACCGCTG TTGAGATCCA
8351	GTTCGATGTA ACCCACTCGT GCACCCAACT GATCTTCAGC ATCTTTTACT
8401	TTCACCCAGCG TTTCTGGGTG AGCAAAACAA CGAAGGCAAA ATGCCGAAA
8451	AAAGGGAAATA AGGGCGACAC GGAAATGTTG AATACTCATA CTCTTCCTT
8501	TTCAATATTA TTGAAGCATT TATCAGGGTT ATTGTCTCAT GAGCGGATAC
8551	ATATTGAAAT GTATTTAGAA AAATAAACAA ATAGGGGTTT CGCGCACATT
8601	TCCCCGAAAAA GTGCCACCTG ACGCTAAAGA AACCAATTATT ATCATGACAT
8651	TAACCTATAA AAATAGGGGT ATCACCGAGGC CCTTCGTCT TCAAGAATT
8701	GAGCTCGGTA CCCATCAGCC AAAAAGCATG CCTGCCACAC AACATCAATT
8751	TCTGGAAAAC GCTACACTTA ATTATTCTA GTAGAACAGC TCTTTGGTTT
8801	GCCAAAAAAGA ATCACCTATA GTGGCATCTA AGCACAAAAA GGAGAAAAAA
8851	ATCACAAAGA AATGATTGAG AGGCATAATA AAAATTATCA AAAATTATG
8901	AGTTTTACGA TTTCATCTT TTCCAAGTTG AAATCATAGG GTGGCTTTAA
8951	CACAGTGACA AGGAATGTGC ATGCTGCCAT TATGGTGCTC TGCCTAAAT
9001	GGTTGGAGCC TTGTCACTGCT ACAGAGAAAC TGTCACTACAG CAGGGGGTGC
9051	CAAATTTCCA TATTTTTTTA TATCATTGAG CAGGTGCACA GAAGACCAGA
9101	AAGCACTTC TATCAGGCTG GCCTTCTCT TCCCTTCCAG TATGAACCAA
9151	AAACTGCCAA TGAAACTAGC AATTGTTAAA TTCCCTTTTC AAACAGTATT
9201	TGTGCTATCA GAACATAGTG CATTCAAAAG TCTAGCCTGA GAGAACAAACC
9251	CAGTTTTATT CATTCTCTCT ACTACCTCTC TCATTCCTCAC TGTTTGTGTT
9301	CTCCCTCCCA TTTTAATTGT CTATCTAGTC CAAACTAAGC ACACGATCCA
9351	GTCCACATTA AACAACATGT TTTCACTTTA AGTCAAATAC AAGACACCTT
9401	TAATATCAGC CCTTGTTCAT AATCGTGCTT CTAGTGACTT AATGTACATG
9451	TCACACTGTA CTGTTGGGTT TTGTGCTCTA TCATGAACAA TGTTGTGAAG
9501	GTATTAAGTG GAGAGTAAGC AGAATTAGAT TCCCTCTAATG ATGCACACCC
9551	ACACTAAGAG CAGAAATAAT ATTAAAAATA GAAGAGAG TTTTACATGA
9601	GATTTCAAAT ACCCAGGTAT GAGCTGCAGT TTCTCAAGT TAAAGCATCG
9651	AGGTTGTCAG TTACACTATT ACAGGAAACA TATGCAGAGT TTTTATTAA
9701	GTATATTAGT TTTCACATAT GTGGAATTAC TATTAACATA TTCTTTCTT
9751	TCAAATGCTT ACCATTGTAATGAGTTGT GACTTTGTGT AGGTGAGTGC
9801	ACATGACTCT GGATGCCCTAA GAGGACTGAA GAAGTGGAG TTATAGGTAG
9851	TTTTATTCTA TTGACTGTT CAGTGCTAAA AATACAACGT AGGTCCCTTA
9901	AACTGCTGTT CATGAACTTC TTAATTGATA TATCTCATGA GATCTCTAAA
9951	CTATTTTTAT TATGACACGT TTCAACCTTT TCACGTAAAC GATTTTATG
10001	TTTTATATTA ATGAACTAT ATGACACTTC CCAAAATCCC CATATTACAA
10051	ATTGAACTGTT TTCAAAGTTT TACCTTGACT TATGGGAAAT GAAAACCCAC
10101	ATTTTATAAT TTAAATGAA AATGTTTATT TTATATTCT GCAAATTCA

ES 2 341 341 T3

5
10151 CAAGGAAAGA TTAGTCACTG GTGTGTGAGA GCAGAGGGAGC ATAAGAGTTC
10201 AGGAATAGAA TCCATTATGA TTCTGGAGGC AAGGAAGAAC TGATGCCAAG
10251 GTTTCAGTAT AAGAGCAGTA TCCACTGGAA AGGATAAAAGT CACTACATCT
10301 GAGCACAGAG CAGGACATCT ACATAATGAG TGGTCACTAA TGGGCCACTG
10351 TTACACTGTT ATATGTATAA GGCTCAAGAA TGAGCACTGA GGCTGTAAGG
10401 TGTATGGGTG AGGACATCAG GATGTAACACC CAGCTCAGGT AGAGGACTCA
10451 GAGGACAGCA CAGTCAGCAT GAACTAATAA ACATCAGATA AGATAAGGCA
10501 CAGCTCAGC TATATAGGGT AAAGGGATCTT TGTAATCTG ATTGTGCATC
10551 CAGTCTAGTT CAATGTGACT TAGGAAGCCC AGTCATATGC AATCTAGAG
10601 AAGACTTTAG AGTAGAAATC TGAGGCTCAC CTCACATACC AGCAAGCGAG
10651 TGACCGATTA GTCTTAAGGC ACCACTTCTT AGACATCATG GCTTGGGTGT
10701 GGACCTTGCC ATTCCCTGATG GCAGCTGCCA AAAGTAAAGAC ATCAGAAAAA
10751 AGAGTTCCAA CGGAAATTGA ACCAGTTCCA TGAATACTCA CCTTCCTGTG
10801 TTCTTTTCAC AGGTGTCCAG GCAGAGGTGC AGCTGTTGGA GTCAGGAGCC
10851 GAAGTGAAAAA AGCCTGGGGC TTCAGTGAAG GTGTCCTGCA AGGCCTCTGG
10901 ATACACATTC ACTAATTATA TTATCCACTG GGTGAAGCAG GAGCCTGGTC
10951 AGGBCCTTGA ATGGATTGGA TATTTTAATC CTTACAATCA TGGTACTAAG
11001 TACAATGAGA AGTCAAAAGG CAGGGCCACA CTAACTGCAA ACAAAATCCAT
11051 CAGCACAGCC TACATGGAGC TCAGCAGCCT GCGCTCTGAG GACACTGCGG
30
11101 TCTACTACTG TCCAAGATCA GGACCTTATG CCTGGTTTGA CACCTGGGGC
11151 CAAGGGACCA CGGTCAACCGT CTCTTCAGGT AAGAAATGGCC ACTCTAGGGC
11201 CTTTGTTTTC TCCCTCTGCC TGTGGGATT CATGAGGCAATT CCAAAAGTTGT
11251 CCTCGGGACA TGTTCGGAGG GGACCTGGGC GGACTGGCCA CGAGGGGAGC
11301 GGCACGGGGG TGCCCTGAGG ATCTGGGAGC CTCTGTGGAT TTTCCGATGC
11351 CTTTGGAAAAA TGGGACTGAG GTTGGGTGCG TCTGAGACAG TAACTCAGCC
40
11401 TGGGGGCTTG GTGAAGATCG CCAGCACAGCA GCGAGTCCGT GAAATATCTT
11451 ATTTAGACTT GTGAGGTGCG CTGTGTGTCA ATTTACATCT TAAATCCTTT
11501 ATTGGCTGGA AAGAGAATTG TICGGAGTGGG TGAATCCAGC CAGGAGGGAC
11551 GCGGGGGGAT CCA
45

SEQ ID NO: 41

50 Secuencia de nucleótido de la expresión del vector HCVHQSp20

1 CTAGAGAGGT CTGGTGGAGC CTGCAAAAGT CCAGCTTCA AAGGAACACA
55 51 GAAGTATGTG TATGGAATAT TAGAAGATGT TGCTTTACT CTTAAGTGG
101 101 TTCCTAGGAA AAATAGTTAA ATACTGTGAC TTTAAAATGT GAGAGGGTTT
151 151 TCAAGTACTC ATTTTTTAA ATGTCCAAA TTTTGTCAA TCAATTGAG
60 201 GTCTTGTGG TGTAGAACTG ACATTACTTA AAGTTAACCG GAGGAATGGG
251 251 AGTGAGGCTC TCTCATACCC TATTCAAGAAC TGACTTTAA CAATAATAAA
301 301 TTAAGTTAA AATATTTTA AATGAATTGA GCAATGTTGA GTTGGACTCA
351 351 AGATGGCCGA TCAGAACCCAG AACACCTGCA GCAGCTGGCA GGAAGCAGGT
401 401 CATGTGGCAA GGCTATTG GGAAGGGAAA ATAAAACCAC TAGGTAAACT

