

ET



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

06-30455

54. TÍTULO

MOLECULAS DE ENLACE TERAPEUTICAS.

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

C07K16/28, C12N15/13, 15/62, 15/17
5/10, A61K39/395, A61P37/00

71. SOLICITANTE

NOVARTIS AG

DOMICILIO

BASILEA, SUIZA

74. APODERADO

JIMENA ESCOBAR URIBE

22. BOGOTÁ, D. C.,

Marzo 28-2006

**FÓRMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT**

ENTRADA EN FASE NACIONAL : 18-04-2006

SOLICITUD DE:



Patente de Invención



Patente de Modelo de Utilidad



Capítulo I



Capítulo II

2

**SOLICITANTE
(71)**

Nombre: **NOVARTIS AG**

Dirección: Lichtstrasse 35, CH-4002 Basilea,
Suiza.

Nacionalidad o Domicilio: Basilea, Suiza

Lugar de Constitución : Suiza

Teléfono: 41613241111 Fax: 41613227532

E-mail

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Número

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO
(74)**

Nombre: **JIMENA ESCOBAR URIBE**

Dirección: Cra. 11A No. 94-76 (Of. 305)

Teléfono: 6 162051/61 Fax: 6 161889

E-mail: tm-patent@escobaruribe.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Número 39.779.452T.P 88228

4

**INVENTOR (ES)
(72)**

Nombre: **VER ANEXOS**

Dirección:

Nacionalidad o domicilio:

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2004/010471

Fecha 17 de septiembre de 2004

Publicación Internacional No. WO 2005/026210 A2

Fecha 24 de marzo de 2005

6 TITULO (54)

MOLECULAS DE ENLACE TERAPEUTICAS.

7

Clasificación Internacional (51)

C07K 16/28, C12N 15/13, 15/62, 15/79, S10

A61K 39/395, A61P 33/00

8

Prioridad

SI ☒

NO ☐

(33) País de Origen

Estados Unidos de América

Reino Unido de la Gran Bretaña

(32) Fecha

18 de septiembre de 2003

25 de junio de 2004

(31) Número de Solicitud

10/666.332

0414309.5

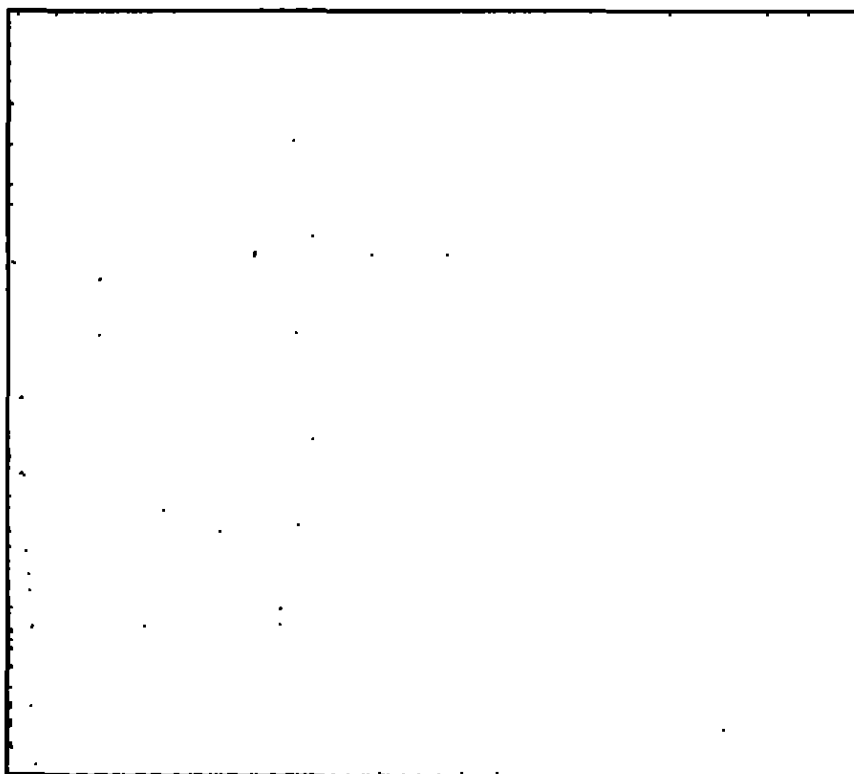
9

Comprobante de pago N° 06 - 17.431

Fecha 6 de marzo de 2006

- ☐ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica No. 17.398
- ☐ Poderes si fuere el caso * Protocolo No. 17.398
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso copia de contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 X 12 .
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional
- ☐ Otros "Opinión escrita".

11 FIGURA CARACTERÍSTICA



12 Solicito la concesión de la patente

NOMBRE: JIMENA ESCOBAR URIBE

FIRMA: *Jimena Escobar*

C.C. 39.779.452 DE Usaquén T.P. 68.228

As. 2944/PCT

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 17,431
FECHA : MARZO 6 DE 2006

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radiacion : 06020455 00000000 Folios: 243
Fecha (AMB): 2006-03-28 13:49:23
Tramite : 611 PCT-PATENT 378 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
ESCOBAR URIBE ASOCIADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	48487974	02/03/2006	3,728,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
1		TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.00
		TOTAL :	463,000.00

SOM: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ANEXOS

INVENTORES

- 1.) **KOLBINGER, Frank**
(Thuner Ring 4, 79395 Neuenburg, Alemania);
- 2.) **CARBALLIDO, HERRERA, José, M.**
(Bernhard Weissgasse 6/3, A-2380 Perchtoldsdorf, Austria);
- 3.) **ASZÓDI, András**
(Bujattigasse 15B/19, A-1140 Vienna, Austria);
- 4.) **SALDANHA, José, W.**
(21 Fillebrook Avenue, Enfield, Londres EN1 3BD, Reino Unido de la Gran Bretaña);
- 5.) **HALL, Bruce, M.**
(14 Vernon Street, Strathfield, NSW 2135 Australia);
- 6.) **GREGORI, Silvia**
(Via Romagna, 19, I-20090 Buccinasco, Italia);
- 7.) **RONCAROLO, Maria, Grazia**
(Via Fratelli Cervi, Residenza Andromeda i. 131, I-20090 Segrate, Italia);
- 8.) **LOUX, Véronique**
(24, rue du 19, Novembre, F-68870 Bartenheim, Francia);
- 9.) **AVERSA, Gregorio**
(4525 West Sixth Ave., Vancouver, BC V6R 1V4, Canadá);
- 10.) **JESCHKE, Margit**
(Grenzacher Str. 10. CH-4058 Basilea, Suiza).

4

Solicito expresamente a nombre de la sociedad
NOVARTIS AG, sociedad constituida de conformidad
con las leyes de Suiza, domiciliada en Lichtstrasse 35,
CH-4056 Basilea, Suiza, el otorgamiento de Patente
para la invención titulada **“MOLECULAS DE
ENLACE TERAPEUTICAS”**.

Clase: C07K 16/28


JIMENA ESCOBAR URIBE
C.C. 39.779.452 de Usaquen.
T.P. 68.228

RESUMEN

Una molécula que comprende por lo menos un sitio de enlace de antígeno, que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR1, CDR2 y CDR3, dicha CDR1 tiene la secuencia de aminoácido Asn-Tyr-Ile-Ile-His (NYIIH), dicha CDR2 tiene la secuencia de aminoácido Tyr-Phe-Asn-ProTyr-Asn-His-Gly-Thr-Lys-Tyr-Asn-Glu-Lys-Phe-Lys-Gly (YFNPYNHGTKYNEKFKG) y dicha CDR3 tiene la secuencia de aminoácido Ser-Gly-Pro-Tyr-Ala-Trp-Phe-Asp-Thr (SGPYAWFDT); por ejemplo, además comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR1', CDR2' y CDR3', CDR1' tiene la secuencia de aminoácido Arg-Ala-Ser-Gln-Asn-Ile-Gly-ThrSer-Ile-Gln (RASQNIGTSIQ), CDR2' tiene la secuencia de aminoácido Ser-Ser-Ser-Glu-Ser-Ile-Ser (SSSESIS) y CDR3' tiene la secuencia de aminoácido Gln-Gln-Ser-Asn-Thr-Trp Pro-Phe-Thr (QQSNTWPFT), por ejemplo un anticuerpo quimérico o humanizado, útil como un farmacéutico.

20

25

MOLECULAS DE ENLACE TERAPEUTICAS

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a compuestos orgánicos, tales como las moléculas de enlace contra isoformas de antígeno CD45, tales como por ejemplo los anticuerpos monoclonales (mAbs), y su uso.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Un aspecto en el tratamiento de una variedad de enfermedades es lograr la eliminación o la inactivación de leucocitos patogénicos y el potencial para la inducción de tolerancia a respuestas inmunes patológicas inactivas.

15 Se cree que el rechazo al trasplante de órganos, células y tejidos y las varias enfermedades autoinmunes son el resultado principal de respuestas inmunes mediadas por célula T que son capaces de reconocer antígenos específicos que se capturan, procesan y presentan a las células T auxiliares a través del antígeno que presenta la célula (APC) tales como macrófagos y células dendríticas, en la forma de un complejo de antígeno-MCH, es decir la célula T auxiliar cuando reconoce antígenos específicos se estimula para producir citocinas tales como IL-2 y para expresar o regular de
20 manera ascendente algunos receptores de citocina y otras moléculas
25

de activación y para proliferar.

Algunas de estas células T auxiliares pueden actuar directamente o indirectamente, es decir, ayudando a las células T o células B citotóxicas activadoras, a destruir las células o tejidos que expresan el antígeno seleccionado. Después de la terminación de la respuesta inmune algunas de las células clonalmente seleccionadas maduras permanecen como el auxiliar de memoria y la células T citotóxicas de memoria, que circulan en el cuerpo y rápidamente reconocen al antígeno si aparece otra vez. Si el antígeno que activa esta respuesta es un antígeno ambiental inocuo el resultado es una alergia, ésta puede resultar, si el antígeno no es un antígeno foráneo, pero es un antígeno homogéneo, puede dar como resultado una enfermedad auto inmune; si el antígeno es un antígeno de un órgano trasplantado, el resultado puede ser el rechazo al injerto.

El sistema inmune se ha desarrollado para reconocer homogéneos de no homogéneos. Esta propiedad permite a un organismo sobrevivir en un ambiente expuesto a retos diarios de patógenos. Esta especificidad para no homogéneos y tolerancia hacia homogéneos se origina durante el desarrollo del repertorio de células T hacia en el timo a través de procesos de selección positiva y negativa, que también comprende el reconocimiento y eliminación de células T auto reactivas. Este tipo de tolerancia es referido como una tolerancia central. Sin embargo, algunas de las células auto reactivas escapan de este mecanismo selectivo y poseen un riesgo potencial para el desarrollo de enfermedades autoinmunes. Para

controlar las células T auto reactivas que han escapado de la periferia, el sistema inmune tiene mecanismos reguladores periféricos que proveen protección contra la autoinmunidad. Estos mecanismos son una base para la tolerancia periférica.

5 Los antígenos de la superficie de célula reconocidos por mAbs específicos generalmente se designan a través de un número CD (Grupo de Diferenciación) asignado por talleres de Mecanografía de Leucocitos Internacional y el término CD45 aplicado aquí se refiere al antígeno común del leucocito de superficie de célula CD45; y un
10 mAb a ese antígeno que se designa aquí como "anti-CD45".

Los anticuerpos contra el antígeno común de leucocito (LCA) o CD45 con un componente principal de globulina anti-linfocito (ALG). CD45 pertenece a la familia de fosfatasas de tirosina de transmembrana y es tanto un regulador positivo como negativo de la
15 activación de la célula, dependiendo de la interacción del receptor. La actividad de fosfatasas de CD45 parece que es requerida para la activación de cinasas de la familia Src asociadas con el receptor del antígeno de linfocitos B y T (Trowbridge IS y otros, Annu Rev Immunol. 1994; 12:85-116). De esta forma, en la activación de célula
20 T, CD45 es esencial para la señal 1 y las células deficientes de CD45 tienen profundos defectos en los eventos de activación medidos por TCR.

El antígeno CD45 existe en diferentes isoformas que comprenden una familia de glicoproteínas de transmembrana.
25 Diferentes isoformas de CD45 difieren en su estructura del domino

extracelular que tiene origen de la división alternativa de tres exones variables que codifican parte de la región extracelular de CD45 (Streuli MF. y otros, J. Exp. Med. 1987; 166:1548-1566). Las varias isoformas de CD45 tienen diferentes dominios extracelulares, pero
5 tienen los mismos segmentos de transmembrana y citoplásmicos que tienen dos dominios de fosfatasa altamente conservados, homólogos de aproximadamente 300 residuos. Las diferentes combinaciones de isoformas son diferencialmente expresadas en sub-poblaciones de linfocitos T y B (Thomas ML. y otros, Immunol. Today 1988; 9:320-
10 325). Algunos anticuerpos monoclonales reconocen un epítipo común para todas las diferentes isoformas, mientras que otros mAbs tienen una especificidad restringida (CD45R), dependiente de cuales exones alternativamente divididos reconocen. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que reconocen el producto de exón A son
15 consecutivamente designados CD45RA, estos reconocen las varias isoformas que contienen el exón B que ha sido designado CD45RB (Beverley PCL y otros, Immunol. Supp. 1988; 1:3-5). Los anticuerpos tales como UCHL1 selectivamente se enlazan a la isoforma de 180 kDa CD45RO (sin ninguno de los exones variables, A, B o C) que
20 parece que están restringidos a un subgrupo de células T activadas, células de memoria y timocitos corticales y no se detectan en células B (Terry LA y otros, Immunol. 1988; 64:331-336).

DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra que la inhibición del MLR primario a través del "mAb candidato" depende de la dosis en el rango de 0.001 y 10 µg/ml. "Concentración" es la concentración del "mAb candidato".

La Figura 2 muestra el mapa del plásmido de la expresión del vector HCMV-G1 HuA6-VHQ que comprende la cadena pesada que tiene la secuencia de nucleótido SEC ID NO: 12 (3921-4274) en la secuencia de nucleótido del vector de expresión completo ID NO: 15.

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

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

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

La Figura 6 muestra el mapa del plásmido del vector de

expresión LCVL1SP20 que comprende la cadena ligera que tiene la secuencia de nucleótido SEC ID NO: 33 en la secuencia de nucleótido del vector de expresión completo SEC ID NO: 36.

La Figura 7 muestra el mapa del plásmido del vector de
5 expresión LCVL2SP20 que comprende la cadena ligera que tiene la secuencia de nucleótido SEC ID NO: 13 en la secuencia de nucleótido del vector de expresión completo SEC ID NO: 39.

La Figura 8 muestra el mapa del plásmido del vector de
expresión HCVHEN73D Sp20 que comprende la cadena pesada que
10 tiene la secuencia de nucleótido SEC ID NO: 34 en la secuencia de nucleótido del vector de expresión completo SEC 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 SEC ID NO: 35 en la secuencia de
15 nucleótido del vector de expresión completo SEC ID NO: 38.

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

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

La Figura 12 muestra el análisis de Cromatografía de Exclusión
25 de Tamaño de VHE/humV1, VHE/humV2, VHQ/humV1 y VHQ/humV2,

y de VHE/humV1 junto con VHE-N73D/humV1.

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

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

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

10 Se ha encontrado una molécula de enlace que comprende una secuencia de polipéptido que se enlaza a CD45RO y CD45RB, a partir de este momento también designada como una "molécula de enlace "CD45RO/RB ". Estas moléculas de enlace de acuerdo con la invención pueden inducir la inmunosupresión, inhibir las respuestas
15 de la célula T e inducir la tolerancia de la célula T. Además, las moléculas de enlace de la invención inhiben las respuestas de linfocito mezcladas primarias (MLR). Las células derivadas de cultivos tratados con las moléculas de enlace CD45RO/RB preferiblemente también tienen respuestas proliferativas debilitadas
20 en MLR secundario aún en ausencia de las moléculas de enlace CD45RO/RB en el MLR secundario. Dichas respuestas proliferativas debilitadas en MLR secundario son una indicación de la habilidad de las moléculas de enlace de la invención para inducir la tolerancia. Además se encuentra que las moléculas de enlace CD45RO/RB de la
25 invención pueden inducir la muerte de la célula a través de apoptosis

en linfocitos T humanos, pueden soportar la diferenciación de las células T con fenotipo de célula reguladora T características (Treg); y/o pueden inducir las células reguladoras T capaces de suprimir la activación de célula T simple.

5 Además, se encuentra que la administración *in vivo* de la molécula de enlace CD45RO/RB a ratones con inmunodeficiencia combinada severa (SCID) que experimentan xeno-GVHD después inyección con PBMC humano puede prolongar la supervivencia de los ratones, comparado con los ratones tratados con control, aún cuando
10 aún se puedan detectar células T humana en circulación en la molécula de enlace CD45RO/RB. La molécula de enlace CD45RB/RO también puede suprimir el proceso inflamatorio que media el rechazo de piel del aloinjerto humano. Además, se encuentra que la molécula de enlace CD45RO/RB puede suprimir el proceso que media el
15 rechazo de piel del aloinjerto humano, en particular, puede suprimir el proceso inflamatorio que media el rechazo de piel del aloinjerto humano *in vivo* en ratones SCID trasplantado con piel humana e injertado con esplenocitos mononucleares. Y además, se encuentra que la molécula de enlace CD45RB/RO puede conducir a una
20 supervivencia del aloinjerto de isleta humano prolongada a través de la prevención de infiltración del injerto y a través de la inhibición de la reacción del rechazo al injerto mediado por leucocito *in vivo*.