ES 2 341 341 T3

451	TGTAGCTGTG GTTTGAAGAA GTGGTTTGA AACACTCTGT CCAGCCCCAC
501	CAAACCGAAA GTCCACGGCTG AGCAAAACAC CACCTGGGTA ATTTGCATTT
551	CTAAAATAAG TTGAGGGATTG AGCCGAAACT GGAGAGGTCC TCTTTTAACCT
601	TATTGAGTTC AACCTTTTAA TTTTAGCTTG AGTAGTTCTA GTTTCCCCAA
651	ACTTAAGTTT ATCGACTTCT AAAATGTATT TAAGCTTCT GGGGCAGGCC
701	AGGCCTGACC TTGGCTTTGG GGCAGGGAGG GGGCTAAGGT GAGGCAGGTG
751	GCGCCAGCCA GGTGCACACC CAATGCCAT GAGCCCAGAC ACTGGACGCT
801	GAACCTCGCG GACAGTTAAG AACCCAGGGG CCTCTGCGCC CTGGGGCCAG
851	CTCTGTCCCA CACCGCGGTC ACATGGCACC ACCTCTCTTG CAGCCCTCCAC
901	CAAGGGCCCA TCGGTCTTCC CCCTGGCACC CTCCCTCCAAG AGCACCTCTG
951	GGGGCACAGC GGCCTGGGC TGCCTGGTCA AGGACTACTT CCCCCGAACCG
1001	GTGACGGTGT CGTGGAACTC AGGCGCCCTG ACCAGCGGGCG TGACACACCTT
1051	CCCGGCTGTC CTACAGTCCT CAGGACTCTA CTCCCTCAGC AGCGTGGTGA
1101	CCGTGCCCTC CAGCAGCTTG GGCACCCAGA CCTACATCTG CAACGTGAAT
1151	CACAAGCCCA GCAACACCAA GGTGGACAAG AGAGTGGTG AGAGGCCAGC
1201	ACAGGGGAGGG AGGGTGTCTG CTGGAAAGCCA GGCTCAGCGC TCCTGCCTGG
1251	ACGCATCCCG GCTATGCCAGT CCCAGTCCAG GGCAGCAAGG CAGGCCCCGT
1301	CTGGCTCTTC ACCCGGAGGC CTCTGCCCGC CCCACTCATG CTCAGGGAGA
1351	GGGTCTTCTG GCTTTTTCCC CAGGCTCTGG GCAGGCACAG GCTAGGTGCC
1401	CCTAACCCAG GCCCTGCACA CAAAGGGCA GGTGCTGGGC TCAGACCTGC
1451	CAAGAGCCAT ATCCGGGAGG ACCCTGGCCC TGACCTAAGC CCACCCAAA
1501	GGCCAAACTC TCCACTCCCT CAGCTCGGAC ACCTCTCTC CTCCAGATT
1551	CCAGTAACTC CCAATCTTCT CTCTGCAGAG CCCAAATCTT GTGACAAAC
1601	TCACACATGC CCACCGTGCC CAGGTAAGCC AGCCAGGCC TGGCCCTCCA
1651	GCTCAAGGCG GGACAGGTGC CCTAGAGTAG CCTGCATCCA GGGACAGGCC
1701	CCAGCCCCGGT GCTGACACGT CCACCTCCAT CTCTCTCTCA GCACCTGAAC
1751	TCCTGGGGGG ACCGTCAGTC TTCCCTCTCC CCCCCAAACCC CAAGGACACC
1801	CTCATGATCT CCCGGACCCC TGAGGTCACT TGGGTGGTGG TGGACGTGAG
1851	CCACGAAGAC CCTGAGGTCA AGTTCAACTG GTACGTGGAC GGGGTGGAGG
1901	TGCATAATGC CAAGACAAAG CGCGGGAGG ACCAGTACAA CAGCACGTAC
1951	CGTGTGGTCA GCGTCCTCAC CGTCCTGCAC CAGGACTGGC TGAATGGCAA
2001	GGAGTACAAG TGCAAGGTCT CCAACAAAGC CCTCCCAGCC CCCATCGAGA
2051	AAACCATCTC CAAAGCCAAA GGTGGGACCC GTGGGGTGG AGGCCACAT
2101	GGACAGAGGC CGGCTGGGCC CACCCCTCTGC CCTGAGAGTG ACCGCTGTAC
2151	CAACCTCTGT CCCTACAGGG CAGCCCCGAG AACCAACAGGT GTACACCCCTG
2201	CCCCCATCCC GGGAGGAGAT GACCAAGAAC CAGGTCAAGCC TGACCTGCCT
2251	GGTCAAAGGC TTCTATCCCA GCGACATGCC CGTGGAGTGG GAGAGCAATG
2301	GGCAGCCGGA GAACAACATAC AAGACCAAGC CTCCCGTGT CGACTCCGAC
2351	GGCTCCTTCT TCCTCTATAG CAAGCTCACC GTGGACAAGA GCAGGTGGCA
2401	GCAGGGGAAAC GTCTCTCTAT GCTCCGTGAAT GCATGAGGCT CTGCACAAACC
2451	ACTACACGCA GAAGAGCCTC TCCCTGTCCC CGGGTAAATG AGTGCACACGG

ES 2 341 341 T3

5	2501	CCGGCAAGCC CCCGCTCCCC GGGCTCTCGC GGTGGCACGA GGATGCTTGG
	2551	CACGTACCCCC GTCTACATAC TTCCCAGGCA CCCAGCATGG AAATAAAGCA
	2601	CCCACCACTG CCCTGGGCCCC CTGGGAGACT GTGATGGTTC TTTCACGGG
	2651	TCAGGGCGAG TCTGAGGCCT GACTGGCATE ACCGGAGGCAG AGGGGGTCCC
10	2701	ACTGTCCCCA CACTGGCCCA GGCTGTGCAG GTGTGGCTGG CCCGCCTAGG
	2751	GTGGGGCTCA CCCAGGGCT GCCCTCGGCA CGGTGGGGGA TTGGCCAGCG
	2801	TGGCCCTCCC TCCAGCAGCA GCTGCCCTGG GCTGGGCCAC GAGAAGCCCT
	2851	AGGAGCCCT GGGGACAGAC ACACAGCCCC TGCCTCTGTA GGAGACTOTC
15	2901	CTGTCCTGTG AGCGCCCTGT CCTCCGACCC CGATGCCAC TCGGGGGCAT
	2951	GCCTAOTCCA TGGCGGTAGG GACAGGCCCT CCCTCACCCA TCTACCCCCA
	3001	CGGCACTAAC CCCTGGCAGC CCTGCCAGC CTCGCACCCC CATGGGGACA
	3051	CAACGGACTC CGGGGACATG CACTCTCGGG CCCTGTGGAG GGACTGGTGC
20	3101	AGATGCCAC ACACACACTC AGCCCAGACC CGTCAACAA ACCCGCACT
	3151	GAGGTTGGTC GAGGGGGAGT CGGGCCAGAG CCTGCCTCGG CGCTCAAGGGA
	3201	GGACTCCCGG GCTCACTCGA AGGAGGTGCC ACCATTTAG CTTGGTAC
	3251	TTTCTTCTT CTTTAAATT TTCTAAGCT CATTAATTGT CTTTGATGTT
25	3301	TCTTTTGTA TGACAATAAA ATATCCTTT TAAGTCTTGT ACTTCGTGAT
	3351	GGGAGCCGCC TTCTGTGTC CACGGCCCTC CTGCCCCGG TGGGAAGCAC
	3401	GGTCAGGGAGG AGGCTGGTCC AGCTGCACCT CGGGGGCTCC CTGCACTCGC
30	3451	CCCCCGCTC CTGCAGCCAC ACGCATTGCC CGAGCGACCC TCCCTGGCCC
	3501	CTGTCACTAC ATGGACCCCT GGGGCTTCTC CTCTTTCTA CATGGATGCA
	3551	GTTCTCCTC CTGCTGGCA CGGTCTGTC TGCCCTGGTC ACTCTGGGG
35	3601	GGACAGGGCC TCCAGGGAAA GCTGGGTCGA GGCTGGGAGC TGGCTCAGGC
	3651	TGGCCAGGCA GAGCCACAGG GAGGGCCCTTC CAGAACCAAC CATGGTCCGA
	3701	AGCCGAGAGGT GGGTGTAGA TCCRGACATG ATAAGATACA TTGATGAGTT
40	3751	TGGACAAACC ACAACTAGAA TGCACTGAAA AAAATGCTTT ATTTGTGAAA
	3801	TTTGTGATGC TATTGCTTTA TTGTAAACCA TTATAAGCTG CAATAAACAA
	3851	CTTAACAAACA ACAATTGCAT TCATTTATG TTTCAGGTTC AGGGGGAGGT
	3901	GTGGGAGGTT TTTAAAGCA AGTAAACCT CTACAAATGT GGTATGGCTG
45	3951	ATTATGATCT CTAGTCAGG CACTATACAT CAAATATTCC TTATTAACCC
	4001	CTTTACAAAT TAAAAAGCTA AAGGTACACA ATTTTGAGC ATAGTTATTA
	4051	ATAGCAGACA CTCTATGCC GTGTGGAGTA AGAAAAAACCA GTATGTTATG
50	4101	ATTATAACTG TTATGCTAC TTATAAAGGT TACAGAATAT TTTTCAAA
	4151	TTTCTTGTGTA TAGCAGTGCA GCTTTTCCT TTGTGGTGTAAATAGCAAAG
	4201	CAAGCAAGAG TTCTATTACT AAACACAGCA TGACTAAAAA AACTTAGCAA
	4251	TTCTGAAGGA AAGTCCTTGG GGTCTTCTAC CTTTCTCTTC TTTTTTGGAG
55	4301	GAGTGAATG TTGAGAGTC GCAAGTAGCCT CATCATCACT AGATGGCATT
	4351	TCTTCTGAGC AAAACAGGGTT TTCTCATTA AAGGCATTCC ACCACTGCTC
	4401	CCATTICATCA GTTCCATAGG TTGGAATCTA AAATACACAA ACAATTAGAA
60	4451	TCAGTAGTTT AACACATTAT ACACCTAAAAA ATTTTATATT TACCTTAGAG
	4501	CTTTAAATCT CTGTAAGGTAG TTGTCCAAT TATGTCACAC CACAGAAGTA

ES 2 341 341 T3

4551	AGGTTCCCTTC ACAAAAGATCC GGACCAAAGC GGCCATCGTG CCTCCCCACT
4601	CCTGCAGTTC GGGGCATGG ATGGCGGGAT ASCCGCTGCT GGTTTCTGG
5 4651	ATGCCGACGG ATTGCACTG CCGGTAGAAC TCCCGGAGGT CGTCCAGCCT
4701	CAGGCAGCAG CTGAACCAAC TCGCGAGGGG ATGGAGCCC CGGTGGCGA
4751	AGAACTCCAG CTTGAGATCC CGCGCTGGA GGATCATCCA CCCGGCGTCC
10 4801	CGGAAAAACGA TTCGGAAGCC CAACCTTCA TAGAAGGCGG CGGTGGAATC
4851	GAAATCTCGT GATGGCAGGT TGGCGCTCGC TTGGTCCGTC ATTTGAAACC
4901	CCAGAGTCCC GCTCAGAAGA ACTCGTCAAG AAGGCGATAG AAGGCGATGC
15 4951	GCTGCGAATC CGGAGCGGGCG ATACCGTAAA GCACGAGGAA GCGGTAGGCC
5001	CATTCGCCCGC CAAGCTCTTC AGCAATATCA CGGGTAGCCA ACCCTATGTC
5051	CTGATAGCGG TCGGCCACAC CGAGCCGGCC ACAGTGGATG AATCCAGAAA
5101	AGCAGGCCATT TTCCACCATG ATATTGGCA AGCAGGCATC GCCATGGTC
20 5151	ACGACGAGAT CCTCGCCGTC GGGCATGCAGC GCCTTGAGCC TGGCGAACAG
5201	TTCGGCTGGC GCGAGCCCT GATGCTCTTC GTCCAGATCA TCTGATCGA
5251	CAAGACCGGC TTCCATCGA GTACGTGCTC GCTCGATGCC ATGTTTCGCT
25 5301	TGGTGGTCGA ATGGGCAGGT AGCCGGATCA AGCGTATGCA GCGCCCGCAT
5351	TGCATCAGCC ATGATGGATA CTFTCTCGGC AGGAGCAAGG TGAGATGACA
5401	GGAGATCTTG CCCCCGGCACT TCGCCCAATA GCAGCCAGTC CCTTCCCGCT
30 5451	TCACTGACAA CGTCGAGCAC AGCTGCCAA GGAAAGCCCCG TCGTGGCCAG
5501	CCACGATAQC CGCGCTGCCCT CGTCTGCGAG TTCAATTGAGG GCACCGGACA
5551	GGTCGGTCTT GACAAAAAGA ACCGGGGGCC CCTGCGCTGA CAGCCGGAAC
5601	ACGGCGGCAT CAGAGCAGCC GATTGTCGTG TGTGCCAGT CATAGCCGAA
35 5651	TAGCCTCTCC ACCCAAGCGG CGGGAGAACCC TGCCTGCAAT CCATCTTGT
5701	CAATCATGCG AAACGATCCT CATCCTGTCT CTTGATCAGA TCTTGATCCC
5751	CTGCGCCATC AGATCCTTGG CGGCAAGAAA GCCATCCAGT TTACTTGC
40 5801	GGGCTTCCCA ACCTTACAG AGGGCGCCCC AGCTGGCAAT TCCGGTTGCG
5851	TTGCTGTCCA TAAAACCGCC CAGTCTAGCT ATGCCATGT AAGCCCACTG
5901	CAAGCTACCT GCTTTCTCTT TGCCTTGCG TTTTCCCTTG TCCAGATAGC
45 5951	CCAGTAGCTG ACATTCATCC GGGGTCAGCA CGCTTCTGC GGAATGGCTT
6001	TCTACGTGTT CGCCTTCCTT TAGCAGCCCT TGCCTCCCTGA GTGCTTGCGG
6051	CAGCGTGAAG CTTTTGCAA AAGCCTAGGC CTCCAAAAAA GCCTCCCTCAC
6101	TACTCTGCA ATAGCTCAGA GGCGGAGGGG CCCTCGGCCT CTGCATAAAT
50 6151	AAAAAAATT AGTCAGCCAT GGGCGGAGA ATGGGGGAA CTGGCGGAG
6201	TTAGGGCGG GATGGGCGGA GTTAAGGGCGG GGACTATGGT TGCTGACTAA
6251	TTGAGATGCA TGCTTGCAT ACTTCTGCTC GCTGGGAGC CTGGGGACTT
55 6301	TCCACACCTG GTTGCTGACT AATTGAGATG CATGCTTGC ATACTTCTGC
6351	CTGCTGGGGA GCCTGGGGAC TTTCCACACC CTAACGACA CACATTCAC
6401	AGCTGCCCTCG CGCGTTTCGG TGATGACGGT GAAAACCTCT GACACATGCA
6451	GCTCCCGGAG ACGGTACAG CTTGTCTGTA AGGGGAAGCC GGGAGCAGAC
6501	AAGCCCGTCA GGGCGGTCA GCGGGTGTG GCGGGTGTG GGGCGCAGCC
6551	ATGACCCAGT CACGTAGCGA TAGCGGAGTG TATACTGGCT TAACTATGCG

ES 2 341 341 T3

6601	GCATCAGAGC AGATTGTACT GAGAGTCAC CATATCGGT GTGAAATACC
6651	GCACACATGC GTAAGGAGAA AATACCGCAT CAGGGCTCT TCCGCTTQCT
6701	CGCTCACTGA CTGGCTGGC TCGGTGCTTC GGCTGGGGG AGCGGTTATCA
6751	GCTCACTCAA AGCGGTTAAT ACGGTTATCC ACAGAATCAG GGGATAACGC
6801	AGGAUAGAAC ATGTGAGCAA AAGGCCACCA AAAGGCCAGG AACCGTAAAA
6851	AGGCCCGTT CCTGGCGTTT TTCCATAGGC TCCGCCCCC TOACGAGGAT
6901	CACAAAAATC GACGCTCAAG TCAGAGGTGG CGAAACCCGA CAGGACTATA
6951	AAGATACCAG GCGTTTCCCC CTGGAAGCTC CCTCGTGGC TCTCTGTTC
7001	CGACCCCTGCC GCTTACCGGA TACCTGTCCG CCTTTCTCCC TTGGGAAGC
7051	GTGGCGCTTT CTCATAGCTC ACGCTGTAGG TATCTCAGTT CGGTGTAGGT
7101	CGTTCGGTCC AAGCTGGCT GTGTGCACGA ACCCCCCGTT CAGCCCGAAC
7151	GCTGCGCCTT ATCCGTAAC TATCGTCTTG AGTCCAACCC GGTAAGACAC
7201	GACTTATCGC CACTGGCAGC AGCCACTGGT AACAGGATTA GCGAGGGAG
7251	GTATGTAGGC CGTGCTACAG AGTTCTTGAA GTGGTGGCT AACTACGGCT
7301	ACACTAGAAG GACAGTATTT GGTATCTGCG CTCTGCTGAA GCCAGTTACC
7351	TTCCGAAAAAA GAGTTGGTAG CTCTTGATCC GGCAAACAAA CCACCGCTGG
7401	TAGCGGTGGT TTTTTTGTAA GCAAGCAGCA GATTACCGCG AGAAAAAAAG
7451	GATCTCAAGA AGATCCTTTG ATCTTTCTA CGGGGTCTGA CGCTCAGTGG
7501	AACGAAAAACT CACGTTAAGG GATTTGGTC ATGAGATTAT CAAAAAGGAT
7551	CTTCACCTAG ATCCTTTAA ATTAAAAATG AAGTTTAAA TCAATCTAAA
7601	GTATATATGA GTAAACTTGG TCTGACAGTT ACCAATGCTT AATCAGTGAG
7651	GCACCTATCT CAGCGATCTG TCTATTTGGT TCATCCATAG TTGGCTGACT
7701	CCCCGTGCGT TAGATAACTA CGATACGGGA GGGCTTACCA TCTGGCCCCA
7751	GTGCTGCAAT GATACCGCGA GACCCACGCT CACCGGCTCC AGATTTATCA
7801	GCAATAAACCG AGCCAGCCGG AAGGGCCGAG CGCAGAAGTG GTCCCTGCAC
7851	TTTATCCGCC TCCATCCAGT CTATTAATTG TTGCCCCGAA GCTAGAGTAA
7901	GTAGTTCGCC AGTTAATAGT TTGCGCAGC TTGTTGCCAT TGCTGCAGGC
7951	ATCGTGGTGT CACGCTCGTC GTTGGTATG GCTTCATTCA GCTCCGGTTC
8001	CCAACGATCA AGGCGAGTTA CATGATCCCC CATGTTGTGC AAAAAAGCGG
8051	TTAGCTCCCTT CGGTCTCTCG ATCGTTGTCGA GAAAGTAAGTT GGCCGGAGTG
8101	TTATCACTCA TGGTTATGGC AGCACTGCAT AATTCTTTA CTGTCATGCC
8151	ATCCGTAAGA TCTTTTCTG TGACTGGTGA GTACTCAACC AAGTCATTCT
8201	GAGAATAGTG TATGCGGCCA CGAGTTGCT CTTGCCGGC GTCAACACGG
8251	GATAATACCG CGCCACATAG CAGAACTTTA AAAGTGCTCA TCATTGGAAA
8301	ACGTTCTTCG GGCGAAAAAC TCTCAAGGAT CTTACCGCTG TTGAGATCCA
8351	TTTCGATGTA ACCCACTCGT CCACCCAACT GATCTTCAGC ATCTTTTACT
8401	TTCACCGAGCG TTTCTGGTGC AGCAAAACAA GGAGGCAGA ATGCCGCAA
8451	AAAGGAAATA AGGGCGACAC GGAAATGTTG AATACTCATA CTCTTCCCTT
8501	TTCAATATTA TTGAAGCATT TATCAGGGTT ATTGTCTCAT GAGCGGATAC
8551	ATAATTGAAAT GTATTTAGAA AAATAAAACAA ATAGGGGTTG CGCGCACATT
8601	TCCCCGAAAAA GTGCCACCTG ACGTCTAAGA AACCAATTATT ATCATGACAT