Por "molécula de enlace CD45RO/RB" se quiere dar a entender cualquier molécula capaz de enlazarse específicamente a las
25 isoformas CD45RB y CD45RO del antígeno CD45, ya sea solo o

asociado con otras moléculas. La reacción de enlace puede mostrarse a través de métodos estándares (ensayo cualitativo) incluyendo por ejemplo, cualquier clase de ensayo de enlace tal como inmunofluorescencia directa o indirecta junto con el análisis de microscopía de fluorescencia o citofluorimétrico (FACS), el ensayo inmunoabsorbente enlazado a enzima (ELISA) o radioinmunoensayo en donde se puede visualizar el enlace de la molécula a las células que expresan una isoforma CD45 particular. Por ejemplo la inhibición de la respuesta de linfocito mezclada primaria o secundaria (MLR) se puede determinar, tal como un ensayo *in vitro* o un bioensayo para determinar la inhibición del MLR primario o secundario en la presencia y la ausencia de una molécula de enlace CD45RO/RB y la determinación de las diferencias en la inhibición de MLR primario.

Alternativamente, los efectos moduladores funcionales *in vitro* también se pueden determinar midiendo el PBMC o la proliferación de células T o células CD4+, la producción de citocinas, el cambio en la expresión de las moléculas de superficie de célula, por ejemplo, después de la activación de célula en MLR, o después de la estimulación con un antígeno específico tal como la anatoxina de tétanos u otros antígenos, o con estimuladores policlonales tales como fitohemaglutinina (PHA) o anticuerpos anti-CD3 y anti-CD29 o ésteres de forbol y ionóforos Ca^{2+} . Los cultivos se establecen en una forma similar como se describe con respecto a MLR, excepto que se utilizan células alogénicas como el antígeno soluble estimulador, o estimuladores policlonales en lugar de tales como aquellos

mencionados anteriormente. La proliferación de célula T se mide preferiblemente como se describió anteriormente a través de la incorporación de ^3H -timidina.

La producción de citocina se mide preferiblemente a través del ELISA de emparejado en donde una citocina de captura de anticuerpo cubre la superficie de una placa de 96 cavidades, se agregan los sobrenadantes de los cultivos y se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente y después se agrega un anticuerpo para la detección específico para la citocina particular, después de un anticuerpo en segundo paso conjugado con una enzima tal como peroxidasa de rábano picante seguido por el substrato correspondiente y la absorbancia se mide en un lector de placas. El cambio en las moléculas en superficie de la célula preferiblemente se puede medir a través de inmunofluorescencia directa o indirecta después de teñir las células objetivo con anticuerpos específicos para una molécula de superficie de célula particular. El anticuerpo puede ser ya sea directamente marcado con fluorocromo o se puede utilizar un anticuerpo del segundo paso fluorescentemente marcado específico para el primer anticuerpo, y las células se analizan con un citofluorímetro.

La molécula de enlace de la invención tiene una especificidad de enlace para ambos, CD45RO y CD45RB ("la molécula de enlace CD45RB/RO").

Preferiblemente la molécula de enlace se enlaza de las isoformas CD45RO con una constante de disociación (K_d) $<20\text{nM}$,

preferiblemente con un $K_d < 15$ nM o < 10 nM, más preferiblemente con un $K_d < 5$ nM. Preferiblemente molécula de enlace se enlaza a las isoformas CD45RB con un $K_d < 50$ nM, preferiblemente con un $K_d < 15$ nM o < 10 nM, más preferiblemente con un $K_d < 5$ nM.

5 En una modalidad adicional preferida la molécula de enlace de la invención enlaza esas isoformas CD45 que

1) incluye los epítopos A y B pero no el epítopo C de la molécula CD45; y/o

2) incluye el epítopo B pero no de A y no el epítopo C de la
10 molécula CD45; y/o

3) no incluye ninguno de los epítopos A, B o C o la molécula CD45.

En una modalidad preferida adicional la molécula de enlace de la invención no enlaza isoformas CD45 que incluyen

15 1) todos los epítopos A, B y C de la molécula CD45; y/o

2) ambos epítopos B y C pero no el epítopo A de la molécula CD45.

En modalidades adicionales preferidas la molécula de enlace de la invención además

20 1) reconoce las células T de memoria y aloactivadas *in vivo*; y/o

2) se enlaza a su objetivo en células T humanas, tal como por ejemplo células PEER; en donde dicho enlace preferiblemente es con un $K_d < 15$ nM, más preferiblemente con un $K < 10$ nM, de preferencia
25 con un $K_d < 5$ nM; y/o

3) inhibe la función de la célula T aloreactiva *in vitro*, preferiblemente con un IC_{50} de menos de 100 nM, preferiblemente menor de 50 nM o 30 nM, de preferiblemente con un IC_{50} de alrededor de 10 o 5 nM, de preferencia con un IC_{50} de aproximadamente 0.5 nM o aún de 0.1 nM; y/o

4) induce la muerte de la célula a través de apoptosis en linfocitos humanos; y/o

5) induce la tolerancia de la célula T específica de aloantígeno *in vitro*; y/o

10 6) previene la enfermedad de injerto xenogénico contra huésped letal (GvHD) inducida en ratones SCID a través de inyección de PBMC humano cuando se administra en una cantidad efectiva; y/o

7) se enlaza a los linfocitos T, monocitos, células de tallo, células aniquiladoras naturales, y/o granulocitos, pero a plaquetas o
15 linfocitos B; y/o

8) da soporte a la diferenciación de células T con un fenotipo de célula reguladora T característica (Treg); y/o

9) induce las células reguladoras T capaces de suprimir la activación de célula T simple; y/o

20 10) suprime el proceso inflamatorio que media el rechazo de piel de aloinjerto humano, en particular, suprime el proceso inflamatorio que media el rechazo a piel de aloinjerto humano *in vivo* en ratones SCID trasplantado con piel humana e injertada con esplenocitos mononucleares; y/o

25 11) prolonga la supervivencia del aloinjerto de isleta humana

en un modelo de ratones hu-PBL-NOD/SCID.

En una modalidad preferida adicional la molécula de enlace de la invención se enlaza al mismo epítopo que el anticuerpo monoclonal "A6" como se describe por Aversa y otros., Cellular Immunology 158, 314-328 (1994).

Debido a las propiedades de enlace anteriormente descritas y las actividades biológicas, dichas moléculas de enlace de la invención son particularmente útiles en la medicina, por ejemplo terapia y/o profilaxis. Las enfermedades en donde las moléculas de enlace de la invención son particularmente útiles incluyen enfermedades autoinmunes, rechazo al trasplante, dermatitis, enfermedad del bazo inflamatoria y/o alergias, como se establecerá más adelante.

Se ha encontrado que una molécula que comprende un polipéptido de SEQ ID NO: 1 y un polipéptido de SEQ ID NO: 2 es una molécula de enlace CD45RO/RB. También se ha encontrado las regiones hipervariables CDR1', CDR2' y CDR3' en una molécula de enlace CD45RO/RB de SEC ID NO: 1, CDR1' tiene la secuencia de aminoácido Arg-Ala-Ser-Gln-Asn-Ile-Gly-Thr-Ser-Ile-Gln (RASQNIGTSIQ) (SEC ID NO: 19), CDR2' tiene la secuencia de aminoácido Ser-Ser-Ser-Glu- Ser-Ile-Ser (SSSESIS) (SEC ID NO: 20) y CDR3' tiene la secuencia de aminoácido Gln- Gln-Ser-Asn-Thr-Trp-Pro-Phe-Thr (QQSNTWPFT) (SEC ID NO: 21).

También se han encontrado las regiones hipervariables CDR1, CDR2 y CDR3 en una molécula de enlace CD45RO/RB de SEC ID

NO: 2, CDR1 tiene la secuencia de aminoácido Asn-Tyr-Ile-Ile-His (NYIIH) (SEC ID NO: 22), CDR2 tiene la secuencia de aminoácido Tyr-Phe-Asn-Pro-Tyr-Asn-His-Gly-Thr-Lys-Tyr-Asn-Glu-Lys-Phe-Lys-Gly (YFNPYNHGTTYNEKFKG) (SEC ID NO: 23) y CDR3 tiene la
5 secuencia de aminoácido Ser-Gly-Pro-Tyr-Ala-Trp-Phe-Asp-Thr (SGPYAWFDT) (SEC ID NO: 24).

Las CDRs son 3 regiones de determinación complementarias específicas que también son llamadas regiones hipervariables, que esencialmente determinan las características del enlace del
10 antígeno. Estas CDRs son parte de la región variable, por ejemplo, de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, respectivamente, en donde estas CDRs alternan con regiones de estructura (FR's), por ejemplo las regiones constantes. Una A SEQ ID NO: 1 es parte de una cadena ligera, por ejemplo de SEQ ID NO: 3, y una SEC ID NO: 2 es parte de
15 una cadena pesada, por ejemplo de SEQ ID NO: 4, en un anticuerpo quimérico de acuerdo con la presente invención. Las CDRs de una cadena pesada junto con las CDRs de una cadena ligera asociada esencialmente constituyen el sitio de enlace del antígeno de una molécula de la presente invención. Se sabe que la contribución
20 hecha por una región de cadena variable a los energéticos de enlace es muy poca comparada con aquella hecha por la región variable de cadena pesada asociada y aquella de las regiones variables de cadena pesada aisladas tienen una actividad de enlace a antígeno propia. Dichas moléculas son comúnmente referidas como
25 anticuerpos de dominio individual.

En un aspecto la presente invención provee una molécula de enlace que comprende por lo menos un sitio de enlace de antígeno, por ejemplo una molécula de enlace CD45RO/RB, que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR1, CDR2 y CDR3, dicha CDR1 tiene la secuencia de aminoácido Asn-Tyr-Ile-Ile-His (NYIIH) (SEC ID NO: 22), dicha CDR2 tiene la secuencia de aminoácido Tyr-Phe-Asn-Pro-Tyr-Asn-His-Gly-Thr-Lys-Tyr-Asn-Glu-Lys-Phe-Lys-Gly (YFNPYNHGTTYNEKFKG) (SEC ID NO: 23) y dicha CDR3 tiene la secuencia de aminoácido Ser-Gly-Pro-Tyr-Ala-Trp-Phe-Asp-Thr (SGPYAWFDT) (SEC ID NO: 24); por ejemplo y equivalentes directos de las mismas.

En otro aspecto la presente invención provee una molécula que comprende por lo menos un sitio de enlace de antígeno, por ejemplo a molécula de enlace CD45RO/RB, que comprende

a) un primer dominio que comprende en secuencia con las regiones hipervariables CDR1, CDR2 y CDR3, dicha CDR1 tiene la secuencia de aminoácido Asn-Tyr-Ile-Ile-His (NYIIH) (SEC ID NO: 22), dicha CDR2 tiene la secuencia de aminoácido Tyr-Phe-Asn-Pro-Tyr-Asn-His-Gly-Thr-Lys-Tyr-Asn-Glu-Lys-Phe-Lys-Gly (YFNPYNHGTTYNEKFKG) (SEC ID NO: 23) y dicha CDR3 tiene la secuencia de aminoácido Ser-Gly-Pro-Tyr-Ala-Trp-Phe-Asp-Thr (SGPYAWFDT) (SEC ID NO: 24); y

b) un segundo dominio que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR1', CDR2' y CDR3', CDR1' tiene la secuencia de aminoácido Arg-Ala-Ser-Gln-Asn-Ile-Gly-Thr-Ser-Ile-

22
21

Gln (RASQNIGTSIQ) (SEC ID NO: 19), CDR2' tiene la secuencia de aminoácido Ser-Ser- Ser-Glu-Ser-ile-Ser (SSSESIS) (SEC ID NO: 20) y CDR3' tiene la secuencia de aminoácido Gln-Gln-Ser-Asn-Thr-Trp-Pro-Phe-Thr (QQSNTWPFT) (SEC ID NO: 21), por ejemplo y
5 equivalentes directos de las mismas.

En una modalidad preferida el primer dominio comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR1, CDR2 y CDR3 es una cadena pesada de inmunoglobulina, y el segundo dominio comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR1', CDR2'y CDR3' en
10 una cadena ligera de inmunoglobulina.

En un aspecto adicional la presente invención provee una molécula por ejemplo a molécula de enlace CD45RO/RB, que comprende un polipéptido de SEQ ID NO: 1 y/o un polipéptido de SEQ ID NO: 2, preferiblemente que comprende en dominio un
15 polipéptido de SEQ ID NO: 1 y en otro dominio un polipéptido de SEQ ID NO: 2, por ejemplo un anticuerpo monoclonal quiméricos y en otro aspecto, una molécula, por ejemplo una molécula de enlace CD45RO/RB, que comprende a polipéptido de SEQ ID NO: 3 y/o un polipéptido de SEQ ID NO: 4, preferiblemente que comprende en un
20 dominio un polipéptido de SEQ ID NO: 3 y en otro dominio un polipéptido de SEQ ID NO: 4, por ejemplo un anticuerpo monoclonal quimérico.

Cuando el sitio de enlace de antígeno comprende ambos, el primero y el segundo dominios o un polipéptido de SEQ ID NO: 1 o
25 SEC ID NO: 3, respectivamente, y un polipéptido de SEQ ID NO: 2 o

20
22

de SEC ID NO: 4, respectivamente, éstos se pueden localizar en el mismo polipéptido, o, preferiblemente cada dominio puede estar en una cadena diferente, por ejemplo el primer dominio siendo parte de una cadena pesada, por ejemplo la cadena pesada de inmunoglobulina, o un fragmento de la misma y el segundo dominio siendo parte de una cadena ligera, por ejemplo una cadena ligera de inmunoglobulina o fragmento de la misma.

Se ha encontrado que una molécula de enlace CD45RO/RB de acuerdo con la presente invención es una molécula de enlace CD45RO/RB en un mamífero, por ejemplo ambiente del cuerpo del ser humano. Una molécula de enlace CD45RO/RB de acuerdo con la presente invención puede de esta forma designarse como un anticuerpo monoclonal (mAb), en donde la actividad de enlace se determina principalmente a través de las regiones CDR como se describió anteriormente, por ejemplo dichas regiones CDR estando asociadas con otras moléculas sin una especificidad de enlace, tal como una estructura, por ejemplo regiones constantes, que son substancialmente de origen humano.

En otro aspecto la presente invención proporciona una molécula enlace CD45RO/RB que no es el anticuerpo monoclonal "A6" como se describe por Aversa y otros., Cellular Immunology 158, 314-328 (1994), el cual se incorporan aquí por referencia para los pasajes que caracterizan A6.

En otro aspecto la presente invención provee una molécula de enlace CD45RO/RB de acuerdo con la presente invención que es un

34
23

anticuerpo monoclonal quimérico, humanizado o completamente humano.

Ejemplos de una molécula de enlace CD45RO/RB incluyen anticuerpos quiméricos o humanizados por ejemplo derivados de anticuerpos según producidos por células B o hibridomas o cualquier
5 fragmento de los mismos, por ejemplo fragmentos F(ab')₂ y Fab, así como anticuerpos de cadena individual o de dominio individual. Un anticuerpo de cadena individual consiste de regiones variables de cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo covalentemente enlazadas
10 a través de un enlazador de péptido, usualmente que consiste de 10 a 30 aminoácidos, preferiblemente de 15 a 25 aminoácidos. Por consiguiente, dicha estructura no incluye la parte constante de las cadenas pesada y ligera, y se cree que el espaciado de péptido pequeño debería ser menos antigénico que una parte constante
15 completa. Por anticuerpo quimérico se quiere dar a entender un anticuerpo en donde las regiones constantes de las cadenas pesada y ligera o ambas son de origen humano mientras que los dominios variables de las cadenas pesada y ligera no son de origen humano (por ejemplo, murino). Por anticuerpo humanizado se quiere dar a
20 entender un anticuerpo en el cual las regiones hipervariables (CDRs) no son de origen humano (por ejemplo murino) mientras todas o substancialmente todas las otras partes, por ejemplo las regiones constantes y las partes altamente conservadas de las regiones variables son de origen humano. Un anticuerpo humanizado puede
25 sin embargo, retener unos cuantos aminoácidos de la secuencia de

25
24

murino en las partes de las regiones variables adyacentes a las regiones hipervariables.

La regiones hipervariables, es decir, CDR's de acuerdo con la presente invención pueden estar asociadas con cualquier clase de regiones de estructura, por ejemplo partes constantes de las cadenas ligera y pesada, de origen humano. Las regiones de estructura adecuadas son por ejemplo descritas en "Sequences of proteins of immunological interest", Kabat, E. A. y otros, departamento de salud y servicios humanos de Estados Unidos.

10 Preferiblemente la parte constante de una cadena pesada humana puede ser del tipo IgG1, incluyendo subtipos, preferiblemente la parte constante de la cadena ligera humana puede ser del tipo κ o λ , más preferiblemente del tipo κ . Preferiblemente, dicha cadena pesada comprende no más de un sitio de glicosilación, más

15 preferiblemente el sitio de glicosilación es un sitio de N-glicosilación, y más preferiblemente el sitio de glicosilación se localiza en la parte constante de la cadena pesada. Más preferiblemente ningún sitio de glicosilación está presente en la región variable, preferiblemente ningún sitio de glicosilación en la

20 región de la estructura.

Una parte constante preferida de una cadena pesada es un polipéptido de SEQ ID NO: 4 (sin las partes de la secuencia de CDR1', CDR2'y CDR3' que se especificaron anteriormente) y una parte constante preferida de una cadena ligera es un polipéptido de

25 SEQ ID NO: 3 (sin las partes de la secuencia de CDR1, CDR2 y

26
25

CDR3 que se especificaron anteriormente).