ES 2 341 341 T3

8651	TAACCTATAA AAATAGGCCT ATCACGGAGGC CCTTTCGTCT TCAAGAATT
8701	GAGCTCGGTA CCCATCAGCC AAAAAGCATG CCTGCCACAC AACATCAATT
8751	TCTGGAAAAAC GCTACACITTA ATTATTTCTA GTAGAACAGC TCTTGGTTT
8801	GCCAAAAAAGA ATCACCTATA GTGGCATCTA AGCACAAAAA GGAGAAAAAA
8851	ATCACAAAGA AATGATTGAG AGGCATAATA AAAATTATCA AAAAATTATG
8901	AGTTTACGA TTTCATCTT TTCCAAGTTG AAATCATAGG GTGGCTTAA
8951	CACAGTGACA AGGAATGTGC ATGCTGCCAT TATGGTGCTC TGCCTAAAT
9001	GGTTGGAGCC TTGTCATGCT ACAGAGAAC TGTACATACAG CAGGGGGTGC
9051	CAAATTTCCA TATTTTTTTA TATCATTGAG CAGGTGCACA GAAGACCAGA
9101	AAGCACTTTC TATCAGGCTG GCCTTCCTCT TCCCTTCCAG TATGAAGCAA
9151	AAACTGCCAA TGAAACTAGC AATTGTTAA TTCTTTTTTC AAACAGTATT
9201	TGTGCTATCA GAACATAGTG CATTCAAAAG TCTAGCCTGA GAGAACAAACC
9251	CAGTTTATT CATCCTCTC ACTACCTCTC TCATTCCCAC TGTGTGTGTT
9301	CTCCCTCCCA TTTTAATTGT CTATCTAGTC CAAACTAAGC ACACGATCCA
9351	GTCCACATTA AACAAACATGT TTTCACTTTA AGTCATATAC AAGACACCTT
9401	TAATATCAGC CCITGTTCAT AATCGTGCCT CTAGTGACTT AATGTCATG
9451	TCACACTGTA CTGTTGGGT TTGTGTCTCA TCATGAACAA TGTTGTGAAG
9501	GTATTAAGTG GAGAGTAAGC AGAATTAGAT TCCTCTAATG ATGCACACCCC
9551	ACACTAAGAG CAGAAATAAT ATTTAAAATA GAAAAAAAG TTTTACATGA
9601	GATTTCAAT ACCCAGGTAT GAGCTGCAGT TTCTTCAGT TAAAGCATCG
9651	AGGTTGTCAG TTACACTATT ACAGGAAACA TATGCAGAGT TTTTTTTTA
9701	GTATATTAGT TTTCACATAT GTGGAATTAC TATTAAACTA TTCTTTCTT
9751	TCAAATGCTT ACCATTGTAATGAGTTGTT GACTTTGTGT AGGTGAGTGC
9801	ACATGACTCT GGATGCCCTAA GAGGACTGAA GAAGTTGGAG TTATAGGTAG
9851	TTTTATTCTA CTTGACTGTT CAGTGCTAA AACACAACTG AGGTCTTTA
9901	AACTGCTGTT CATGAACTTC TTAATTGATA TATCTCATGA GATCTCTAAA
9951	CTATTTTAT TATGACACACGT TTTCACCATTT TCACTGTAAC GATTTTATG
10001	TTTTATATTA ATGTAACATAT ATGACACTTC CCAAAATCCC CATATTACA
10051	ATTGAACTGT TTCAAAGTTT TACCTTGACT TATGGAAAT GAAAACCCAC
10101	ATTTTATAAT TTAAATGAA AATGTTTATT TTATATTCTC CCAAATTTC
10151	CAAGGAAAGA TTAGTCACTG GTGTGTGAGA GCAGAGGAGC ATAAGAGTTC
10201	AGGAATAGAA TCCATTATGA TTCTGGAGGC AAGGAAGAAC TGATGCCAAG
10251	GTTTCAGTAT AAGAGCAGTA TCCACTGGAA AGGATAAAAGT CACTACATCT
10301	GAGCACAGAG CAGGACATCT ACATAATGAG TGTCACTAA TGGGCCACTG
10351	TTACACTGTT ATATGTATAA GGCTCAAGAA TGAGCACTGA GGCTGTAAGG
10401	TGTATGGGTG AGGACATCAG GATGTAACCC CAGCTCAGGT AGAGGACTCA
10451	GAGGACAGCA CAGTCAGCAT GAACTAATAA ACATCAGATA AGATAAGGCA
10501	CAAGCTCAGC TATATAGGGT AGGGATCTT TGTAATCTG ATTGTGCATC
10551	CAGTCTAGTT CAATGTAAC TACAGGAAAGCC AGTCATATGC AAATCTAGAG
10601	AAGACTTTAG AGTAGAAATC TGAGGCTCAC CTCACATACC AGCAAGCCAG
10651	TGACCAGTTA GTCTTAAGGC ACCACTCTT AGACATCATG CCTTGGGTGT

5 **10701** GGACCTTGCC ATTCCCTGATG GCAGCTGCC AAAAGTAAGAC ATCAGAAAAA
 10751 AGAGTTCCAA GGGGAATTGA AGCAGTTCCA TGAATACTCA CCTTCCTGTG
 10801 TTCTTTTCAC AGGTGTCCAG GCACAGGTGC AGCTGGTGG A GTCAGGAGCC
 10851 GAAGTGAAAA AGCCCTGGGC TTCAGTGAAG GTGTCCGTCA AGGCCTCTGG
 10901 ATACACATTC ACTAATTATA TTATCCACTG GGTGAAGCAG GAGCCTGGTC
 10951 AGGGCCTTGA ATGGATTGGA TATTTAATC CTTACAATCA TGGTACTAAG
 10 **11001** TACAATGAGA AGTTCAAAGG CAGGGCCACA CTAACGTCAA ACAAAATCCAT
 11051 CAGCACAGCC TACATGGAGC TCAGCAGCCT GCGCTCTGAG GACACTGCGG
 15 **11101** TCTACTACTG TGCAAGATCA GGACCCATATG CCTGGTTGA CACCTGGGGC
 11151 CAAGGGACCA CGGTCAACCGT CTCCTCAGGT AAGAATGGCC ACTCTAGGGC
 11201 CTTTGTTTTC TGCTGCTGCC TGTGGGATTT CATGAGCATT GCAAAGTTGT
 11251 CCTCGGGACA TGTTCGAGG GGACCTGGGC GGACTGGCCA GGAGGGGACG
 20 **11301** GGCACTGGGG TGCCCTGAGG ATCTGGGAGC CTCTGTGGAT TTTCCGATGC
 11351 CTTTGGAAAA TGGGACTGAG GTTGGGTGCG TCTGAGACAG TAACTCAQCC
 11401 TGGGGGCTTG GTGAAGATCG CCGCACAGCA GCGAGTCCGT GAAATATCTT
 25 **11451** ATTTAGACTT GTGAGGTGCG CTGTGTGTCA ATTTACATCT TAAATCCTTT
 11501 ATGGCCTGGA AAGACAAATTG TTGGAGTGGG TGAATCCAGC CAGGAGGGAC
 11551 GCGGGGGGAT CCA

30 **Ejemplo 9**

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

VHE/humV1 y VHQ/humV1

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

40 **Células y Reactivos**

45 Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aíslan de las muestras de leuocitosis 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).

50 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, estreptomicina y L-glutamina.

Ensayos de Apoptosis

55 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 químérico que se une al CD45R0/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 μ g/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.

65 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 teñido con la AnnexinV-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.

ES 2 341 341 T3

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

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

A₁: valor final (para las sesiones de ajuste establecidas en “compartido” y “flotante”)

A₂: valor inicial (para las sesiones de ajuste establecidas en “compartido” y “flotante”)

P: poder

X₀: ED₅₀; IC₅₀ (ver adelante).

En ausencia del reticulador, el VHE/humV1 es más efectivo, con un valor ED₅₀ de 148±71 nM, seguido por VHQ/humV1 con 377±219 nM. El anticuerpo químérico que se une CD45R0/RB es menos efectivo con un valor ED₅₀ de 2440±1205 nM.

En la presencia de antisuero de reticulación, los valores ED₅₀ 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 CD45R0/RB son igualmente efectivos y mejor o iguales comparados con el mAb químérico que se une a CD45R0/RB con respecto a su capacidad para inducir apoptosis a células T humanas primarias.

35 *Ensayo de linfocito mezclado*

Uno x 10⁵ PBMC o 5 x 10⁴ de las células CD4+ se mezclan con PBMC irradiado del que se han agotado 1x 10⁵ o 5 x 10⁴ 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.

45 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 IC₅₀ (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 químérico parental (IC₅₀ de 347 ± 434 nM). Como se ve usualmente con los experimentos MLR, la variabilidad del donante es alta en estos experimentos.

VHE-N73D/humV1

55 Para manejar el efecto biológico del VHE-N73D/humV1 que induce apoptosis en las células mononucleares periféricas sanguíneas humanas (PBMC) 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 químérico o un mAb de control IgG1 isotipo. Además, se agregan los fragmentos F(ab')₂ de reticulación del IgFc antihumano de cabra a 2 x 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 1x10⁵ células por pozo. Cada muestra de célula se incuba durante 30 minutos a 4°C en 50 µl de amortiguador FACS que contiene 100 µg/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. Despues de lavar dos

5 veces mediante centrifugación, las células se resuspenden en 100 μ l de amortiguador que tiene 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.

10 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 15 reticulación.

Ejemplo 10

20 *Especificidad de la molécula de unión CD45RB/RO*

Molécula de unión CD45RB/RO químérica

25 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 químérico 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 químérico que se denomina CD45RB/RO conjugado con tinte, seguido por análisis de citometría de flujo.

30 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 químérica 35 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

40 Con el fin de determinar la reactividad del subconjunto de leucocitos de la marcación inmunofluorescente del VHEN73D/humV1 de los leucocitos marcados con marcadores específicos e inmunofluorescencia simultánea se efectúa la marcación con un VHEN73D/humV1 conjugado con tinte, seguido por análisis de citometría de flujo.

45 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 humanos. Así, las moléculas de VHE-N73D/humV1 no reaccionan con 50 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 químérico 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 60 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 químérico 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 65 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 químérico que se una 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.

ES 2 341 341 T3

En razón de esta inducción de las células reguladoras T supresoras por medio del anticuerpo químico 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.

5 Para demostrar la capacidad de una molécula que se une a CD45RO/RB química 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 influencia como se subrayó anteriormente. La parálisis se evalúa al activar las 10 células T (expuestas antes al anticuerpo químico que se une a CD45RO/RB) con el antígeno MP1 presentado por la molécula que se une al APC Nº CD45RO/RB está presente en este cultivo. Las células CD8+ T no expuestas al anticuerpo químico que se une al CD45RO/RB previamente producen IFN- γ luego del estímulo mencionado. En contraste, las células CD8+ T pretratadas con anticuerpo químico que une CD45RO/RB muestran una producción 15 marcadamente reducida a inexistente de esta citocina en respuesta al estímulo de antígeno, que demuestra la capacidad del anticuerpo químico 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.

20

Ejemplo 12

Estudios in vivo en ratones Skin SCID-hu

25

El beneficio terapéutico del anticuerpo químico 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.

30

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

35

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 /Gmstac-Prkdc^{scid} Lyst^{tg} (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 químico que se une al CD45RB/RO.

40

Inseto de células mononucleares en ratones SCID

45

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 ~5 x 10⁸ 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.

50

Tratamiento de anticuerpo de los ratones Skin SCID-hu

55

Los ratones Skin SCID-hu, reconstituidos con Spl humano, se tratan con anticuerpo químico 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.).

55

Evaluación del tratamiento anti-CD45

60

La eficacia del anticuerpo químico 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 dfas) como un 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.

ES 2 341 341 T3

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 hiperqueratocicas.

- 5 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 transferido hacia los ratones Skin SCID-hu (en el día experimental 0, aproximadamente 6 semanas después del trasplante de piel) infiltran los injertos de piel 10 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.

15 El tratamiento de estos con el anticuerpo químérico 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.

20 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 25 pronunciadas. En contraste los injertos de piel de todos los ratones tratados con anticuerpo químérico 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 30 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 químérico que se une con CD45RB/RO exhibe un estado saludable durante el tiempo completo del experimento.

35 Ejemplo 13

Actividades *in vivo* de un anticuerpo químérico que se une a CD45RB/RO en un modelo de trasplante de célula islo 40 humano

40 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 45 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.

50 Preparación de islo y trasplante

Los páncreas se obtienen de donantes multiórgano cadávericos 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 55 10% de FCS, 1% de L-glutamina, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina (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.

60

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 químérico 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).

ES 2 341 341 T3

Análisis histológico

5 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 mA_B biotinilado contra insulina humana o CD3 humano seguido por conjugado de estreptavidina-peroxidasa. Se utiliza diaminobenzidina (DAKO, Carpenteria, 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

10 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 15 humanos con una tasa de supervivencia mayor del 70% del día 60 y 50% en el día 100 postrasplante.

20 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 químérico 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 químérico que se une con CD45RB/RO comparado con los ratones receptores de control. Un islote trasplantado y con un anticuerpo químérico que se une con CD45RB/RO tratado en ratones hu-PBL-NOD/SCID con islote trasplantado y tratados con anticuerpo químérico que se une a CD45RB/RO cantidades inferiores de IFN- γ humana se detectan 25 en el suero comparado con los ratones receptores de control.

25 Estos datos indican que el tratamiento de corto plazo con el anticuerpo químérico 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*.

30

35

40

45

50

55

60

65

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.

10 2. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 1 que tiene una especificidad de unión tanto por el CD45RO como el CD45RB que comprende:

15 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

25 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.

35 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.

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.