También se ha encontrado un anticuerpo humanizado que comprende a una región variable de cadena ligera del aminoácido SEC ID NO: 7 o del aminoácido SEC ID NO: 8, que comprende
5 CDR1', CDR2'y CDR3' de acuerdo con la presente invención y/o una región variable de cadena pesada de SEC ID NO: 9 o de SEC: ID NO: 10, que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 de acuerdo con la presente invención. Se proporciona otro anticuerpo humanizado adicional que comprende a una región variable de cadena ligera del aminoácido
10 SEC ID NO: 7 o del aminoácido SEC ID NO: 8, que comprende CDR1', CDR2'y CDR3' de acuerdo con la presente invención y/o una región variable de cadena pesada de SEC ID NO: 31 o de SEC: ID NO: 32, que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 de acuerdo con la presente invención.

15 En otro aspecto la presente invención provee un anticuerpo humanizado comprende a polipéptido de SEC ID NO: 9 o de SEC ID NO: 10 y a polipéptido de SEC ID NO: 7 o de SEC ID NO: 8. Aún un aspecto adicional de la presente invención provee a molécula de enlace que es un anticuerpo humanizado que comprende un
20 polipéptido de SEC ID NO: 31 o de SEC ID NO: 32 y a polipéptido de SEC ID NO: 7 o de SEC ID NO: 8.

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

- un polipéptido de SEC ID NO: 9 y a un polipéptido de SEC
25 ID NO: 7 (tal como VHE/humV2),

- un polipéptido de SEC ID NO: 9 y a un polipéptido de SEC ID NO: 8 (tal como VHE/humV1),
- un polipéptido de SEC ID NO: 10 y a un polipéptido de SEC ID NO: 7 (tal como VHQ/humV2),
- 5 - un polipéptido de SEC ID NO: 10 y a un polipéptido de SEC ID NO: 8 (tal como VHQ/humV1),
- un polipéptido de SEC ID NO: 31 y a un polipéptido de SEC ID NO: 7 (tal como VHEN73D/humV2),
- un polipéptido de SEC ID NO: 31 y a un polipéptido de SEC ID NO: 8 (tal como VHEN73D/humV1),
- 10 - un polipéptido de SEC ID NO: 32 y a un polipéptido de SEC ID NO: 7 (tal como VHQN73D/humV2), o
- un polipéptido de SEC ID NO: 32 y a un polipéptido de SEC ID NO: 8 (tal como VHQN73D/humV1).
- 15 Un polipéptido de acuerdo con la presente invención, por ejemplo de una secuencia especificada, por ejemplo de CDR1 (SEC ID NO: 22), CDR2 (SEC ID NO: 23), CDR3 (SEC ID NO: 24), CDR1' (SEC ID NO: 19), CDR2' (SEC ID NO: 20), CDR3' (SEC ID NO: 21), o of a SEQ ID NO: 1, SEC ID NO: 2, SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 4, SEC ID NO: 7, SEC ID NO: 8, SEC ID NO: 9, SEC ID NO: 10, SEC ID NO: 31 o SEC ID NO: 32 incluye equivalentes directos de dicho (poli) péptido (secuencia); por ejemplo incluyendo un derivado funcional de dicho polipéptido. Dicho derivado funcional puede incluir modificaciones covalentes de una secuencia especificada, y/o dichas
- 20 modificaciones covalentes de una secuencia especificada, y/o
- 25 modificaciones covalentes de una secuencia especificada, y/o

derivado funcional pueden incluir variantes de la secuencia de aminoácido de una secuencia especificada.

"Polipéptido", sino se especifica otra cosa aquí, incluye cualquier péptido o proteína que comprende aminoácidos enlazados uno con el otro a través de enlaces de péptido, que tienen una secuencia de aminoácido iniciando en la extremidad N-terminal y finalizando en la extremidad C-terminal. Preferiblemente el polipéptido de la presente invención es un anticuerpo monoclonal, más preferidos es un anticuerpo monoclonal quimérico (V-injertado) o humanizado (CDR-injertado). El anticuerpo monoclonal humanizado (CDR-injertado) puede incluir o no incluir mutaciones adicionales introducidas dentro de las secuencias de la estructura (FR) del anticuerpo del aceptor. Preferiblemente el anticuerpo humanizado o quimérico comprende no más de un sitio de glicosilación. Más preferiblemente dicho un sitio de glicosilación es un sitio de N-glicosilación. Más preferiblemente dicho sitio de glicosilación es un sitio de N-glicosilación. Más preferiblemente ningún sitio de glicosilación está presente en la región variable, y aún más preferiblemente ningún sitio de glicosilación está presente en la región variable de la cadena pesada, más preferiblemente ningún sitio de glicosilación está presente en las regiones de estructura (FR's).

Un derivado funcional de un polipéptido como se utiliza aquí, incluye una molécula que tiene una actividad biológica cualitativa en común con un polipéptido de la presente invención, es decir, tiene la habilidad de enlazarse a CD45RO y CD45RB. Un derivado funcional

incluye fragmentos y análogos de péptido de un polipéptido de acuerdo con la presente invención. Los fragmentos comprenden regiones dentro de la secuencia de un polipéptido de acuerdo con la presente invención, por ejemplo de una secuencia especificada. El

5 término "derivado" se utiliza para definir variantes de la secuencia de aminoácido, y modificaciones covalentes de un polipéptido de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo de una secuencia especificada. Los derivados funcionales de un polipéptido de acuerdo con la presente invención, por ejemplo de una secuencia

10 especificada, preferiblemente tienen por lo menos alrededor de 65%, más preferiblemente al menos alrededor de 75%, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 85%, de preferencia por lo menos alrededor de 95% de homología de la secuencia global con la secuencia de aminoácido de polipéptido de acuerdo con la

15 presente invención, por ejemplo de una secuencia especificada, y substancialmente retienen la habilidad de enlazarse a CD45RO y CD45RB. Preferiblemente, el derivado funcional tiene por lo menos la afinidad de enlace de una molécula de enlace que comprende un polipéptido de SEC ID NO : 1 y/o un polipéptido de SEC ID NO: 2,

20 de un anticuerpo humanizado que comprende un polipéptido de SEC ID NO: 9 o de SEC ID NO : 10 y/o un polipéptido de SEQ ID NO: 7 o de SEC ID NO: 8; o de un anticuerpo humanizado que comprende un polipéptido de SEC ID NO: 31 o de SEC ID NO: 32 y/o un polipéptido de SE ID NO: 7 o de SEC ID NO: 8.

25 El término "modificación covalente" incluye modificaciones de

30
29

un polipéptido de acuerdo con la presente invención, por ejemplo de una secuencia especificada; o un fragmento de la misma con un agente de derivatización proteínico orgánico o no proteínico, fusiones a secuencias de polipéptido heterólogas, y modificaciones post-translacionales. Los polipéptidos modificados de forma covalente, por ejemplo de una secuencia especificada, aún tienen la habilidad de enlazarse a CD45RO y CD45RB a través de entrelazamiento. Las modificaciones covalentes se introducen tradicionalmente a través de la reacción de los residuos de aminoácido activados con un agente de derivatización orgánico que es capaz de reaccionar con los lados seleccionados o residuos terminales, o a través de mecanismos de aprovechamiento de las modificaciones post-translacionales que funcionan en las células huésped recombinantes. Ciertas modificaciones post-translacionales son el resultado de la acción de las células huésped recombinantes sobre el polipéptido expresado. Los residuos de asparaginilo y glutaminilo son frecuentemente desaminados post-translacionalmente a los residuos de glutamilo y aspartilo correspondientes. Alternativamente, estos residuos se desaminan bajo condiciones ligeramente ácidas. Otras modificaciones post-translacionales incluyen la hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de residuos de serilo, tirosina o treonilo, la mutilación de los grupos α -amino de cadenas laterales de lisina, arginina e histidina, ver por ejemplo, T. E. Creighton, *Proteins: Structure y Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86

3/8

(1983). Las modificaciones covalentes por ejemplo incluyen proteínas de fusión que comprenden un polipéptido de acuerdo con la presente invención, por ejemplo de una secuencia especificada y sus variantes de la secuencia de aminoácido, tal como inmunoadhesinas,
5 fusiones N-terminal a secuencias de señal heterólogas.

"Homología" con respecto a un polipéptido nativo y sus derivado funcionales se define aquí como el porcentaje de los residuos de aminoácido en la secuencia candidato que son idénticos a los residuos de un polipéptido nativo correspondiente, después de
10 alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de homología, y no considerando ninguna substitución conservadora como parte de la identidad de la secuencia. Tampoco las extensiones N- o C- terminal deberán construirse como reduciendo la identidad u homología. Los métodos
15 y programas de computadora para la alineación son bien conocidos.

"Aminoácido(s)", se refiere a todos los L- α -aminoácidos de existencia natural, por ejemplo e incluyendo D-aminoácidos. Los aminoácidos se identifican a través de ya sea designaciones de una sola letra o de tres letras bien conocidas.

20 El término "variante de secuencia de aminoácido" se refiere a moléculas con algunas diferencias en sus secuencias de aminoácido según comparadas con un polipéptido de acuerdo con la presente invención, por ejemplo de una secuencia especificada. Las variantes de la secuencia de aminoácido de un polipéptido de acuerdo con la
25 presente invención, por ejemplo de una secuencia especificada, aún

32
31

tienen la habilidad de enlazarse a CD45RO y CD45RB. Las variantes de sustitución son aquellas que tienen por lo menos un residuo de aminoácido removidos y un aminoácido diferente 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 individuales, cuando solamente un aminoácido en la molécula ha sido substituido, o pueden ser múltiples, cuando dos o más aminoácido han sido substituidos en la misma molécula. Las variantes 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 ya sea el grupo funcional α -carboxi o α -amino del aminoácido. Inmediatamente adyacente a un aminoácido quiere decir conectado a ya sea el grupo funcional α -carboxi o α -amino del aminoácido. Las variantes de eliminación son aquellas con uno o más aminoácidos en un polipéptido de acuerdo con la presente invención, por ejemplo de una secuencia especificada, removidos. Generalmente, las variantes de eliminación tendrán uno o dos aminoácidos eliminados en una región particular de la molécula.

También se encontró que las secuencias de polinucleótido de

- GGCCAGTCAGAACATTGGCACAAGCATACAGTG (SEC ID NO: 25), que codifica la secuencia de aminoácido de CDR1;

25 - TTCTTCTGAGTCTATCTCTGG (SEC ID NO: 26), que codifica

la secuencia de aminoácido de CDR 2;

- ACAAAGTAATACCTGGCCATTTCACGTT (SEC ID NO: 27), que codifica la secuencia de aminoácido de CDR 3;

5 - TTATATTATCCACTG (SEC ID NO: 28), que codifica la secuencia de aminoácido de CDR1',

- TTTTATTCCTTACAATCATGGTACTAAGTACAATGAGAAGTT CAAAGGCAG (SEQ ID NO: 29), que codifica la secuencia de aminoácido de CDR2';

10 AGGACCCTATGCCTGGTTTGACACCTG (SEC ID NO: 30), que codifica la secuencia de aminoácido de CDR3';

- SEC ID NO: 5 que codifica un polipéptido de SEQ ID NO: 1, es decir la región variable de una cadena ligera de un mAb de acuerdo con la presente invención;

15 - SEC ID NO: 6 que codifica un polipéptido de SEC ID NO: 2, es decir la región variable de una cadena pesada de un mAb de acuerdo con la presente invención;

- SEQ ID NO: 11 que codifica un polipéptido de SEC ID NO: 9, es decir, una región variable de cadena pesada que incluye CDR1, CDR2 y CDR3 de acuerdo con la presente invención;

20 - SEC ID NO: 12 que codifica un polipéptido de SEC ID NO: 10, es decir una región variable de cadena pesada que incluye CDR1, CDR2 y CDR3 de acuerdo con la presente invención;

25 - SEC ID NO: 13 que codifica un polipéptido de SEC ID NO: 7, es decir, una región variable de cadena ligera que incluye CDR1', CDR2' y CDR3' de acuerdo con la presente invención;

34
33

- SEC ID NO: 14 que codifica un polipéptido de SEC ID NO: 8, es decir a una región variable de cadena ligera que incluye CDR1', CDR2' y CDR3' de acuerdo con la presente invención;

- SEC ID NO: 33 que codifica un polipéptido de SEC ID NO: 8, es decir a una región variable de cadena ligera que incluye CDR1', CDR2' y CDR3' de acuerdo con la presente invención;

- SEC ID NO: 34 que codifica un polipéptido de SEC ID NO: 31, es decir una región variable de cadena pesada que incluye CDR1, CDR2 y CDR3 de acuerdo con la presente invención; y

- SEC ID NO: 35 que codifica un polipéptido de SEC ID NO: 32, es decir una región variable de cadena pesada que incluye CDR1, CDR2 y CDR3 de acuerdo con la presente invención.

En otro aspecto la presente invención provee polinucleótidos aislados que comprenden polinucleótidos que codifican la molécula de enlace CD45RO/RB, por ejemplo que codifica la secuencia de aminoácido de CDR1, CDR2 y CDR3 de acuerdo con la presente invención y/o, preferiblemente y, polinucleótidos que codifican la secuencia de aminoácido de CDR1', CDR2' y CDR3' de acuerdo con la presente invención; y

Los polinucleótidos que comprenden un polinucleótido de SEC ID NO: 5 y/o, preferiblemente y, un polinucleótido de SEC ID NO: 6; y

polinucleótidos que comprenden polinucleótidos que codifica un polipéptido de SEC ID NO: 7 o SEC ID NO: 8 y/o, preferiblemente y, un polipéptido de SEC ID NO: 9 o SEC ID NO: 10; por ejemplo que

35
34

codifica

- un polipéptido de SEC ID NO: 7 y un polipéptido de SEC ID NO: 9,

5 - un polipéptido de SEC ID NO: 7 y un polipéptido de SEC ID NO: 10,

- un polipéptido de SEC ID NO: 8 y un polipéptido de SEC ID NO: 9, o

- un polipéptido de SEC ID NO: 8 y un polipéptido de SEC ID NO: 10; y

10 polinucleótidos que comprenden un polinucleótido de SEC ID NO: 11 o de SEC ID NO: 12 y/o, preferiblemente y, a polinucleótido de SEC ID NO: 13 o un polinucleótido de SEC ID NO: 14, preferiblemente que comprende

- un polinucleótido de SEC ID NO: 11 y un polinucleótido de SEC ID NO: 13,

- un polinucleótido de SEC ID NO: 11 y un polinucleótido de SEC ID NO: 14,

- un polinucleótido de SEC ID NO: 12 y un polinucleótido de SEC ID NO: 13, o

20 - un polinucleótido de SEC ID NO: 12 y un polinucleótido de SEC ID NO: 14; y

polinucleótidos que comprenden polinucleótidos que codifican un polipéptido de SEC ID NO: 31 o de SEC ID NO: 32 y/o, preferiblemente y, a un polipéptido de SEC ID NO: 7 o de SEC ID

25 NO: 8; por ejemplo que codifica

36
35

- un polipéptido de SEC ID NO: 31 y un polipéptido de SEC ID NO: 7,

- un polipéptido de SEC ID NO: 31 y un polipéptido de SEC ID NO: 8,

5 - un polipéptido de SEC ID NO: 32 y un polipéptido de SEC ID NO: 7, o

- un polipéptido de SEC ID NO: 32 y un polipéptido de SEC ID NO: 8; y

10 polinucleótidos que comprenden un polinucleótido de SEC ID NO: 34 o de SEC ID NO: 35 y/o, preferiblemente y, un polinucleótido de SEC ID NO: 33; SEC ID NO: 14 o 13.

- un polipéptido de SEC ID NO: 34 y un polipéptido de SEC ID NO: 33,

15 - un polipéptido de SEC ID NO: 34 y un polipéptido de SEC ID NO: 14,

- un polipéptido de SEC ID NO: 34 y un polipéptido de SEC ID NO: 13,

- un polipéptido de SEC ID NO: 35 y un polipéptido de SEC ID NO: 33,

20 - un polipéptido de SEC ID NO: 35 y un polipéptido de SEC ID NO: 14, o

- un polipéptido de SEC ID NO: 35 y a un polipéptido de SEC ID NO: 13.

25 "Polinucleótido", sino se especifica lo contrario aquí, incluye cualquier poliribonucleótido o poidesoxiribunucleótido, que pueden

ser ARN o ADN no modificado, o ARN o ADN modificado, que incluye sin limitación ARN de estructura de cadena individual y doble, y ARN que es una mezcla de regiones de estructura de cadena individual y doble.