45

50

55

60

65

Figura 1

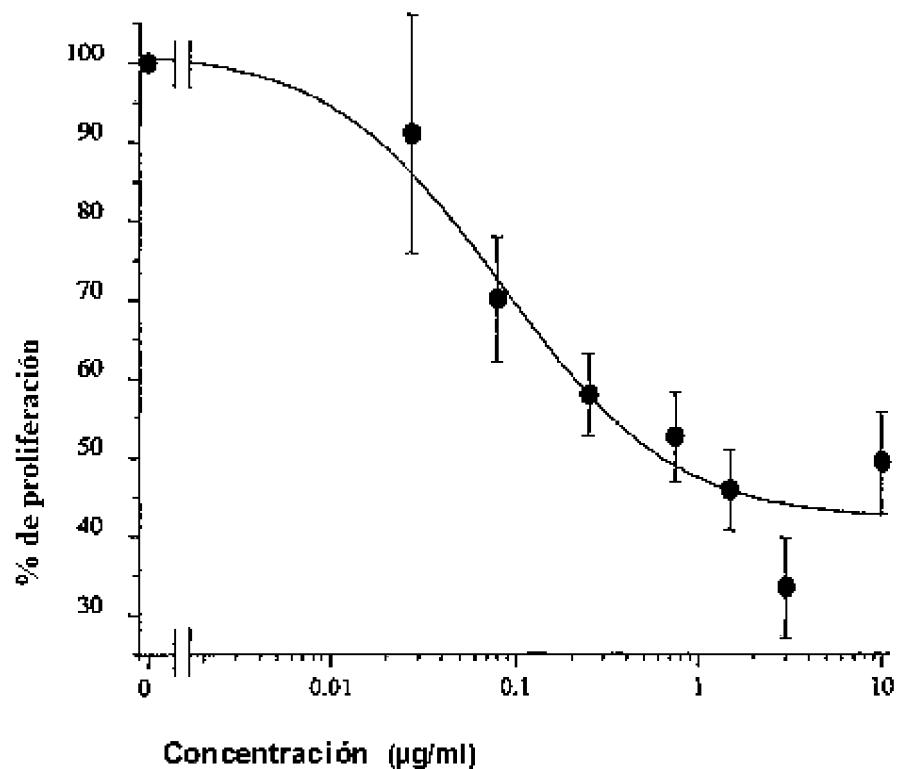


Figura 2

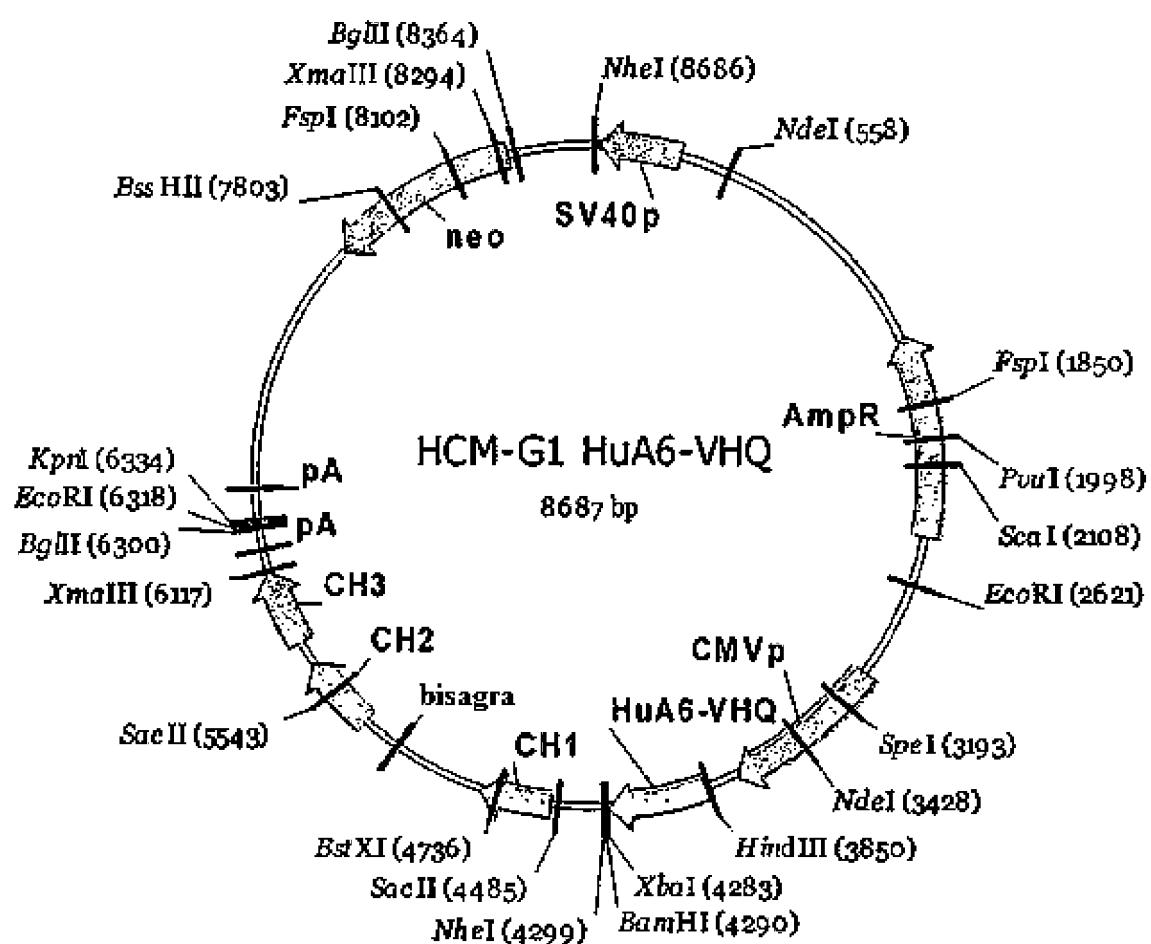


Figura 3

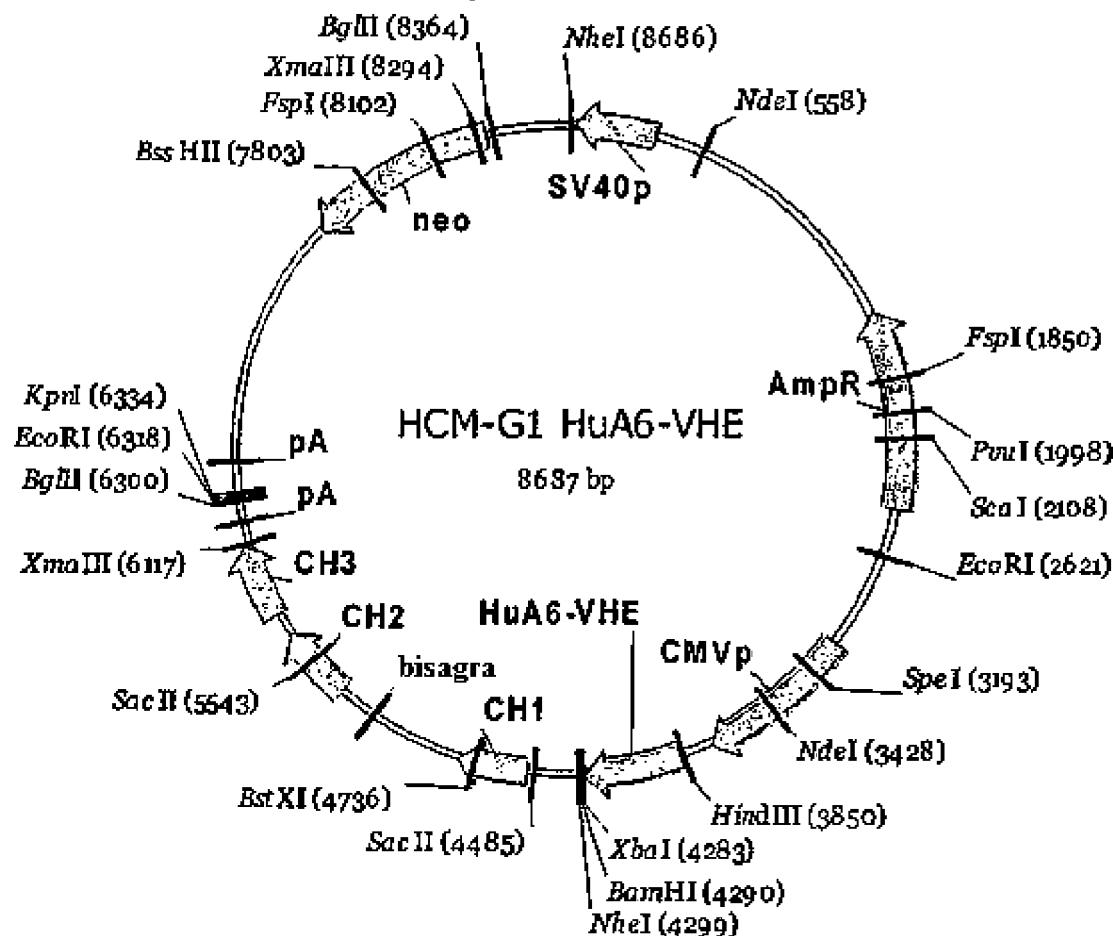


Figura 4

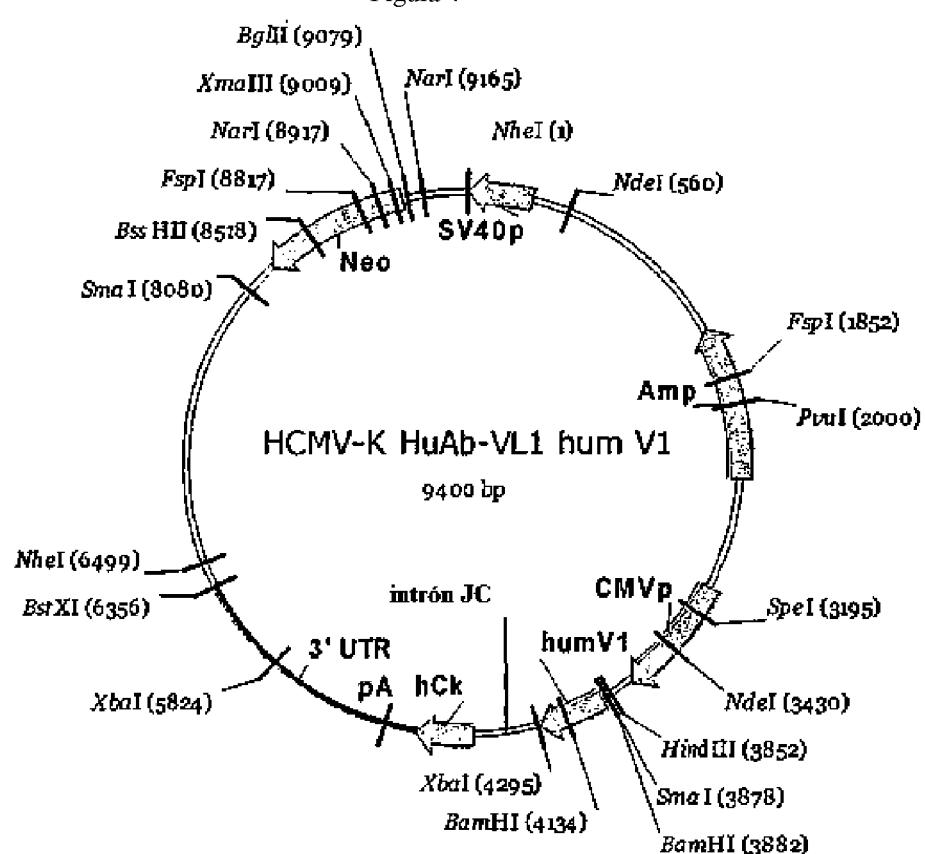


Figura 5

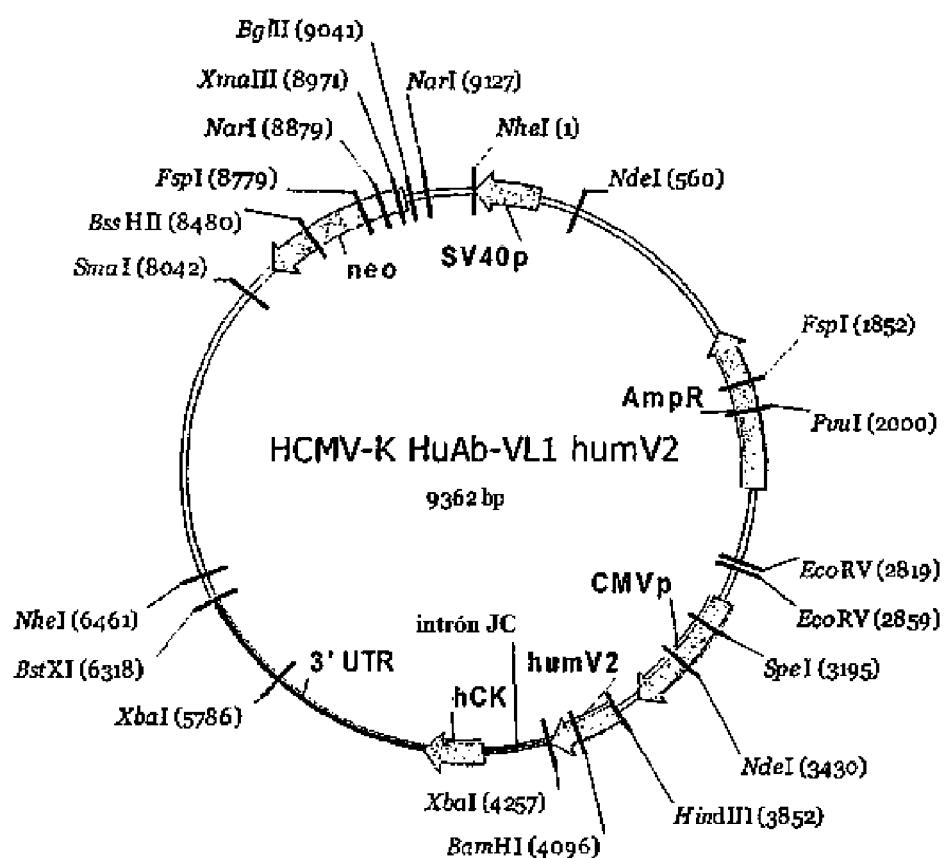