5 Un polinucleótido de acuerdo con la presente invención, por ejemplo a polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácido CDR1, CDR2, CDR3, CDR1', CDR2', CDR3', o de SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 2, SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 4, SEC ID NO: 7, SEC ID NO: 8, SEC ID NO: 9, SEC ID NO: 10, SEC ID NO: 31 o SEC ID NO: 32
10 respectivamente, tal como un polinucleótido de SEC ID NO: 5, SEC ID NO: 6, SEC ID NO: 11, SEC ID NO: 12, SEC ID NO: 13, SEC ID NO: 14, SEC ID NO: 33, SEC ID NO: 34 o SEC ID NO: 35 respectivamente, incluye las variaciones alélicas del mismo y/o sus complementos respectivos; por ejemplo incluye un polinucleótido que
15 hibridiza la secuencia de nucleótido de SEC ID NO: 5, SEC ID NO: 6, SEC ID NO: 11, SEC ID NO: 12, SEC ID NO: 13, SEC ID NO: 14, SEC ID NO: 33, SEC ID NO: 34 o SEC ID NO: 35, respectivamente; por ejemplo que codifica el polipéptido que tiene por lo menos 80% de identidad con SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 2, SEC ID NO: 3, SEC ID
20 NO: 4, SEC ID NO: 7, SEC ID NO: 8, SEC ID NO: 9, SEC ID NO: 10, SEC ID NO: 31 o SEC ID NO: 32, respectivamente, por ejemplo que incluye un derivado funcional de dicho polipéptido, por ejemplo dicho derivado funcional que tiene por lo menos 85% de homología con SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 2, SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 4, SEC ID
25 NO: 7, SEC ID NO: 8, SEC ID NO: 9, SEC ID NO: 10, SEC ID NO: 31

36
37

o SEC ID NO: 32, respectivamente, por ejemplo dicho derivado funcional que incluye modificaciones covalentes de SEC ID NO: 1, SEC ID NO : 2, SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 4, SEC ID NO: 7, SEC ID NO: 8, SEC ID NO: 9, SEC ID NO : 10, SEC ID NO: 31 o SEC ID NO: 32, respectivamente, por ejemplo dicho derivado funcional que incluye variantes de la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 1, SEC ID NO : 2, SEC ID NO: 3, SEC ID NO : 4, SEC ID NO: 7, SEC ID NO: 8, SEC ID NO: 9, SEC ID NO: 10, SEC ID NO: 31 o SEC ID NO: 32, respectivamente; por ejemplo una SEC ID NO: 5, SEC ID NO: 6, SEC ID NO: 11, SEC ID NO: 12, SEC ID NO : 13, SEC ID NO: 14, SEC ID NO: 33, SEC ID NO: 34 o SEC ID NO: 35, respectivamente incluye una secuencia, como un resultado de la redundancia (degeneración) del código genético, también codifica a un polipéptido de SEC ID NO: 1, SEC ID NO : 2, SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 4, SEC ID NO: 7, SEC ID NO: 8, SEC ID NO: 9, SEC ID NO: 10, SEC ID NO: 31 o SEC ID NO: 32, respectivamente, o codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácido que tiene por lo menos 80% de identidad con la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 2, SEC ID NO : 3, SEC ID NO : 4, SEC ID NO: 7, SEC ID NO : 8, SEC ID NO: 9, SEC ID NO: 10, SEC ID NO: 31 o SEC ID NO: 32, respectivamente. Preferiblemente, las variantes alélicas o derivados funcionales tiene por lo menos la afinidad de enlace a una molécula de enlace que comprende un polipéptido de SEC ID NO: 1 y/o un polipéptido de SEC ID NO: 2, de un anticuerpo humanizado que comprende un polipéptido de SEC ID NO: 9 o de SEC ID NO: 10 y/o

39
38

un polipéptido de SEC ID NO: 7 o de SEC ID NO: 8; o de un anticuerpo humanizado que comprende un polipéptido de SEC ID NO: 31 o de SEC ID NO: 32 y/o un polipéptido de SEC ID NO: 7 o de SEC ID NO: 8.

5 Una molécula de enlace CD45RO/RB, por ejemplo que es un anticuerpo quimérico o humanizado, se puede producir a través de técnicas de ADN recombinante. De esta forma, una o más moléculas de ADN que codifican la CD45RO/RB se pueden construir, colocar bajo secuencias de control apropiadas y transferir a un huésped
10 adecuado (organismo) para la expresión de un vector apropiado.

En otro aspecto la presente invención provee un polinucleótido que codifica una cadena ligera, pesada y/o ligera de una molécula de enlace CD45RO/RB de acuerdo con la presente invención; y el uso de un polinucleótido de acuerdo con la presente invención para la
15 producción de una molécula de enlace CD45RO/RB de acuerdo con la presente invención a través de medios recombinantes.

Una molécula de enlace CD45RO/RB se puede obtener de acuerdo, por ejemplo analógicamente, a un método convencional junto con la información provista aquí, por ejemplo el conocimiento
20 de la secuencia de aminoácido de las regiones hipervariable o variable y las secuencias de polinucleótido que codifican estas regiones. Un método para construir un gen del dominio variable por ejemplo se describe en EP 239 400 y puede ser brevemente resumido como sigue: Un gen que codifica una región variable de un mAb de
25 cualquier especificidad se puede clonar. Los segmentos de ADN que

codifican la estructura y las regiones hipervariables se determinan y los segmentos de ADN que codifican las regiones hipervariables se remueven. Los casetes CDR sintéticos de estructura de cadena doble se preparan a través de síntesis de ADN de acuerdo con el
5 CDR y las secuencias de CDR como se especifica aquí. Estos casetes son provistos con extremos pegajosos para que puedan ligarse en las intersecciones de una estructura deseada de origen humano. Los polinucleótidos que codifican los anticuerpos de cadena individual también se pueden preparar de acuerdo con, por ejemplo
10 analógicamente, con un método convencional. Un polinucleótido de acuerdo con la presente invención de esta forma preparado puede ser convenientemente transferido dentro de un vector de expresión adecuado.

Las líneas de célula apropiadas se pueden encontrar por
15 consiguiente, por ejemplo, analógicamente con un método convencional. Los vectores de expresión, por ejemplo que comprenden el promotor(es) adecuado y genes que codifican partes constantes de cadena pesada y ligera son conocidos por ejemplo y están comercialmente disponibles. Los huéspedes apropiados son
20 conocidos o se pueden encontrar por consiguiente, por ejemplo analógicamente, con un método convencional e incluyen el cultivo de célula o animales transgénicos.

En otro aspecto la presente invención provee un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica la molécula
25 de enlace CD45RO/RB de acuerdo con la presente invención, por

41
42

ejemplo de la secuencia SEC ID NO: 15, SEC ID NO: 16, SEC ID NO: 17, SEC ID NO: 18, SEC ID NO: 36, SEC ID NO: 37, SEC ID NO: 38, SEC ID NO: 39, SEC ID NO: 40 o SEC ID NO: 41.

En otro aspecto la presente invención provee

5 - Un sistema de expresión que comprende un polinucleótido de acuerdo con la presente invención en donde dicho sistema de expresión es capaz de producir una molécula de enlace CD45RO/RB de acuerdo con la presente invención, en donde dicho sistema de expresión o parte del mismo está presente en una célula huésped compatible; y

10 - Una célula huésped aislada que comprende un sistema de expresión como se definió anteriormente.

Además se ha encontrado que una molécula de enlace CD45RO/RB de acuerdo con la presente invención inhibe las
15 respuestas autoinmunes primarias en una forma dependiente de dosis como se determinó a través de MLR *in vitro*. Los resultados indican que las células que han sido aloactivadas en la presencia de una molécula de enlace CD45RO/RB de acuerdo con la presente invención están debilitadas en sus respuestas al aloantígeno. Esto
20 confirma la indicación de que una molécula de enlace CD45RO/RB de acuerdo con la presente invención puede actuar directamente sobre las células T aloreactivas del productor y modula su función. Además, las propiedades funcionales de las células T del MRL primario además se estudiaron en experimentos de re-estimulación
25 en MLR secundario, utilizando células de estimulador específicas o

42
41

estimuladores de terceros para evaluar la especificidad de los efectos funcionales observados. Se encontró que las células derivadas de MLRs primarios en donde una molécula enlace CD45RO/RB de acuerdo con la presente invención está presente, fueron debilitadas en su habilidad para responder a la subsiguiente estimulación óptima con células de estimulador específicas, aunque no se agregó ningún anticuerpo a los cultivos secundarios. La especificidad de la inhibición se demostró a través de la habilidad de las células tratadas con una molécula de enlace CD45RO/RB de acuerdo con la presente invención para responder normalmente a las células del estimulador de donadores terceros no relacionados. Los experimentos de re-estimulación utilizando células T derivadas de cultivos MLR primarios de esta forma indican que las células que han aloactivado una molécula de enlace CD45RO/RB de acuerdo con la presente invención son hiporesponsivas, es decir tolerantes, al aloantígeno original. Además las actividades biológicas se describen en los ejemplos 7, y 9 a 13.

Además se encontró que la proliferación de células en células pretratadas con una molécula de enlace CD45RO/RB de acuerdo con la presente invención podría rescatarse a través de IL-2 exógeno. Esto indica que el tratamiento de células T aloreactivas con una molécula de enlace CD45RO/RB de acuerdo con la presente invención induce un estado de tolerancia. Ciertamente, las respuestas proliferativas reducidas observadas en las células tratadas con una molécula de enlace CD45RO/RB de acuerdo con la

43
42

presente invención, fue debido al debilitamiento de la función de la célula T, y estas células fueron capaces de responder a IL-2 exógeno, indicando que estas células están en un estado anérgico, verdaderamente irresponsivo. La especificidad de esta respuesta se
5 mostró a través de la habilidad de las células tratadas con una molécula de enlace CD45RO/RB de acuerdo con la presente invención para proliferar normalmente las células de donador no relacionadas con el nivel de células tratadas con control.

Además los experimentos indican que el enlace de una
10 molécula de enlace CD45RO/RB de acuerdo con la presente invención a CD45RO y CD45RB puede inhibir las respuestas de memoria de células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC) de donadores inmunizados para el antígeno de recuperación específico. El enlace de una molécula de enlace CD45RO/RB de
15 acuerdo con la presente invención a CD45RO y CD45RB de esta forma también es efectivo en la inhibición de respuestas de memoria para Ag soluble. La habilidad de una molécula de enlace CD45RO/RB de acuerdo con la presente invención para inhibir las respuestas de recuperación a tétanos en PBMC de donadores humanizados indica
20 que una molécula de enlace CD45RO/RB de acuerdo con la presente invención es capaz de activar y modular la activación de células T de memoria. Por ejemplo, estos datos indican que una molécula de enlace CD45RO/RB de acuerdo con la presente invención además de reconocer las células T aloreactivas y activadas es capaz de modular
25 su función, dando como resultado una inducción de la falta de

energía de la célula T. Esta propiedad puede ser importante en el tratamiento de respuesta inmunes en curso a autoantígenos y alérgenos y posiblemente a aloantígenos como se ve en las enfermedades autoinmunes, alergia y rechazo crónico, y enfermedades tales como psoriasis, enfermedad del bazo inflamatoria, en donde las respuestas juegan un papel en el mantenimiento del estado de la enfermedad. Se cree que es una característica importante en donde las respuestas de memoria que los autoantígenos jueguen un papel principal para el mantenimiento de la enfermedad.

También se ha encontrado que una molécula de enlace CD45RO/RB de acuerdo con la presente invención puede modular las respuestas proliferativas de la célula T en una respuesta de linfocito mezclada (MLR) *in vivo*, es decir, se encontró que una molécula de enlace CD45RO/RB de acuerdo con la presente invención tiene las propiedades inhibitoras correspondientes en pruebas *in vivo*, tal como por ejemplo, la prevención de la enfermedad de injerto xenogénico letal contra huésped (GvHD) o supresión del proceso inflamatorio que media el rechazo de piel del aloinjerto humano en modelos de ratones SCID, o prolonga la supervivencia de otros aloinjertos de isleta humanos en un modelo de ratones hu-PBL-NOD/SCID.

Una molécula de enlace CD45RO/RB de acuerdo con la presente invención de esta forma puede tener propiedades inmunosupresoras y tolerogénicas y puede ser útil para una

45
44

inducción de tolerancia *in vivo* y *ex vivo* para aloantígenos, autoantígenos, alogenos y antígenos de la flora intestinal, por ejemplo a molécula de enlace CD45RO/RB de acuerdo con la presente invención puede ser útil en el tratamiento y profilaxis de

5 enfermedades, por ejemplo que incluyen enfermedades autoinmunes, tales como, pero no limitándose a, artritis reumatoide, artritis psoriática, tiroiditis autoinmune, enfermedad de Graves, diabetes de tipo I y de tipo II, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn (CD), colitis ulcerativa (UC), lupus eritematoso sistémico, síndrome de

10 Sjogren, escleroderma, gastritis autoinmune, glomerulonefritis, rechazo al trasplante, tal como, pero no limitándose a rechazo de aloinjerto y xenoinjerto de órgano y tejido, por ejemplo para el tratamiento de receptores de por ejemplo corazón, pulmón, corazón-pulmón combinados, hígado, riñón, trasplantes pancreáticos, de piel

15 o corneo, enfermedad de injerto contra huésped (GVHD), tal como después del trasplante de médula espinal, y/o rechazo al trasplante de célula de isleta pancreática, y/o también psoriasis, dermatitis tal como dermatitis atópica y de contacto que incluye dermatitis de contacto alérgica, enfermedad de los intestinos inflamatoria y/o

20 alergias, que incluyen el asma alérgica.

En otro aspecto la presente invención provee el uso de una molécula de enlace CD45RO/RB de acuerdo con la presente invención como un farmacéutico, por ejemplo en el tratamiento de profilaxis de enfermedades autoinmunes, rechazo al trasplante, por

25 ejemplo rechazo al trasplante de células de isleta pancreáticas, o

46
45

enfermedad de injerto contra huésped (GVHD), psoriasis, dermatitis, enfermedad de los intestinos inflamatoria y/o alergias.

En otro aspecto la presente invención provee una molécula de enlace CD45RO/RB de acuerdo con la presente invención para la
5 producción de un medicamento en el tratamiento y profilaxis de enfermedades asociadas con enfermedades autoinmunes, rechazo al trasplante, por ejemplo rechazo al trasplante de células de isleta pancreáticas, o enfermedad de injerto contra huésped (GVHD), psoriasis, dermatitis, enfermedad de los intestinos inflamatoria y/o
10 alergias.

En otro aspecto la presente invención un método para el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades asociadas con enfermedades autoinmunes, rechazo al trasplante, psoriasis, dermatitis, enfermedad de los intestinos inflamatoria y/o alergias que
15 comprende administrar a un sujeto en la necesidad de dicho tratamiento y/o profilaxis una cantidad efectiva de una molécula de enlace CD45RO/RB de acuerdo con la presente invención, por ejemplo en la forma de una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención.

20 Una modalidad de la presente invención provee un método para el tratamiento y/o profilaxis de una enfermedad asociada con el rechazo del trasplante de célula de isleta, por ejemplo rechazo al trasplante de célula de isleta, que comprende administrar a un sujeto en la necesidad de dicho tratamiento y/o profilaxis una cantidad
25 efectiva de una molécula o un anticuerpo humanizado de acuerdo con

la presente invención.

En modalidades preferidas dicha molécula de enlace CD45RO/RB para uso como un farmacéutico, para la producción de un medicamento o en un método para el tratamiento y/o profilaxis de una enfermedad asociada con enfermedades autoinmunes, rechazo al trasplante, psoriasis, dermatitis, enfermedad de los intestinos inflamatoria y/o alergias comprende un polipéptido de SEC ID NO: 31 o de SEC ID NO: 32 y/o un polipéptido de SEC ID NO: 7 o de SEC ID NO: 8. Preferiblemente la molécula de enlace CD45RO/RB comprende un polipéptido de SEC ID NO: 31 y un polipéptido de SEC ID NO: 8.

Una "cantidad efectiva" de una molécula de enlace CD45RO/RB es una cantidad suficiente para lograr los resultados benéficos o deseados que incluyen resultados clínicos tales como la disminución de uno o más síntomas que resultan de la enfermedad autoinmune, rechazo al trasplante, psoriasis, dermatitis, enfermedad de los intestinos inflamatoria y/o alergia, disminución de la calidad de vida de aquellos que sufren de, disminución de la dosis de otros medicamentos requeridos para tratar dichas enfermedades, mejorando el efecto de otro medicamento, retrasando el avance de la enfermedad, y/o prolongando la supervivencia de los pacientes, ya sea directa o indirectamente.

Una cantidad efectiva se puede administrar en una o más administraciones y puede o no puede lograrse en conjunción con otro fármaco, compuesto o composición farmacéutica. De esta forma una

46
47

"cantidad efectiva" se puede considerar en el contexto de una administración de uno o más agentes terapéuticos, y un solo agente puede considerarse como dado en una cantidad efectiva si, en conjunción con uno o más de otros agentes, puede dar o lograrse un
5 resultado deseado.

Además se provee que una molécula de enlace CD45RO/RB de la invención se puede administrar como el ingrediente activo solo o junto con otros fármacos en regímenes inmunomoduladores, u otros agentes anti-inflamatorios por ejemplo para el tratamiento o
10 prevención de enfermedades asociadas con enfermedades autoinmunes, rechazo al trasplante, psoriasis, dermatitis, enfermedad de los intestinos inflamatoria y/o alergias. Por ejemplo, a molécula de enlace CD45RO/RB de la invención se puede utilizar en combinación con un inhibidor de calcineurina, por ejemplo
15 ciclosporina A, ciclosporina G, FK-506, ABT-281, ASM 981; un inhibidor mTOR, por ejemplo rapamicina, 40-O-(2-hidroxi)etil-rapamicina, CC1779, ABT578, AP23573, AP23464, AP23675, AP23841, TAFA-93, biolimus-7 o bioimus-9; un corticoesteroide; ciclofosfamida; azatioprina; metotrexata; un agonista del receptor
20 S1P, por ejemplo FTY 720 o un análogo del mismo; leflunomida o análogos del mismo; mizoribina; ácido micofenólico; micofenolato de mofetilo; 15-desoxiespergualina o análogos de la misma; anticuerpos monoclonales inmunosupresores, por ejemplo anticuerpos monoclonales para receptores de leucocitos, por ejemplo, MHC, CD2,
25 CDS, CD4, CD11a/CD18, CD7, CD25, CD27, B7, CD40, CD45, CD58,

43

CD137, ICOS, CD150 (SLAM), OX40, 4-1BB o sus ligandos, por ejemplo CD154; u otros compuestos inmunomoduladores, por ejemplo una molécula recombinante de enlace que tiene una porción del dominio extracelular de CTLA4 o un mutante del mismo, por ejemplo en por lo menos una porción extracelular de CTLA4 o un mutante del mismo enlazado a una secuencia de proteína no-CTLA4, por ejemplo CTLA41g (por ejemplo la designada ATCC 68629) o un mutante de la misma, por ejemplo LEA29Y, u otros inhibidores de la molécula de adhesión, por ejemplo mAbs o inhibidores de bajo peso molecular que incluye antagonistas LFA-1, antagonistas de Selectina y antagonistas de VLA-4.

Una cantidad efectiva de una molécula de enlace CD45RO/RB de la invención, sola o en conjunción con otro fármaco, compuesto, o composición farmacéutica se puede administrar a través de cualquier ruta convencional, que incluye inyección y a través de infusión gradual a través del tiempo. La administración puede, por ejemplo, ser oral, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intracavidad, subcutánea, tópica o transdérmica. Por "co-administración" se quiere dar a entender la administración de los componentes de las composiciones de la invención junto con o substancialmente al mismo tiempo, ya sea en el mismo vehículo o en vehículos separados, por lo que a través de administración oral, por ejemplo, ambos compuestos están presentes simultáneamente en el tracto gastrointestinal. Preferiblemente, los compuestos se administran como una combinación fija.

En otro aspecto la presente invención provee una composición farmacéutica comprende una molécula de enlace CD45RO/RB de acuerdo con la presente invención en asociación con por lo menos un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

5 El término "portador o diluyente farmacéuticamente aceptable" como se utilice aquí, significa uno o más llenadores, diluyentes o sustancias para la encapsulación sólidos o líquidos compatibles, que son adecuados para la administración a un mamífero incluyendo seres humanos. El término "portador" denota un ingrediente orgánico
10 o inorgánico, natural o sintético, con el cual el ingrediente activo se combina para facilitar la aplicación.

El término "farmacéuticamente aceptable" significa un material no tóxico que no interfieren con la efectividad de la actividad biológica de los ingredientes activos. Dichas preparaciones pueden
15 rutinariamente contener concentraciones farmacéuticamente aceptables de sales, agentes reguladores de pH, conservadores, portadores compatibles, agentes de potenciación inmune complementaria tales como auxiliares y citocinas y opcionalmente otros agentes terapéuticos, tales como agentes quimioterapéuticos.

20 Cuando se utilice en medicina, las sales deberán ser farmacéuticamente aceptables pero no se pueden utilizar convenientemente sales farmacéuticamente aceptables para preparar sales farmacéuticamente aceptables de las mismas y no se excluyen del alcance de la invención.

25 Las composiciones farmacéuticas puede contener agentes

reguladores de pH adecuados, que incluyen: ácido acético en una sal; ácido cítrico en una sal, ácido bórico en una sal; y ácido fosfórico en una sal.

Las composiciones farmacéuticas también pueden contener,
5 opcionalmente, conservadores adecuados, tales como: cloruro de benzalconio; clorobutanol; parabenes y timerosal.

Las dosis del polipéptido o ácido nucleico que codifican dicho polipéptido administrado a un sujeto, se puede seleccionar de acuerdo con diferentes parámetros, en particular de acuerdo con el
10 modo de administración utilizado y el estado del sujeto. Otros factores incluyen el período de tratamiento deseado. En el caso en que una respuesta en un sujeto sea insuficiente a las dosis iniciales aplicadas, se pueden emplear dosis más altas (o efectivamente dosis más altas a través de una ruta de suministro diferente, más
15 localizada) puede emplearse para abarcar la tolerancia que el paciente permita.

Las composiciones farmacéuticas pueden presentarse convenientemente en una forma de dosificación unitaria y puede prepararse a través de cualquiera de los métodos conocidos en la
20 técnica de la farmacia. Todos los métodos incluyen el paso de traer el ingrediente activo en asociación con un portador que constituye uno o más ingredientes secundarios. En general, las composiciones se preparan trayendo uniformemente e íntimamente el compuesto activo en asociación con un portador líquido, un portador sólido
25 finamente dividido, o ambos, y después, si es necesario, dándole

forma al producto.

Las composiciones adecuadas para administración oral se pueden presentar como unidades distintas, tales como cápsulas, tabletas, grajeas, cada una conteniendo una cantidad predeterminada del compuesto activo. Otras composiciones incluyen suspensiones en líquidos acuosos o líquidos no acuosos tal como un jarabe, elixir, o una emulsión.

Las composiciones adecuadas para administración parenteral convenientemente comprenden una preparación acuosa o no acuosa estéril de un polipéptido o 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 o de humectación adecuados y agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o solvente no tóxico, parenteralmente aceptable, por ejemplo, como una solución de 1,3-butan diol. Entre los vehículos y solventes aceptables que se pueden emplear están agua, solución de Ringer, solución de cloruro de sodio isotónica. Además, se emplean convenientemente aceites fijos, estériles como un solvente o medio de suspensión. Para este propósito cualquier aceite fijo blando se puede emplear, que incluye mono o diglicéridos sintéticos. Además, se pueden utilizar ácidos grasos tal como ácido oleico en la preparación de inyectables. La formulación portadora adecuad para administración oral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, etc. se

5B
52

puede encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA.

Una composición farmacéutica puede comprender además, por ejemplo, ingredientes activos, por ejemplo otros anticuerpos
5 inmunomoduladores tales como, pero no confinados a anti-ICOS, anti-CD154, anti- CD134L o proteínas recombinantes tales como, pero no limitadas a rCTLA-4 (CD152), rOX40 (CD134), o agentes anti-inflamatorios o compuestos inmunomoduladores tales como, pero no limitándose a ciclosporina A, FTY720, RAD, rapamocina, FK506,
10 15-desoxiespergualina, esteroides; como se describió anteriormente. Dicha composición farmacéutica puede comprender una molécula de enlace CD45RO/RB de acuerdo con la invención y fármacos inmunomoduladores y/o agentes anti-Inflamatorios en formas de dosificación unitarias separadas, preferiblemente en donde las
15 formas de dosificación unitarias son adecuadas para la administración de los compuestos componentes en cantidades sinérgicamente efectivas, junto con las instrucciones para su uso, opcionalmente con medios adicionales para facilitar el cumplimiento con la administración de los compuestos componentes, por ejemplo,
20 una etiqueta o dibujos. Las composiciones de la invención se pueden administrar como una combinación fija, o se pueden formular en una combinación fija. Las dosificaciones absolutas de los compuestos variarán dependiendo de un número de factores, por ejemplo, la velocidad de liberación del ingrediente activo y la naturaleza y
25 severidad de la condición que se va a tratar.

Las enfermedades como se describieron anteriormente que se van a tratar con una molécula de enlace CD45RO/RB de la presente invención sola o en combinación con otros fármacos incluyen, pero no se limitan a enfermedades autoinmunes, que incluye artritis reumatoide, artritis psoriática, tiroiditis autoinmune, enfermedad de Graves, diabetes de tipo I y de tipo II, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn (CD), colitis ulcerativa (UC), lupus sistémico eritematoso, síndrome de Sjögren, escleroderma, gastritis autoinmune y glomerulonefritis; rechazo al trasplante, incluyendo, pero no limitándose a rechazo de aloinjerto y xenoinjerto de órgano y tejido, por ejemplo para el tratamiento de receptores de por ejemplo corazón, pulmón, corazón-pulmón combinados, hígado, riñón, trasplantes pancreáticos, de piel o corneo, enfermedad de injerto contra huésped (GVHD), tal como después del trasplante de médula espinal, y/o rechazo al trasplante de célula de isleta pancreática; psoriasis; dermatitis tal como dermatitis atópica y de contacto que incluye dermatitis de contacto alérgica; enfermedad de los intestinos inflamatoria y/o alergias, que incluyen asma alérgica.

20

EJEMPLOS

La invención será más completamente entendida haciendo referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, no deberán construirse como limitantes del alcance de la invención. En los siguientes ejemplos todas las temperaturas están en grados Celsius.

25

55
54

El "mAb candidato" o "anticuerpo quimérico" es una molécula de enlace CD45RO/RB de acuerdo con la presente invención que comprende la cadena ligerea de SEC ID NO: 3 y la cadena pesada de SEC ID NO: 4.

5 El "anticuerpo humanizado" es una molécula de enlace CD45RO/RB de acuerdo con la presente invención que comprende un polipéptido de SEC ID NO: 8 y un polipéptido de SEC ID NO: 9 (VHE/humV1, VHENL1 o VHENLh), un polipéptido de SEC ID NO: 8 y un polipéptido de SEC ID NO: 10 (VHQ/humV1, VHQNL1 o VHQNLh);
10 un polipéptido de SEC ID NO: 7 y un polipéptido de SEC ID NO: 9 (VHE/humV2, VHENL2 o VHENLm); un polipéptido de SEC ID NO: 7 y un polipéptido de SEC ID NO: 10 (VHQ/humV2, VHQNL2 o VHQNLm); un polipéptido de SEC ID NO: 8 y un polipéptido de SEC ID NO: 31 (VHEN73D/humV1, VHEN73DNL1 o VHEN73DNLh); un
15 polipéptido de SEC ID NO: 8 y un polipéptido de SEC ID NO: 32 (VHQN73D/humV1, VHQN73DNL1 o VHQN73DNLh); un polipéptido de SEC ID NO: 7 y un polipéptido de SEC ID NO: 31 (VHEN73D/humV2, VHEN73DNL2 o VHEN73DNLm); o un polipéptido de SEC ID NO: 7 y un polipéptido de SEC ID NO: 32 (VHQN73D/humV2, VHQN73DNL2 o
20 VHEN73D NLm).

Se utilizaron as siguientes abreviaturas:

- | | |
|----------|--|
| APC | célula de presentación de antígeno |
| CEX | cromatografía de intercambio de catión |
| c. p. m. | conteos por minuto |
| 25 dhfr | reductasa de dihidrofolato |

	EDTA	ácido etilen dinitrilo tetra acídico
	ELISA	ensayo inmunoabsorbente enlazado a enzima
	ESI-Q-TOF	tiempo de vuelo, cuádruple de ionización por electroaspersión
5	FACS	clasificación de célula activada con fluorescencia
	Fc	fragmento cristizable
	F(ab')₂	enlace del fragmento de antígeno; bivalente
	FITC	isotiocianato de fluoresceína
10	FBS	suero de bovino fetal
	GVHD	enfermedad de injerto contra huésped
	HCMV	promotor de citomegalovirus humano
	HPLC	Cromatografía de Líquido de Alto Rendimiento
	IFN-γ	interferón gama
15	IgE	isótopo E de inmunoglobulina
	IgG	isótopo G de inmunoglobulina
	IL-2	interleucina-2
	IU	unidades internacionales
	MALDI-TOF	tiempo de vuelo de la ionización de absorción
20	de láser asistida con matriz	
	MLR	reacción de linfocito mezclada
	MLC	cultivo de linfocito mezclado
	MP1	proteína de matriz 1 de influenza hemofílica
	MTX	metotrexato
25	PBS	salina regulada en su pH de fosfato

57
56

	PBL	leucocitos sanguíneos periféricos
	PBMC	células mononucleares sanguíneas periféricas
	PCR	reacción de cadena de polimerasa
	RP	cromatografía de fase inversa
5	SEC	cromatografía de exclusión de tamaño
	SCID	inmunodeficiencia combinada severa
	T _{reg}	células T reguladoras
	xGVHD	enfermedad de xenoinjerto contra huésped

10

EJEMPLO 1

Respuesta del linfocito mezclado primario (MLR)

Se obtuvieron muestras de sangre de células de donadores humanos sanos. Las células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC) se aislaron a través de centrifugación sobre Ficoll-Hypaque (Pharmacia LKB) de leucocitos de sangre periférica completa, leucoféresis o capa de leucocitos con tipo de sangre conocido, pero tipo HLA desconocido. En algunos experimentos MLR, PBMC se utilice directamente como las células del estimulador después de irradiación a 40 Gy. En otros experimentos, las células T se consumen de PBMC mediante el uso de Dynabeads CD2 o CD3 (Dynal, Oslo, Noruega). Las perlas y las células contaminadoras se remueven a través del campo magnético. El PBMC consumido de las células T, las células T CD3⁺ o células T CD4⁺ se utilizan como las células que responden en MLR. Las células se preparan de

38
5X

diferentes donadores para las células estimuladoras. Las células T CD3⁺ se purifican a través de la selección negativa utilizando el anti-CD16 mAb (Zymed, CA), Dynabead IgG de anti-ratón de cabra, Dynabeads anti-CD14, Dynabeads CD19. Además las Dynabeads anti-CD8 se utilizan para purificar las células T CD4⁺. Las células obtenidas se analizan mediante FACScan o FACSCalibur (Becton Dickinson & Co., CA) y la pureza de las células obtenidas fue de >75%. Las células se suspendieron en medio RPMI1640, suplementado con 10% FBS inactivado con calor, penicilina, estreptomycin y L-glutamina.

Reactivos

El "mAb candidato" mAb anti-CD45RO/RB quimérico y un isótopo del anticuerpo quimérico de control comparado también se generó. El anticuerpo IgG de control de ratón (humano) específico para KLH (hemocianina de limpeta de agujero de llave) o IL-10 humano recombinante se compró en BD Pharmingen (San Diego, CA). El mAb 5c8 anti-humano CD154 es de acuerdo con Lederman y otros 1992.

20

Respuesta del linfocito mezclado primario (MLR)

Se mezclaron alícuotas de 1×10^5 PBMC o 5×10^4 de células CD3⁺ o CD4⁺ con 1×10^5 de PBMC irradiado o PBMC irradiado células T consumidas de 5×10^4 (50 Gy) en cada cavidad de las placas de 96 cavidades (Costar, Cambridge, MA) en la presencia del

25

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

Otros experimentos son similares a aquellos descritos
10 anteriormente, pero con las siguientes excepciones: 1) El medio utilizado es EX-VIVO (Bio-Whittaker) conteniendo 10% de FBS y 1% de plasma humano; 2) El IgG anti-ratón (5 µg/l) se utilizó como el paso de entrelazamiento secundario; 3) La irradiación de las células estimuladoras es 60 Gy.

15 El MLR primario se llevó a cabo en la presencia del "mAb candidato" o IgG quimérico de control (10 µg/ml), ambos con un segundo paso del reactivo, el fragmento F(ab')₂ de Ig anti-humano de cabra específico para la porción Fc (10 µg/ml). El porcentaje de inhibición a través del "mAb candidato" se calculó en comparación
20 con la proliferación de célula en la presencia de IgG de control. Los resultados se muestran en el CUADRO 1 siguiente:

60
59

CUADRO 1

**Inhibición de MLR primario mediante 10 µg/ml de mAb candidato
de acuerdo con la presente invención**

5	El que responde	Estimulador (Irr. PBMC)	% de Inhibición
	#211 CD4	#219 CD3	63.51
	#220 CD4	#219 CD3 cons.	63.07
	#227 CD4	#220 CD3 cons.	65.96
	#229 CD4	#219 CD3 cons.	50.76
10	Promedio±SD		60.83±6.83*

* Significativamente diferente del valor de control (P<0.001)

Un mAb candidato de acuerdo con la presente invención inhibe el MLR primario como se puede ver en el CUADRO 1. El efecto
15 inhibidor promedio es de 60.83 ± 6.83% en cuatro diferentes células T CD4⁺ derivadas de donadores y estadísticamente significativos.

La inhibición de MLR primario a través de "mAb candidato" se muestra como siendo dependiente de la dosis en el rango de 0.001 y 10 µg/ml del "mAb candidato" como se muestra en la Figura 1.

20 La IC₅₀ para la inhibición del MLR primario a través de un "mAb candidato" se determinó de los resultados de tres experimentos MLR separados utilizando un PBMC de donador como células que responden. De esta forma, las células T CD4⁺ que responden como estimuladoras se mezclan en la presencia de un "mAb candidato" o
25 Ab quimérico de control con 10 µg/ml del fragmento F(ab')₂ de Ig

67
68

anti-humano de cabra. Los experimentos se repitieron 3 veces y el porcentaje de proliferación en la presencia de un "mAb candidato" se calculó en comparación con la proliferación de la célula T en la presencia de Ab de control. El valor IC_{50} se determinó utilizando Origen (V. 6.0®). El valor IC_{50} de la actividad celular se calculó como siendo 0.87 ± 0.35 nM (0.13 ± 0.052 4 μ g/ml).

EJEMPLO 2

MLR Secundario

10

Con el fin de evaluar si un "mAb candidato" induce falta de respuesta de células T $CD4^+$ a aloantígenos específicos, el MLR secundario se lleva a cabo en la ausencia de cualquier anticuerpo después del MLC primario. Las células T $CD4^+$ se cultivan con células estimuladoras alogénicas irradiadas (PBMC consumido de células T) en la presencia del anticuerpo indicado en placas de cultivo de 96 cavidades durante 10 días (MLC primario). Después las células se recolectan, se estratifican sobre un gradiente Ficoll-Hypaque para remover las células muertas, se lavan dos veces con RPMI, y se reestiman con el mismo estimulador, las células estimuladoras terceras o IL-2 (50 U/ml). Las células se cultivan durante 3 días y la respuesta proliferativa se determina a través de la pulsación de las células con 3H-timidina durante por las últimas 16-20 horas del cultivo.