Figura 6

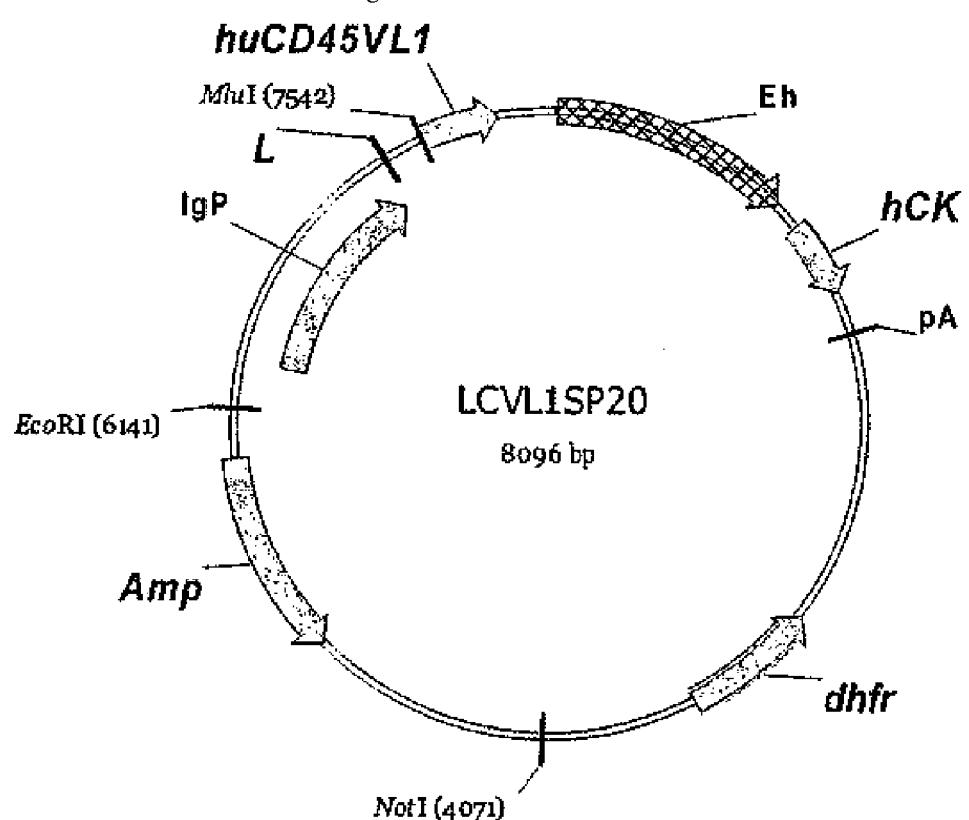


Figura 7

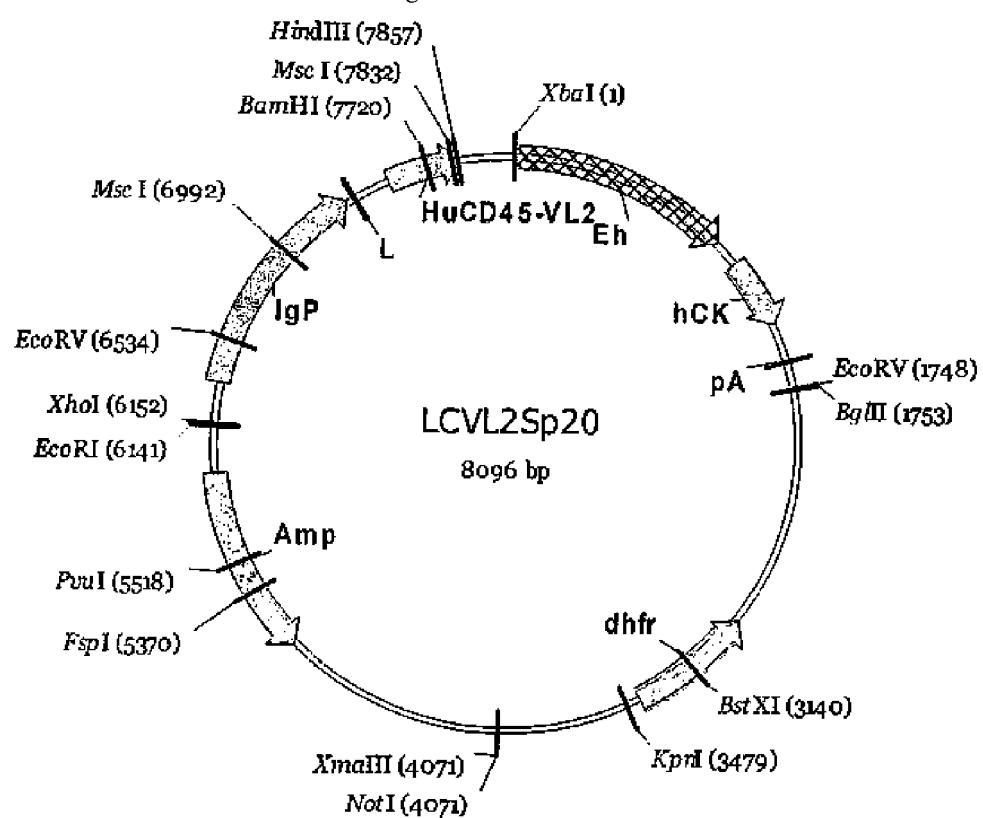


Figura 8

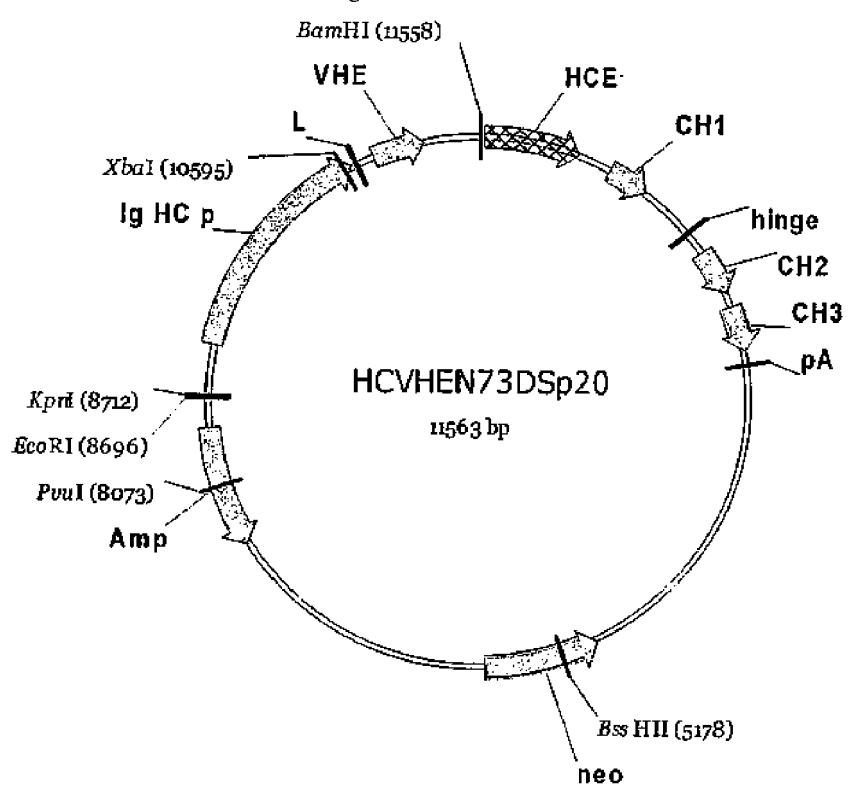


Figura 9

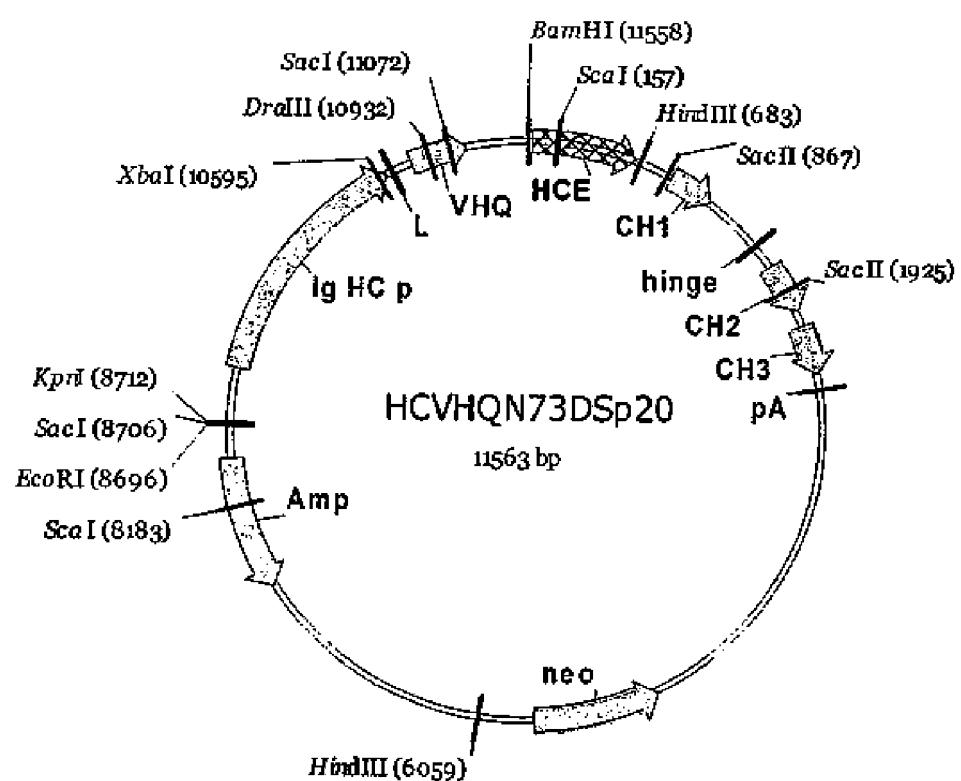
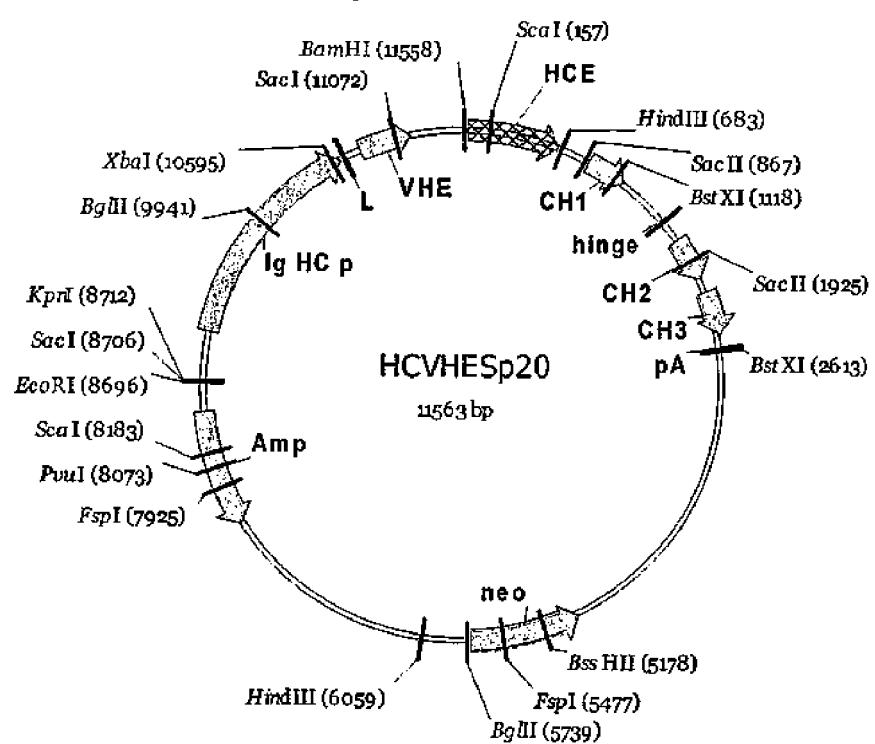
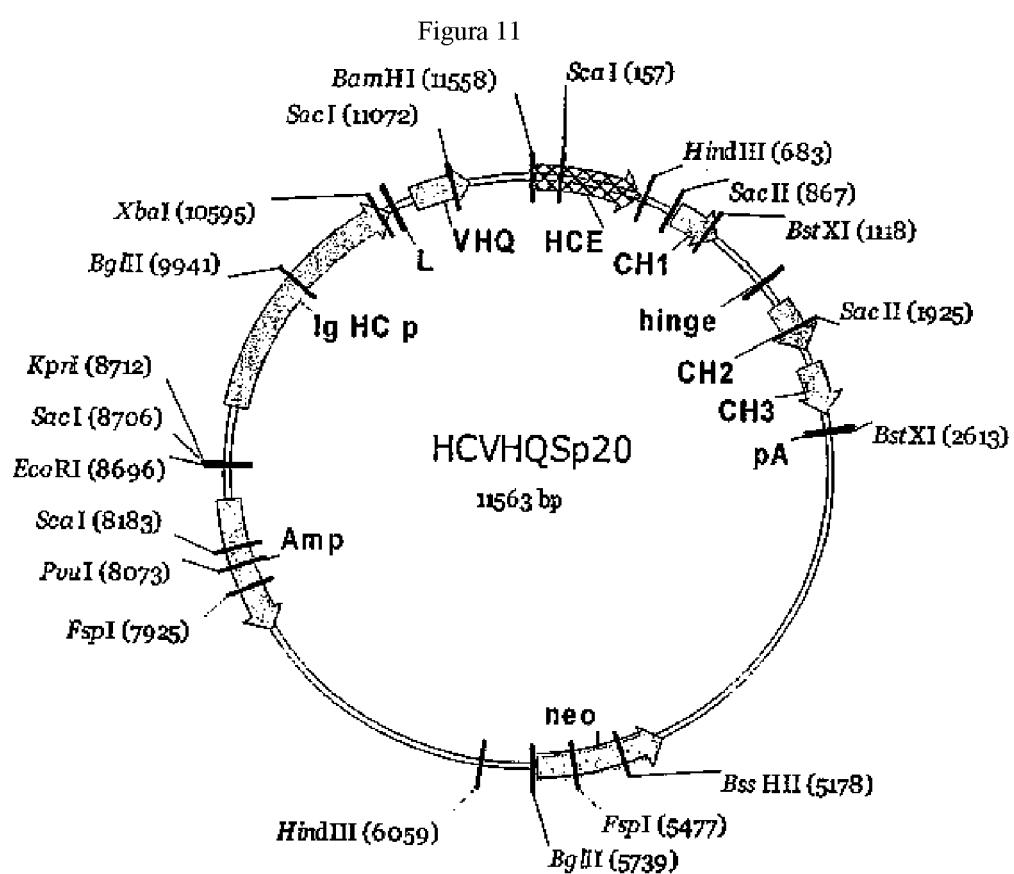