25

Específicamente, las células T $CD4^+$ se cultivan con células

62
61

estimuladoras alogénicas irradiadas (PBMC consumido de células T
tomadas de otros donadores) en la presencia de 10 µg/ml del "mAb
candidato", el Ab quimérico de IgG1 de control y el fragmento F(ab')
2 de Ig anti-humano de cabra. La proliferación de MLR primario se
5 determinó el día 5. Para el MLR secundario, las células que
responden y las estimuladoras se cultivan durante 10 días en la
presencia del "mAb candidato", después la células se cosechan, se
lavan dos veces en RPM11640 y se vuelven a estimular con el
estimulador específico, estimuladores terceros o IL-2 (50 U/ml) en la
10 ausencia de cualquier Ab. La proliferación de células se determina
en el día 3. Los resultados se establecen en el CUADRO 2:

CUADRO 2

15	# de donador de células T CD4 ⁺ que responden	% de inhibición de 2 ^o MLR
	#211	49.90*
	#220	59.33*
	#227	58.68*

* Significativamente diferente del valor de control (p=<0.001
20 determinado a través de la prueba t, SigmaStat V. 2.03). # p=<0.046

Con el fin de probar si la proliferación debilitada es debido a la
falta de respuesta como una consecuencia del tratamiento con un
"mAb candidato", las células derivadas del MLR primario se
25 cultivaron en la presencia de IL-2 (50 U/ml). Además de los

43
62

resultados de IL-2 en el rescate de las respuestas proliferativas de las células T que han sido tratadas con un "mAb candidato" en MLR primario, los niveles similares a aquellos observados en la presencia de IgG, Ab de control. Estos datos indican que la respuesta
5 secundaria debilitada en células T tratadas con un "mAb candidato" se debe a la alteración funcional de las células T que responden, las cuales se vuelven no sensibles a las células estimuladoras específicas.

La inhibición porcentaje se calcula de acuerdo con la siguiente
10 fórmula:

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

15 El Análisis estadístico se llevó a cabo utilizando SigmaStat (Vers. 2.03).

Los datos se analizaron a través de ANOVA de dos vías seguido por el método Dunnett. En todas las probabilidades de los procedimientos de prueba de <0.05 se consideraron como
20 significativas. En algunas pruebas t de los experimentos se utilizó (SigmaStat V. 2.03).

EJEMPLO 3

Estudios de supervivencia *in vivo* en ratones SCID

25

Injertos de hu-PBL en ratones SCID

Se Inyectaron células mononucleares de sangre periférica

humana (PBMC) intraperitonealmente en ratones SCID C.B 17 /ratones *Lyst^{bb} GbmsTac-Prkdc^{scid}* (Taconic, Germantown, NY) en una cantidad suficiente para inducir una enfermedad de injerto xenogénico contra huésped (xGvHD) en >90% de los ratones dentro de las cuatro semanas después de la transferencia de la célula. Dichos ratones SCID tratados a continuación se designan como e ratones hu-PBL-SCID.

Tratamiento Mab de ratones hu-PBL-SCID

Los ratones hu-PBL-SCID se trataron con un "mAb candidato" o mAb controlado comparados de isótopo de ratón o quiméricos en el día 0, inmediatamente después de la inyección de PBMC, en el día 3, el día 7 e intervalos semanales de ahí en adelante. Los mabs se suministraron subcutáneamente en 100 µl e PBS a una concentración final de 5 mg/kg del peso del cuerpo. El tratamiento se detuvo cuando todos los ratones de control murieron.

Evaluación de los resultados de tratamiento

El criterio principal para evaluar la eficacia de un "mAb candidato" en este estudio fue la supervivencia de los ratones hu-PBL-SCID. La importancia de los resultados se evaluó a través del método estadístico del análisis de supervivencia utilizando la prueba Log-rank (método de Mantel) con la ayuda del software Systat v9.01 software. El método del análisis de supervivencia es una prueba o paramétrica, que nos solamente considera si un ratón particular

todavía está vivo sino también si fue sacrificado por razones irrelevantes para el tratamiento /enfermedad como el requerimiento de llevar a cabo análisis *in vitro* con sus órganos/células. Las biopsias del hígado, pulmón, riñón y vejiga se obtuvieron de ratones muertos para una evaluación adicional. Además, los ratones PBL-SCID se pesaron al inicio (antes de la transferencia de la célula) y a lo largo (cada dos días) del experimento como una estimación indirecta de su estado de salud. Las líneas de regresión lineales se generaron utilizando el peso del cuerpo contra los valores de la transferencia los días después de PBMC obtenidos de cada ratón y subsecuentemente, sus desviaciones (ratones de control contra ratones tratados con anti-CD45) se compararon utilizando la prueba Mann-Whitney no paramétrica.

15 **Resultados**

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

Todos los ratones tratados con hu-PBL-SCID con un "mAb candidato" sobrevivieron (4/4) sin ningún signo aparente de enfermedad más de cuatro semanas, aunque el tratamiento con el

"mAb candidato" fuera detenido después de 3 semanas. Los ratones tratados con "mAb candidato" aumentaron de peso en forma lineal, hasta aproximadamente 5% dentro de las 4 semanas.

5

EJEMPLO 4**Expresión de anticuerpos de la Invención**

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

10

Los vectores de expresión de acuerdo con los mapas del plásmido mostrados en las Figuras 2 a 11 se construyeron, comprendiendo los nucleótidos correspondientes a la codificación de la secuencia de aminoácido de el humV1 de la región de variable de cadena ligera humanizado (SEC ID NO: 8; Figuras 4 y 6), el humV2 de la región variable de cadena ligera humanizado (SEC ID NO: 7; Figuras 5 y 7), el VHE de región variable de cadena pesada humanizado (SEC ID NO: 9; Figura 3 y 10), o VHQ de la región variable de cadena pesada humanizado (SEC ID NO: 10; Figuras 2 y 11), VHE-N73D de la región variable de cadena pesada humanizado (SEC ID NO: 31; Figura 8) o VHQ-N73D de región variable de cadena pesada humanizado (SEC ID NO: 32; Figura 9), respectivamente. Estos vectores de expresión tiene 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),

15

20

25

SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 39 (humV2), o SEQ ID NO 37 (VHE-N73D) y SEQ ID NO 38 (VHQ-N73D).

Construcción de vectores de expresión de cadena ligera y pesada del anticuerpo humanizado para la expresión en células COS

Vectores de expresión de cadena ligera kappa Humanos para versiones VLh y VLm

Con el fin de construir el vector de expresión final que codifica la cadena ligera humanizada completa del isótopo kappa humano, se

10 extirparon fragmentos de ADN que codifican las regiones variables de cadena ligera completas (VLh y VLm) de VLh y VLm conteniendo los vectores de clonación del Grupo de Instrucciones PCR (Stratagene) (región VLm) utilizando HindIII y BglII. Los fragmentos purificados con gel después se subclonaron dentro de los sitios

15 HindIII y BamHI del vector de expresión kappa C21-HCMV el cual se creó durante la construcción del anticuerpo TESC-21 anti-IgE humanizado (Kolbinger y otros 1993) y el cual originalmente se recibió de M. Bendig (MRC Collaborative Centre, London, UK) (Maeda y otros, 1991). Los productos de ligación se purificaron a

20 través de la extracción de fenol/cloroformo y se electroforaron dentro de la estructura de cadena XL1-Azul Epicurian Coli® competente de electroporación (Cat. N° #200228, Stratagene). Después de colocar en placas sobre placas de agar LB/amp durante la noche a 37°C, cada 12 colonias se seleccionaron para preparar el ADN de plásmido

25 de un cultivo de 3 ml utilizando el BioRobot 9600 (Qiagen). Esto

63
68

produjo los vectores de expresión de cadena ligera para las versiones VLh y VLm del anticuerpo humanizado, respectivamente, como se describe adicionalmente en las Figuras.

5 Vectores de expresión de la cadena pesada gama-1 humana para VHQ

Para la construcción del vector de expresión VHQ, se tomó un método en pasos. Primero, la región variable completa de VHQ se ensambló a través de PCR de acuerdo con la etología como se describe en Kolbinger y otros 1993 (Protein Eng. 1993 Nov; 6(8):971-80) y se subclonó dentro de la expresión de C21-HCMV-gama-1 a partir de la cual el inserto C21 ha sido removido utilizando las mismas enzimas. Después se subclonó un fragmento HindIII/BamHI de VHQ del clon del Grupo de Instrucciones de PCR conteniendo la región variable completa dentro del vector de expresión C21-HCMV-gama-1 dividido con las mismas enzimas. Esto produjo el vector de expresión final para la versión VHQ del anticuerpo humanizado.

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

La construcción del vector de expresión VHE final que codifica la cadena pesada humanizada completa del isótopo gama-1 humano se logró ligando directamente un fragmento PCR restringido HindIII y BamHI que codifica la región variable dentro de los sitios HindIII y BamHI del vector de expresión C21-HCMV gamma-1, el cual se creó durante la construcción del anticuerpo TESC-21 anti-IgE humanizado

69
68

(Kolbinger y otros. 1993) que cual también se recibió originalmente de M. Bendig (MRC Collaborative Centre, London, UK) (Maeda y otros, 1991).

5 Expresión temporal en células COS

El siguiente protocolo de transfección se adaptó para células COS adherentes en platos de 150 mm de cultivo de célula, utilizando el Reactivo de Transfección SuperFect (Cat. N° 301305, Qiagen). Los cuatro diferentes vectores de expresión descritos
10 anteriormente se utilizaron para la transfección temporal de las células. Para la expresión un anticuerpo humanizado, cada uno de los dos clones conteniendo los insertos de cadena pesada (VHE o VHQ, respectivamente) se co-transfectaron en células con cada uno de los dos clones que codifican las cadenas ligeras (humV1 o
15 humV2, respectivamente), en total 4 diferentes combinaciones de vectores de expresión de cadena pesada y ligera (VHE/humV1, VHE/humV2, VHQ/humV1 y VHQ/humV2). Antes de la transfección, los plásmidos se hicieron lineales con PvuI de endonucleasa de restricción que se divide en la región que codifica el gen de
20 resistencia para ampicilina.

El día antes de la transfección, se sembraron 4×10^6 células COS en 30 ml de medio de cultivo fresco en platos de cultivo de célula de 150 mm. El sembrado a esta densidad de célula generalmente produjo 80% de confluencia después de 24 horas. En
25 el día de la transfección, se diluyeron cuatro diferentes

70
69

combinaciones de vectores de expresión de ADN de cadena ligera y pesada en forma lineal (15 µg cada uno) en un volumen total de 900 µl de medio fresco sin suero y antibióticos. Después se mezclaron 180 µl del Reactivo de Transfección SuperFect vigorosamente con la
5 solución de ADN. La mezcla de ADN se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación del complejo. Mientras tomó lugar la formación del complejo, el medio de crecimiento se removió de los cultivos de célula COS, y las células se lavaron una vez con PBS. Después se agregaron 9 ml de medio de
10 cultivo fresco (conteniendo 10% FBS y antibióticos) a cada tubo de reacción conteniendo los complejos de transfección y se mezclaron bien. La preparación final es inmediatamente transferida a cada uno de los cuatro cultivos que van a transfectarse y se mezclan ligeramente. Los cultivos de célula después se incubaron con los
15 complejos de ADN durante 3 horas a 37°C y 5% de CO₂. Después de la incubación, el medio conteniendo los complejos de transfección se removió y se volvieron a colocar con 30 ml de medio de cultivo fresco. Los sobrenadantes se cosecharon 24 horas después de la transfección.

20

Concentración de los sobrenadantes de cultivo

Para el análisis de ELISA y FACS, los sobrenadantes de cultivo recolectados a partir de células COS transfectadas con plásmidos de cadena pesada y ligera se concentraron como sigue. Se agregaron
25 10 ml de cada sobrenadante a Dispositivos de Filtro Centrífugos

71
72

Centriprep YM-50 (Cat. N° 4310, Millipore) como se describe por el fabricante. Los filtros Centriprep se centrifugaron durante 10 minutos a 3000 rpm a temperatura ambiente. El paso de centrifugación después se repitió otra vez con los 20 ml restantes del sobrenadante utilizando solamente 5 minutos de centrifugación y supervisando la evolución de la concentración. Se recuperaron 500 µl de intermediario del sobrenadante concentrado, se transfirieron al nuevos Dispositivos de Filtro Centrífugos Micrcon (Cat. N° 42412, Microcon) y además se concentraron siguiendo el protocolo del fabricante. Los sobrenadantes concentrados se centrifugaron cuatro veces durante 24 minutos a 3000 rpm a temperatura ambiente, una vez durante 10 minutos a 6000 rpm y después, tres veces durante 5 minutos, siempre supervisando la evolución de la concentración. El volumen final del medio condicionado concentrado logrado es de 100-120 µl correspondiendo a una concentración de 250 a 300 veces el medio de cultivo original y se almacenó a 4°C hasta su uso. Para la comparación y control, el medio de cultivo de células no transfectadas se concentra similarmente, utilizando el mismo protocolo de centrifugación descrito anteriormente.

20

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

La línea de células de mieloma de ratón Sp2/0 (ATCC, CRL-1581) se electroforaron con los vectores de expresión CHO anteriormente descritos que codifican la cadena pesada (VHE o VHQ)

25

32
71

y ligera (humV1 o humV2) de los anticuerpos humanizados de enlace CD45RO/RB. Se utilizaron cuatro diferentes combinaciones de vectores de expresión de cadena pesada y ligera (VHE/humV1, VHE/humV2, VHQ/humV1 y VHQ/humV2) para la transfección de acuerdo con el siguiente protocolo: se mezclaron 20 µg de ADN super enlazado de cada plásmido en un tubo de electroporación (huevo de 0.4 cm) con 8×10^5 de células Sp2/0 suspendidas en medio de cultivo DMEM / 10% de FCS. La configuración de la electroporación es 1500 V, 25 µF utilizando un instrumento GenePulser de BioRad. Después de la electroporación, las células se cultivaron durante 20 horas en medio de cultivo (DMEM suplementado con 10% de penicilina FCS, estreptomicina y L-glutamina). En el día dos el fármaco de la selección G418 (Cat. N° 10131-019, Gibco) se agregó a una concentración final de 1 mg de fármaco activo/ml y las células se distribuyeron en una placa de 96 cavidades, 200 µl cada cavidad con aproximadamente 105 células por cavidad. Quince días después, se expandieron los clones de supervivencia G418 en medio conteniendo G418. La secreción de los mAbs humanizados de estos transfectantes se evaluó a través de ELISA, utilizando un IgG/Fcy anti-humano de cabra de capa de anticuerpo (Cat. N° 109-005-098, Jackson Labs) y un anticuerpo acoplado a peroxidasa contra la cadena ligera kappa humana (Cat. N° A-7164, Sigma). Los transfectantes, que registraron puntos positivos en este ensayo se seleccionaron para una comparación de productividad sobre bases por célula por día, otra vez utilizando

73
72

ELISA (ver más adelante). El mejor clon de cada transfectante se seleccionó para la subclonación inmediata a través de dilución limitante, utilizando una densidad de sembrado de 1 célula por cavidad. La productividad de los subclones supervivientes G418 otra vez se determina como se describió anteriormente. Los subclones se expandieron en medio de selección conteniendo G418, hasta que el volumen del cultivo alcanzó 150 ml, en cuya etapa el cultivo continuó sin G418 en matraces destinados para alimentar botellas de rodillo.

Después de esta primera transfección y selección, los transfectantes estables crecieron fuera de las placas de 96 cavidades 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 dos mejores productores son el clon 1.33.25 (3.87 pg/célula/día) 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 clon 12.1.20 (1.05 pg/célula/día) para VHQ/humV1. Los transfectantes Sp2/0 estables para VHE/humV1 y VHQ/humV1 subsecuentemente se expandieron para la producción y purificación del anticuerpo.

Los anticuerpos se purificaron de los sobrenadantes de líneas de célula de mieloma SP2/0 establemente transfectados conteniendo 10% de FCS a través de una combinación de cromatografía de afinidad utilizando una matriz IgGFc anti-humana inmovilizada y cromatografía de exclusión de tamaño. Si se requiere, la endotoxina se remueve utilizando una columna Acticlean Etox (Sterogene

Bioseparations).

Construcción de vectores de expresión de cadena pesada y ligera del anticuerpo humanizado para la expresión en células Sp2/0

5 *Vectores de expresión de cadena ligera kappa humanos para versiones VLh y VLm:*

El ADNc humV1 (= VL1) o humV2 (= VL2) se amplificó a través de PCR del plásmido de expresión CHO SEC ID NO: 17 o SEC ID NO: 18 respectivamente, utilizando los iniciadores HuCD45LC-Mlu (5'-
 10 AAAACGCGTTGTGACATTCTGCTGACCCAGTCT-3'; SEC ID NO: 42) y HuCD45LC-Hind (5'-AAAAAAGCTTGGTCCCCTGGCCGAACGTGAA-3'; SEC ID NO: 43). Cada fragmento de PCR de 321 bp se digirió con MluI y HindIII y se ligó directamente dentro del vector de expresión de cadena ligera chA6HCk.dhfr el cual se digirió con las mismas
 15 enzimas. Los plásmidos resultantes se nombraron LCVL1 Sp20 (SEC ID NO: 36; Figura 6) y LCVL2Sp20 (SEC ID NO: 39; Figura 7) respectivamente. LCVL1Sp20 entonces se utiliza para la expresión en células Sp2/0 de las moléculas de enlace CD45RO/RB VHE/humV1, VHQ/humV1 o VHE-N73D/humV1; LCVL2Sp20 después
 20 se puede utilizar para la expresión en células Sp2/0 en las moléculas de enlace CD45RO/RB VHE/humV2, VHQ/humV2 o VHE-N73D/humV2.

75
74

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

Las dos regiones de ADNc VH humanizadas se amplificaron a través de PCR de los plásmidos recombinantes HCMV-G1 HuA6-VHE (SEC ID NO: 16; Figura 3) y HCMV-G1 HuA6-VHQ (SEC ID NO: 15 Figura 2) respectivamente, utilizando los iniciadores de PCR HuCD45HCEup (5'- CAGGCAGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCA-3'; SEC ID NO: 44) o HuCD45HCQup (5'- CAGGCACAGGTGCAGCTGGTGGAGTCA-3'; SEC ID NO: 45) y HuCD45HClo (5'- AAATCCTTCTAGAACTCACCTGAGGAGAC-3'; SEC ID NO: 46). Los fragmentos PCR de extremos 3' se digirieron con BstEII. Cada fragmento PCR después se clonó dentro del recorte del vector del casete de cadena pesada HCcassREAL con BstEII y el cortador de extremo romo HindII. Los plásmidos resultantes son intermediarios para las construcciones de expresión final y son nombrados HCcassHVESP20 y HCcassVHQSP20, respectivamente. Esta subclonación también conduce a un cambio de la secuencia líder que está asociada con ambas regiones VH en los vectores originales. Mientras la secuencia de aminoácido de la secuencia líder es MDWTWRVFCLLAWAPGAHS (SEC ID NO: 47), ha sido reemplazada durante la subclonación con MAWVWTLPLMAAAQSVQA (SEC ID NO: 48).

Los Intermediarios HCcassVHESP20 o HCcassVHQSP20 son digeridos con Scal y subsecuentemente, los plásmidos se digieren con BamHI y EcoRI. Los fragmentos de 2.9 kb conteniendo el

76
95

promotor de la cadena pesada Ig y la región V_H se purifican y se ligan con el fragmento BamHI-y EcoRI de 8.7 kb digerido de una construcción de expresión de cadena pesada. Los plásmidos resultantes son nombrados HCVHESp20 (SEC ID NO: 40; Figura 10) y HCVHQSp20 (SEC ID NO: 41; 11), respectivamente; y se utilizan para la expresión en células Sp2/0 de la moléculas de enlace CD45RO/RB humanizada VHE/humV1, VHQ/humV1.

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

Los vectores de expresión HCVHESp20 (SEC ID NO: 40; Figura 10) y HCVHQSp20 (SEC ID NO: 41; Figura 11), se utilizaron como plantillas para la mutagénesis dirigida al sitio para lograr una mutación N73D (intercambio de una asparagina a aspartato en la posición 73 del aminoácido de la cadena pesada de la molécula de aminoácido CD45RO/RB). Esta mutación elimina un N-sitio putativo de glicosilación. La mutagénesis con el equipo de Mutagénesis Dirigido a Multi-Sitios QuikChange® y el iniciador aCD45H-N73D (5'-fosfo GCCACACTAACTGCAGACAAATCCATCAGCACAGC-3'; SEC ID NO: 49) de acuerdo con el manual del equipo. La secuencia de las construcciones resultantes HCVHEN73DSp20 y HCVHQN73DSp20 se confirman y se describen como SEC NO: 37 y SEC NO: 38, y las Figuras 8 y 9, respectivamente. HCVHEN73DSp20 (SEC NO: 37) junto con la construcción de la expresión de cadena ligera LCVL1 SP20 (SEC NO: 36) se utilizan para la expresión en células Sp2/0 de

la molécula de enlace VHE-N73D/humV1a CD45RO/RB.

Generación de transfectantes de mieloma Sp2/0 estables que secretan el anticuerpo VHE-N73D/humV1 anti-CD45RO/RB

5 humanizado

La línea de células de mieloma de ratón Sp2/0 Ag14.10 se electroporan con vectores que codifican la cadena pesada (HCVHEN73DSp20; SEC ID NO: 37) y ligera (LCVL1SP20; SEC ID NO: 38) de la molécula de enlace VHEN73D/humV1 CD45RO/RB humanizada. Se utilizan para la transfección de células en la fase de crecimiento exponencial con una viabilidad mayor de 95%. Las células se lavaron dos veces con regulador de pH TF frío (272 mM de sacarosa, 1 mM de MgCl₂, 7 mM de regulador de pH de fosfato 7.4) y la concentración de la célula se ajustó a 2 x 10⁷ células/ml en regulador de pH TF. Se mezclaron 0.8 ml de la suspensión de la célula con 15 µg de cada una de las construcciones de cadena pesada y ligera y se colocaron sobre hielo durante 10 minutos. Se hicieron 5 transfecciones a través de electroporación utilizando el Pulsador de Genes Biorad (280V y 25 µF). Después de la electroporación las células se colocaron sobre hielo durante 15 minutos seguido por la transferencia dentro de 50 ml de medio de cultivo frío (medio basado en RPMI sin FCS) y se incubaron durante 2 días a 37°C y 5% de CO₂.

Para la selección de los transfectantes, las células se cultivaron en la presencia de 1.1 mg/ml de G418 (Geneticin, Gibco

28
77

lote 3069464) durante aproximadamente 2 a 3 semanas. El marcador de amplificación de dhfr (reductasas de dihidrofolato) localizado en la construcción de la cadena ligera permitió la amplificación del gen dhfr gene así como del transgen a través de metotrexato del análogo de ácido fólico (MTX). Para la amplificación del gen, las células resistentes a G418 se cultivaron en la presencia de 200 nM de MTX durante un período de 2-3 semanas seguid por un aumento adicional en la concentración de MTX a 1 μ M dando como resultado un grupo de células heterogéneo amplificado. La concentración del anticuerpo se determinó a través de HPLC de Proteína A analítica. Los mejores grupos productores se seleccionaron para la clonación a través de dilución limitante, utilizando una densidad de sembrado de 0.3 células por cavidad para aislar los clones más productores.

15

EJEMPLO 5

Determinación de la expresión de IgG humano recombinante a través de ELISA

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

Para determinar las concentraciones de IgG del anticuerpo humano recombinante expresado en los sobrenadantes de cultivo, se ha desarrollado un protocolo ELISA de emparedado y optimizado utilizando IgG como estándar. Se cubrieron placas de microtitulación de 96 cavidades de fondo plano (Cat. N° 4-39454, Nunc Immunoplate

Maxisorp) durante la noche a 4°C con 100 µl de IgG anti-humano de cabra (molécula completa, Cat. N° 11011, SIGMA) a la concentración final de 0.5 µg/ml en PBS. Las cavidades después se lavaron 3 veces con regulador de pH de lavado (PBS conteniendo 0.05% de Tween 20) y se bloquearon durante 1.5 horas a 37°C regulador de pH de bloque (0.5% de BSA en PBS). Después de 3 ciclos de lavado, las muestras del anticuerpo y el IgG humano estándar (Cat. No. 14506, SIGMA) se prepararon a través de una dilución serial de 1.5 veces en regulador de pH de bloqueo. Se transflectaron 100 µl de muestras diluidas o estándares por duplicado para la placa cubierta y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de la incubación, las placas se lavaron tres veces con regulador de pH de lavado y subsecuentemente se incubaron durante 1 horas con 100 µl con IgG anti-humano de cabra kappa de cadena ligera conjugado con peroxidasa (Cat. N° A-7164, SIGMA) diluido a 1/4000 en regulador de pH de bloqueo. Las cavidades de control recibieron 100 µl de regulador de pH de bloqueo o medio de cultivo normal concentrado. Después del lavado, se realizó la cuantificación colorimétrica del enlace de peroxidasa en la muestra y las cavidades estándares, utilizando un Equipo de Substrato de Peroxidasa EIA TMB (Cat. N° 172-1067, Bio-Rad) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La mezcla de peroxidasa se agregó a 10 µl por cavidad y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. La reacción colorimétrica se detuvo mediante la adición de 100 µl de 1M de ácido sulfúrico y la

80
79

absorbancia en cada cavidad se leyó a 450 nm, utilizando un lector de placas ELISA (Modelo 3350-UV, BioRad).

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

VHE/humV1 sobrenadante = 8.26, $\mu\text{g/ml}$

VHE/humV2 sobrenadante = 6.27, $\mu\text{g/ml}$

VHQ/humV1 sobrenadante = 5.3, $\mu\text{g/ml}$

VHQ/humV2 sobrenadante = 5.56, $\mu\text{g/ml}$

Análisis de Cromatografía de Exclusión de Tamaño (SEC)

Los anticuerpos purificados de afinidad VHE/humV1, VHE/humV2, VHQ/humV1 y VHQ/humV2 se analizaron a través de Cromatografía de Exclusión de Tamaño (SEC) sobre un TSKgel Super SW3000SWXL con el fin de determinar el contenido de proteína, el porcentaje de agregados pequeños (anticuerpos oligoméricos) así como según sea posible a través de, y productos de degradación. Los cromatogramas muestran que para VHE/humV1, VHE/humV2, VHQ/humV1 y VHQ/humV2 el pico principal está dividido y que la separación es más pronunciada para grupos con cadena pesada E (Figura 12). Los resultados sugieren que hay por lo menos dos moléculas con un tiempo de retención típico para un anticuerpo IgG presente en cada muestra.

SDS-PAGE bajo condiciones de reducción

El análisis de moléculas de enlace CD45RO/RB VHE/humV1, VHE/humV2, VHQ/humV1 y VHQ/humV2 a través de SDS-PAGE bajo condiciones de reducción (gel gradiente, 4 a 20% de Tris-gel de Glicina, Novex) muestra la presencia de una banda adicional inesperada, migrando levemente por arriba de la banda correspondiente a la banda de cadena pesada de cada muestra. La diferencia en masa se estima como estando en el rango de 2 a 4 kDa. El análisis de Tinción Western revela que la banda superior se reconoce a través de los anticuerpos anti-humanos (H + L) sugiriendo que la banda adicional es una variante de cadena pesada.

Cromatografía de Intercambio de Catión (CEX)

La heterogenicidad de carga se evaluó a través de cromatografía de intercambio de catión (CEX) utilizando una columna PolyCatA (PolyLC Inc). Ya que el mAb quimérico está esencialmente libre de heterogenicidad de carga diferente de las variantes de lisina C-terminal, todas las moléculas de enlace CD45RO/RB humanizadas, es decir, VHE/humV1, VHE/humV2, VHQ/humV1 y VHQ/humV2, se encontró que son muy heterogéneas en carga. Una razón común para la heterogenicidad de carga en anticuerpos es la presencia/ausencia de Lys en el extremo C-terminal de la cadena pesada del anticuerpo dando como resultado tres picos en CEX. El número más alto de picos visibles en cada cromatograma (<10; Figura 13) indica que por lo menos una modificación adicional está presente en las cuatro

moléculas enlace CD45RO/RB.

SDS-PAGE

Con el fin de evaluar las diferencias moleculares entre las dos especies de anticuerpo encontradas en los grupos de proteínas de VHE/humV1, VHE/humV2, VHQ/humV1 y VHQ/humV2, VHE/humV2 se selecciona para ser adicionalmente analizado. Los dos picos SEC de VHE/humV2 se recolectaron en un modo semi-preparativo y se volvieron a analizar a través de SEC para confirmar su pureza. Las fracciones recolectadas por SEC (Fracción 1 y Fracción 2) después se analizaron mediante SDS-PAGE bajo condiciones de reducción. La proporción de la banda adicional inesperada a alrededor de 49 kDa es diferente entre las dos fracciones. La fracción 2 está casi libre de esta banda más alta adicional.

15

Espectrometría de Masa ESI-Q-TOF

Las fracciones SEC F1, F2 y el grupo de la proteína de VHE/humV2 después se analizaron adicionalmente a través de espectrometría de masa ESI- Q-TOF. En los espectrogramas del grupo de proteínas y la Fracción 2, se observaron los mismos grupos de señales. El primer grupo de señales a aproximadamente 148'000 Da, se encontró en el grupo de proteínas y la Fracción 2, no se detectó en la Fracción 1. En la Fracción 1, se detectó un segundo grupo de señales (a aproximadamente 150'300 Da) además de otro grupo de señales a alrededor de 152'500 Da. El segundo grupo de

25

23
92

señales a alrededor de 150'320 Da no puedo ser correlacionado con ninguna forma de anticuerpo usualmente observada. Estos hallazgos sugieren que los dos picos en SEC y las dos bandas superiores en SDS-PAGE reducido corresponden a cada una de la variantes de una
5 proteína no esperada.

Cromatografía de Fase Inversa

Para obtener un patrón menos complejo en espectrometría de masa, las cadenas de anticuerpo además se analizan de manera
10 separada. Las fracciones se reducen y se alquilan. Con el fin de confirmar el grado de compleción de las reacciones, las muestras reducidas y alquiladas se analizan a través de cromatografía de fase inversa (RP) (SORBAX, Poroshell 300SB-C8). Después de la reducción y la alquilación, la forma del pico es casi igual que
15 solamente después de la reducción. Se observó un cambio en el tiempo de retención. Se obtuvieron patrones similares para las muestras reducidas y alquiladas de la Fracción 1 y la Fracción 2 SEC. La muestra del grupo de proteínas VHE/humV2, Fracción 1 SEC y Fracción 2 SEC (reducida y alquilada) se analizó con
20 espectrometría de masas ESI-Q-TOF. Varios picos de masa se pueden asignar a las formas de anticuerpo esperadas. Los mismos picos principales se encuentran en todas las tres muestras (grupo de proteínas, F1 y F2) pero sus intensidades en la Fracción 2 son muy bajas (Figura 14).

Análisis de carbohidratos de variantes de cadena pesada

El anticuerpo reducido y alquilado se inyectó en una columna de cromatografía de fase inversa (RP) y se recolectaron los dos picos correspondientes a las variantes de cadena pesada. Después
5 se determinan las características del oligosacárido de estos anticuerpos fraccionados RP. Entre los residuos de oligosacáridos G0 y G1 anticipados encontrados en todas las muestras, se detectaron varios otros picos en el cromatograma de la Fracción 1 (también son detectables rastros de esos picos en los
10 cromatogramas de Fracción 2 y el grupo de proteínas).

Los resultados tomados juntos sugieren que una especie de anticuerpo más grande contiene glicosilación adicional, no típicamente encontrada en anticuerpos monoclonales expresados SP2/0, contando para la diferencia de masa. Ya que la glicosilación
15 compleja grande encontrada a través del análisis del carbohidrato y espectrometría de masa sería muy poco probable para el sitio conservado de glicosilación en la región constante del anticuerpo, se hace una búsqueda de otros sitios posibles en la secuencia de aminoácido de los anticuerpos humanizados. Se identificó un sitio
20 potencial (N73) para la N-glicosilación (N-X-S) en el dominio variable de las dos variantes de cadena pesada.

Fraccionamiento preparativo a través de CEX

Se llevaron a cabo análisis adicionales utilizando material
25 purificado del grupo VHE/humV1. Para reducir la heterogenicidad del

85
94

material, el anticuerpo N-terminal se fraccionó a través de cromatografía de intercambio de catión preparativa utilizando SP Sepharose (Pharmacia). La columna se equilibró con 25 mM de regulador de pH de fosfato de sodio, pH 6.0 (= regulador de pH A) y
5 el enlace de la proteína se eluyó con 250 mM de NaCl en regulador de pH A (= regulador de pH B; gradiente de 0-65% B). La pureza de las fracciones se analizó utilizando CEX. Las fracciones recolectadas se volvieron a inyectar en la columna SEC para buscar una correlación entre los resultados obtenidos con las dos técnicas. El
10 cromatograma indica que el primer grupo de picos en CEX se correlaciona con el pre-pico en el análisis SEC del anticuerpo, ese segundo grupo de picos en CEX conduce junto con el primer pico en el análisis SEC del grupo de proteínas (o Fracción 1), y ese último pico en CEX se eluye como el último pico en SEC (Fracción 2).

15 En conclusión, los resultados descritos anteriormente (perfil de oligosacárido para las Fracciones 1 y 2 SEC, el patrón CEX obtenido después de la descarboxilación, el patrón SEC obtenido para las fracciones recolectadas en CEX, la espectrometría de masa fuertemente sugiere la presencia una especie de anticuerpo con
20 oligosacáridos complejos causando a) heterogenicidad de masa, conduciendo a un doble pico en SEC y b) la banda doble de cadena pesada con heterogenicidad de carga SDS-PAGE reducida, conduciendo al patrón CEX.

86
85

Caracterización analítica de fracciones CEX

Ya que las especies de anticuerpo grandes se eluyen primero en CEX, mostrando que están menos positivamente cargadas, la presencia de ácido siálico (un componente de la glicosilación compleja y negativamente cargadas) se mide en las diferentes fracciones obtenidas a través de CEX de preparación. Se encontró que el ácido siálico está presente en las cuatro muestras para variar los grados. Se encontró que el ácido siálico es más probablemente la forma ácido N-glicolil-neuraminíco (basado en el tiempo de retención más corto según comparado con el ácido N-acetil-neuraminíco estándar). La presencia muy baja de ácido siálico en una fracción CEX en contraste con su muy alta abundancia en otra fracción CEX fuertemente sugiere que el componente de azúcar negativamente cargado contribuye a la heterogenicidad de masa/carga. Las fracciones CEX se analizaron a través de espectrometría de masa ESI-Q-TOF.

SDS-PAGE

Las mismas fracciones también se analizaron a través de SDS-PAGE bajo condiciones de reducción. Se puede concluir que la banda de cadena pesada superior corresponde a la porción de un anticuerpo con un perfil de oligosacárido complejo conteniendo ácido siálico. La banda de cadena pesada inferior corresponde al anticuerpo esperado que despliega un perfil de oligosacárido convencional.