Figura 10

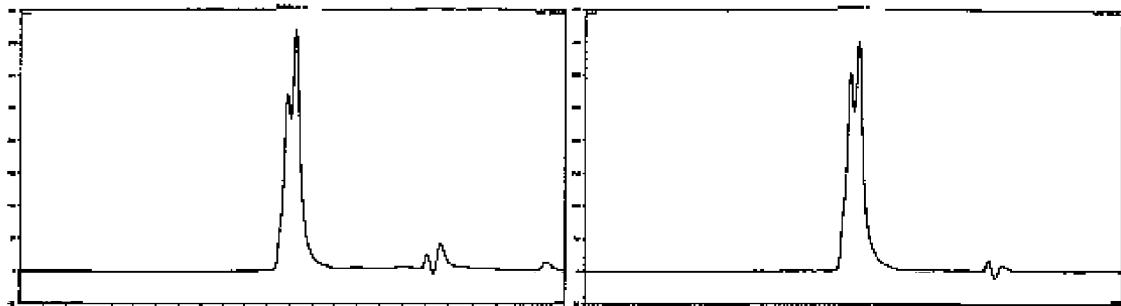




ES 2 341 341 T3

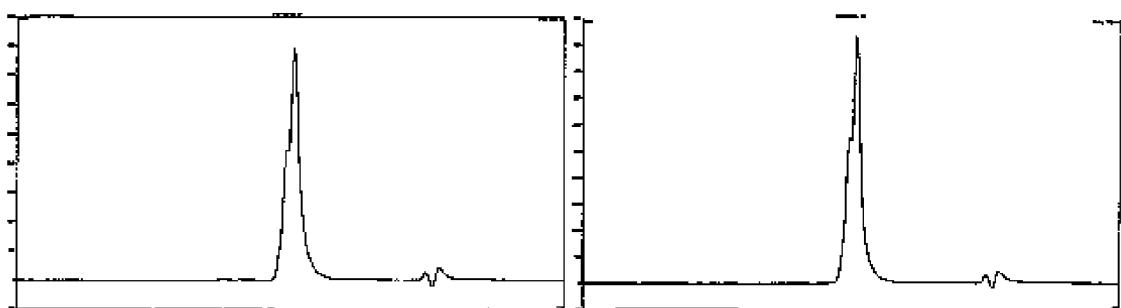
Figura 12

VHE/humV1

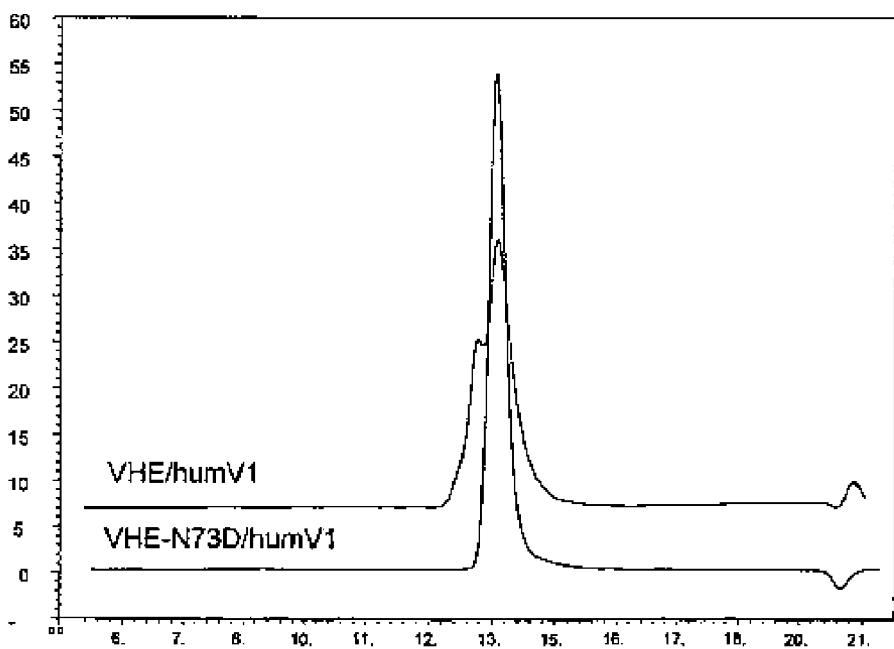


VHE/humV2

VHQ/humV1

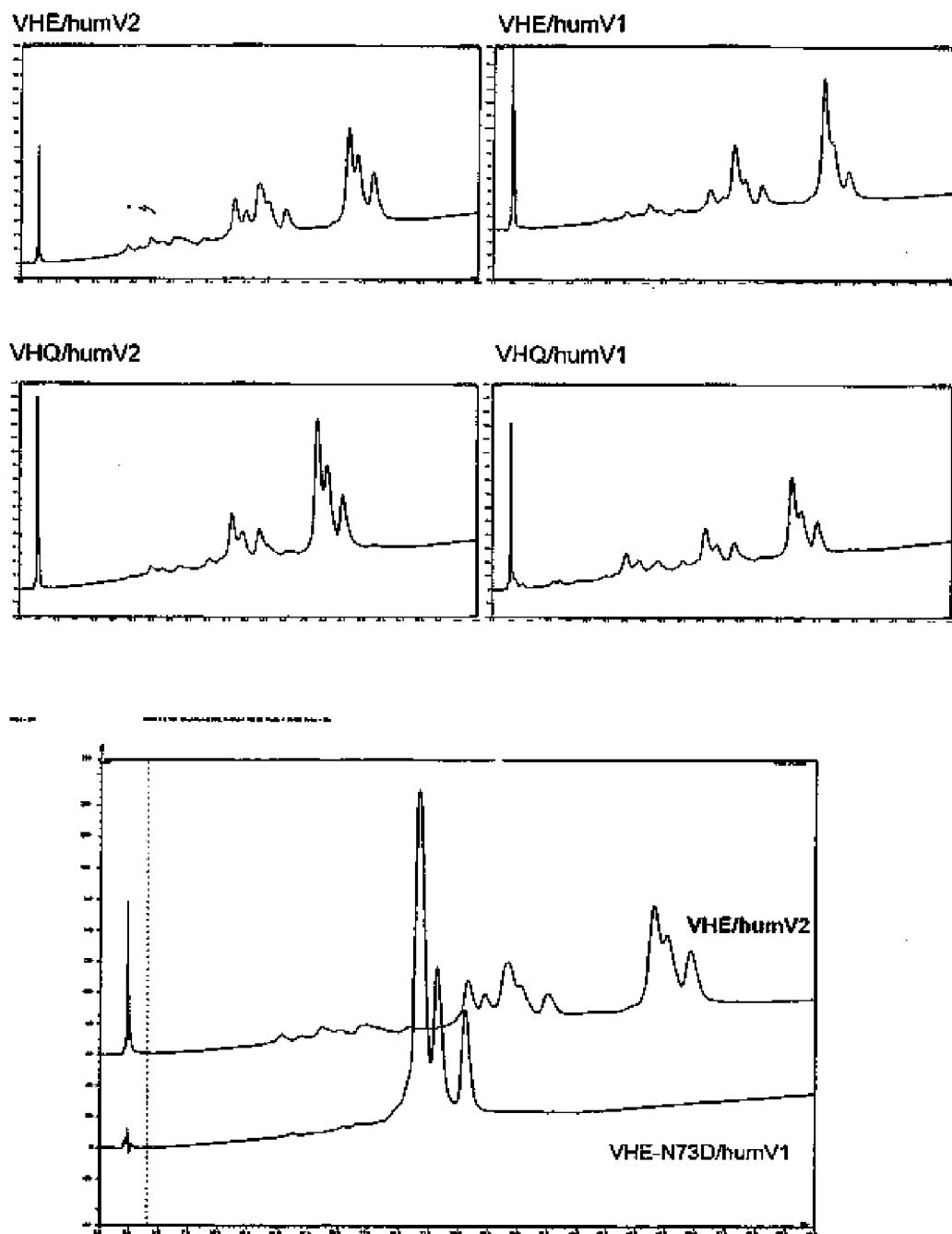


VHQ/humV2



ES 2 341 341 T3

Figura 13



ES 2 341 341 T3

Figura 14