Separación en una columna Mono-S de fracciones CEX digeridas en papaina

Con el fin de confirmar el uso del sitio potencial de glicosilación en el dominio variable de la cadena pesada, se trató
5 alrededor de 1 mg de cada fracción CEX con papaina para separar la parte Fab y la Fc del anticuerpo. Se llevó a cabo cromatografía preparativa en una columna Mono-S. Cada una de las sub-fracciones recolectadas se volvió a inyectar en la columna RP para identificar su contenido en términos de dominios Fab y/o Fc. Cada una de las
10 sub-fracciones recolectadas después se analizó con espectrometría de masa ESI-Q-TOF. Los resultados obtenidos muestran que a) el sitio conservado de glicosilación en la parte Fc de la cadena pesada está ocupado por la formas del oligosacárido bi-antena sin ninguna (GO), una (G1) o dos(G2) unidades de galactosa terminales; b) que
15 en contraste, el sitio irregular de glicosilación (N73) lleva oligosacáridos complejos conteniendo ácido N-glicolil neuramínico.

En conclusión, el residuo de asparagina N73 en el dominio variable de la cadena pesada se encontró que está parcialmente N-glicosilado. Estas especies de azúcar causan la heterogenicidad de
20 masa así como heterogenicidad de carga que se detecta a través de SDS-PAGE, cromatografía de exclusión de tamaño y cromatografía de intercambio de catión.

Caracterización de VHE-N73D/humV1

25 Con el fin de eliminar la heterogenicidad de los anticuerpos

88
OX

VHE/humV1, VHE/humV2, VHQ/humV1 y VHQ/humV2 humanizados, el residuo de asparagina en la posición N73 en el dominio variable de cadena pesada se substituye por un residuo de ácido aspártico (ver ejemplo 4). El VHE-N73D/humV1 después se analizó adicionalmente:

5

Análisis de Cromatografía de Exclusión de Tamaño (SEC)

SEC se llevó a cabo como se describió anteriormente. Se observó una clara distancia entre VHE/humV1 y VHE- N73D/humV1 en SEC. En contraste con el pico doble obtenido para VHE/humV1, solo se obtuvo un pico para VHE-N73D/humV1 (Figura 12). Aproximadamente 0.2% de agregados se cuantificaron a través de SEC.

SDS-PAGE bajo condiciones de reducción

Se analizaron adicionalmente VHE/humV2 y VHE-N73D/humV1 a través de SDS-PAGE bajo condiciones de reducción como se describió anteriormente. Solamente es visible una banda para VHE-N73D/humV1 en la posición de cadena pesada esperada (HC) (alrededor de 50 kDa). La banda HC observada para VHE-N73D/humV1 corresponde a la banda inferior del doblete observado para VHE/humV2. La posición de la banda de cadena ligera es la misma para las proteínas analizadas.

Cromatografía de Intercambio de Catión (CEX)

Se llevó a cabo la cromatografía (CEX) como se describió

25

anteriormente. Los resultados obtenidos para el análisis CEX muestran que la heterogenicidad de carga de VHE-N73D/humV1 está reducida en comparación con la heterogenicidad de carga alta de VHE/humV2 (>10; Figura 13)

5

Análisis MALDI TOF (espectrometría de masa)

La masa detectada para la cadena pesada y la cadena ligera obtenidas a través de un análisis MALDI TOF (espectrometría de masa) van de acuerdo con la masa esperada, deducida de la
10 secuencia de aminoácido de 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 analizaron a través
15 de cromatografía de Fase Inversa (RP). Debido a la glicosilación parcial sobre asparagina N73, se observaron dos "cadenas pesadas" para VHE/humV2 (pico doble a alrededor de 18.5 minutos) entre el pico correspondiente a la cadena ligera (alrededor de 17.3 minutos). Para VHE-N73D/humV1, solamente se observó un pico para la
20 cadena pesada (Figura 14).

EJEMPLO 6

Análisis de competencia FACS (afinidad de enlace)

25 La línea de células T PEER se eligió como la célula objetivo

para el análisis FACS porque expresa el antígeno CD45 en su superficie de célula. Para analizar la afinidad de enlace de los sobrenadantes de un anticuerpo humanizado, los experimentos de competencia utilizando el anticuerpo quimérico marcado como FITC
5 como una referencia se llevaron a cabo y se compararon con la inhibición del anticuerpo de ratón purificado y del anticuerpo quimérico. Los cultivos de célula PEER se centrifugaron durante 10 segundos a 3000 rpm y el medio se removió. Las células se volvieron a suspender en regulador de pH FACS buffer (PBS conteniendo 1%
10 de FBS y 0.1% de azida de sodio) y se sembraron en una placa de microtitulación de fondo redondo de 96 cavidades a una densidad de célula de 1×10^5 por cavidad. La placa se centrifugó y el sobrenadante se descartó. Para los estudios de bloque, primero se agregaron 25 μ l de medio no transfectado concentrado o anticuerpo
15 de control comparado con el isótopo (controles negativos), anticuerpo de ratón no marcado o anticuerpo quimérico (controles positivos), así como el sobrenadante concentrado conteniendo las varias combinaciones de un anticuerpo humanizado (muestras) en cada cavidad a las concentraciones indicadas en el texto. Después
20 de 1 hora de incubación a 4°C, las células PEER se lavaron con 200 μ l de regulador de pH FACS a través de centrifugación. Las células subsiguientemente se incubaron durante 1 hora a 4°C con el anticuerpo quimérico conjugado con FITC en 25 μ l de regulador de pH FACS a la concentración final de 20 μ g/ml. Las células se lavaron
25 y se volvieron a suspender en 300 μ l de regulador de pH FACS

conteniendo 2 $\mu\text{g/ml}$ de yoduro de propidio, lo cual permitió activar las células viables. Las preparaciones de célula se analizaron en un citómetro de flujo (FACSCalibur, Becton Dickinson).

Los análisis FACS indican un bloqueo dependiente de dosis del anticuerpo quimérico marcado con fluorocromo a través de sobrenadantes de cultivo del anticuerpo humanizado concentrado. No se vió ningún bloqueo dependiente de la dosis del enlace del anticuerpo quimérico con el anticuerpo de control comparado con el isótopo, lo que indica que el efecto de bloque a través de las combinaciones de anticuerpo humanizado diferentes son específicas de epítipo y la especificidad del epítipo parece que es retenida después del proceso de humanización.

El sobrenadante no diluido de los transfectantes SP2/0 isótopo anteriormente mencionados o anticuerpo quimérico (controles negativos) o anticuerpo de control comparado con el a 2 $\mu\text{g/ml}$ en medio de cultivo se incubaron con 1.5×10^5 células PEER en 100 μl durante 30 minutos a 4°C. Después, se agregaron 100 μl de PBS conteniendo el anticuerpo quimérico marcado como FITC a cada muestra y la incubación a 4°C continuó durante otros 30 minutos. Después del lavado, las células se volvieron a suspender en FACS-PBS conteniendo 1 $\mu\text{g/ml}$ de 7-Amino-Actinomicina D y se analizaron a través de citometría de flujo utilizando un instrumento FACSCalibur de Becton Dickinson y el Software CellQuest Pro. La activación fue sobre las células vivas, es decir eventos negativos de 7-Amino-Actinomicina D

Los análisis FACS muestran que las moléculas de enlace CD45RB/RO humanizadas no marcadas, por ejemplo VHE/humV1 y VHQ/humV1 pero no el anticuerpo de control comparado con isótopo compiten con el anticuerpo quimérico marcado FITC para en enlace
5 con la línea de células T PEER CD45-positivas.

Especificidad de VHE-N73D/humV9

Para evaluar si la modificación de la molécula de enlace VHE/humV1 CD45R0/RB humanizada, es decir el intercambio de la
10 asparagina por aspartato en la posición de aminoácido 73 de la cadena pesada de la molécula de enlace CD45R0/RB, modificó la reactividad con el epítopo cognado, la reactividad de VHE-N73D/humV1 con la línea de célula T humana PEER que expresa CR45 se analizó en un experimento de enlace de competencia.

15 Las células PEER se incubaron con VHE-N73D/humV1, con sus predecesores quiméricos o con un anticuerpo IgG1 de control de isótopo no de enlace. El anticuerpo no enlazado se lavó y las células se sometieron a una incubación con un anticuerpo de control IgG1 de isótopo marcado con FITC o mAB anti-CD45R0/RB quimérico
20 marcado con isotiocianato de fluoresceína de fluorocromo (FITC). Después del lavado, las células se sometieron a análisis de citometría de flujo para cuantificar la cantidad de anticuerpo marcado FITC se enlazó a la célula PEER pre-incubada: los cultivos de células PEER se centrifugaron durante 10 minutos a 400 veces la
25 fuerza de gravedad estándar (g), y el medio se removió. Las células

93
92

se volvieron a suspender en regulador de pH FACS (PBS conteniendo 1% v/v de FBS, 0.1 p/v de EDTA y 0.1% p/v de azida de sodio) y se sembraron en placas de microtitulación de fondo en V de 96 cavidades a una densidad de célula de 1×10^6 células por cavidad.

5 La placa se centrifugó y el sobrenadante se descartó. Cada muestra de células se incubó durante 30 minutos a 4°C en 50 µl de regulador de pH FACS conteniendo 20 µg/ml de ya sea mAb anti-CD45RO/RB quimérico, VHE-N73D/humV1 o Ab de control IgG1. Enseguida las células PEER se lavaron dos veces con 150 µl de regulador de pH

10 FACS a través de centrifugación. Las células subsecuentemente se incubaron durante 30 minutos a 4°C en 50 µl de regulador de pH FACS conteniendo 20 µg/ml de ya sea mAB quimérico conjugado con FITC o Ab de control 3G5 conjugado con FITC. Finalmente, las células se lavaron y se volvieron a suspender en 200 µl de regulador

15 de pH FACS conteniendo 7-amino actinomicina D (7-AAD) a 1 µg/ml, lo cual permitió la identificación de células viables durante el análisis. Las preparaciones de célula se analizaron en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson).

Se observó que el VHE-N73D/humV1 no marcado y el mAB

20 anti- CD45RO/RB quimérico no marcado pero no el anticuerpo IgG1 previenen que el mAb anti- CD45RO/RB quimérico marcado FITC se enlace a células PEER que expresan CD45 según determinado por una disminución en la señal fluorescente. En conclusión, se encuentra que la modificación del anticuerpo VHE/humV1 a VHE-

25 N73D/humV1 no cambia la especificidad del epítipo de la molécula

94
a3

de enlace anti-CD45R0/RB humanizada.

Afinidad de VHE-N73D/humV1 para CD45 cynomolgus o humano

Para determinar la afinidad del anticuerpo VHE-N73D/humV1
5 para su epítipo, la reactividad de VHE-N73D/humV1 con una línea de
células T PEER que expresan CD45 humano o la línea de células T
HSC-F que expresan CD45 de mono cynomolgus se puede cuantificar
en un experimento de enlace de competencia, similar al
procedimiento descrito en Daley y otros., 1995; J. Mol. Biol. 253:
10 243.

Brevemente, la intensidad de la tinción de las células PEER o
HSC-F con el anticuerpo marcado FITC en presencia de varias
concentraciones del anticuerpo competidor no marcado se utilizó
para calcular las afinidades de los anticuerpos no marcados. Más
15 precisamente, en un primer paso, se midió la concentración y la
estoiquiometría de marcación de fluorocromo de la molécula de
enlace CD45RB/RO A6 (mA6) anti-humana derivada de ratón marcada
con FITC. Enseguida, la concentración de la molécula objetivo,
CD45, en la superficie de la línea de células PEER o HSC-F se
20 determina con la ayuda del anticuerpo mA6 yes conjugado con FITC
(anti-huCDer derivada de ratón) y utilizando perlas fluorescentes con
un grado de marcación molecular conocido. Con la concentración de
los receptores CD45 celulares y sus ligandos conjugados FITC
conocidos, la afinidad de mA6 conjugado con FITC para receptores
25 CD45 celulares se determina a través del procedimiento de titulación

95
94

de equilibrio basado en FACS. Finalmente, la afinidad del anticuerpo no marcado VHE-N73D/humV1 se determina a partir de las reacciones de tinción de competencia con mA6 conjugado con FITC o células PEER o HSC-F midiendo el incremento en la fluorescencia FITC como una función de la concentración total de VHE-N73D/humV1. Si la ecuación cúbica que representa la descripción algebraicamente explícita del equilibrio del enlace en una mezcla de dos ligados en competencia que se enlazan a un receptor, se implementa en el programa Origin 7.5, el programa de software se utilizó para calcular el valor de la constante de disociación (K_d) para VHE-N73D/humV1 sobre los análisis de ajuste de la curva repetitiva.

En un experimento la constante de disociación de VHE-N73D/humV1 para el objetivo celular PEER se calculó como 2.44 ± 0.07 nM, para el objetivo de la célula HSC-F cynomolgus se calculó como 1.67 ± 0.00 nM, asumiendo el enlace del anticuerpo divalente a las moléculas objetivo CD45RO/RB.

EJEMPLO 7

Actividades Biológicas de las moléculas de enlace CD45EB/RO

20

En este estudio, se condujeron si el anticuerpo quimérico CD45RB/RO, cuando está presente en los cultivos de células T humanas primarias policlonalmente activadas (i) soportan la diferenciación de células T con un fenotipo T_{H0} característico, (ii) previene o mejora la apoptosis después de la activación de la célula

25

T, y (iii) afecta la expresión de los antígeno y receptores específicos del subgrupo después de la re-estimulación.

**El anticuerpo de enlace CD45RB/RO mejora la muerte de la
5 célula en células T Primarias de células T pollicionalmente
activadas**

Se sometieron células T primarias (mezcla de subgrupos T de CD4⁺ y CD8⁺) a activación a través de mAb anti-CD3 más anti-CD28 (200 µg/ml cada uno) en presencia o ausencia (=control) del
10 anticuerpo quimérico de enlace CD45RB/RO. Los anticuerpos en exceso se removieron a través de lavado en el día 2. Se utilizó 7-amino-actinomicina D (7-AAD) como un colorante de tinción de ADN absorbido por las células apoptóticas y necróticas para medir la muerte de la célula después de la activación. Los resultados
15 muestran que la activación de las células T en la presencia del anticuerpo quimérico de enlace CD45RB/RO incrementó la fracción de las células positivas 7-AAD al doble en el día 2 después de la activación. En el día 7, la porción de las células positivas 7-AAD otra vez fue similar en los cultivos de control y tratados con el anticuerpo
20 quimérico de enlace CD45RB/RO

**El anticuerpo quimérico de enlace CD45RB/RO pero no las
células T tratadas con mAb de control despliegan un fenotipo de
célula reguladora T (Treg)**

25 **La expresión aumentada de CD25 y la proteína reguladora**

97
db

negativa CTLA-4 (CD152) es un marcador de células Treg. La supresión funcional de células T primarias y secundarias a través del anticuerpo quimérico de enlace CD45RB/RO puede deberse a la inducción de las células Treg. Para conducir este aspecto, la células
5 T cuando se activan a través de mAbs anti-CD3⁺ CD28 en presencia del anticuerpo quimérico de enlace CD45RB/RO o mAb de control anti-LPS. El curso del tiempo de la expresión de CTLA-4 y CD25 revela diferencias marcadas entre los controles y las células T tratadas con el anticuerpo quimérico de enlace CD45RB/RO en los
10 días 1 y 3 después de la estimulación secundaria, indicando un fenotipo Treg.

La expresión CTLA-4 intracelular se sustenta en la presencia del anticuerpo quimérico de enlace CD45RB/RO

15 Se ha reportado que las cantidades substanciales de CTLA-4 también pueden encontrarse intracelularmente. Por consiguiente, en paralelo a la tinción CTLA-4 de superficie, se analizó la expresión CTLA-4 extracelular. Se vieron diferencias moderadas entre los cultivos de células T en el día 4 después de la estimulación.
20 Después de un cultivo prolongado, sin embargo, se sustentaron altos niveles de CTLA-4 intracelular solamente en células T tratadas con el anticuerpo quimérico de enlace CD45RB/RO pero no el células T de control.

25 Las Células T tratadas con el anticuerpo quimérico de

28
97

enlace CD45RB/RO se convierten en positivas dobles para CD4 Y CD8

Después de la estimulación, las células T inducen y regulan hacia arriba la expresión de varios receptores de superficie, tales como CD25, CD152 (CTLA-4), CD154 (Ligando CD40) y otros. En 5 contraste, el nivel de expresión de CD4 o CD8 se cree que permanece relativamente constante. Se observo de forma reproducible un fuerte aumento de ambos antígenos CD4 y CD8 en células T tratadas con el anticuerpo quimérico de enlace CD45RB/RO 10 pero no en células T tratadas con Ab después de la activación. La emergencia de una población de células T positivas dobles CD4/CD8 parece que es debido a la regulación hacia arriba del subgrupo CD4 en el subgrupo CD8+ y al contrario en CD8 en el subgrupo CD4+. Esto contrasta con un porcentaje moderadamente bajo de células t 15 positivas dobles en cultivos de control.

Expresión alta de la cadena alfa del receptor IL-2, pero expresión muy baja de la cadena beta a través de células T tratadas con el anticuerpo quimérico de enlace CD45RB/RO

20 Se sabe que las células Treg son constitutivamente positivas para CD25, la cadena alfa del receptor IL-2. La regulación de otros subgrupos del receptor IL-2 trimérico en células Treg no es conocida. Recientemente se comparó la expresión de la cadena beta del receptor IL-2, por ejemplo CD122, en células T activadas y propagas 25 en presencia o ausencia del anticuerpo quimérico de enlace

99
98

CD45RB/RO. Los resultados muestran que las células T tratadas con el anticuerpo quimérico de enlace CD45RB/RO tienen cerca de 10 veces una expresión más baja de CD122 comparado con las células T en los cultivos de control. Esta diferencia puede indicar que las células Treg requieren de factores diferentes de IL-2 para proliferarse.

EJEMPLO 8

Secuencias de la invención (las secuencias CDR de la invención están subrayadas)

SEC ID NO:1

Parte de la secuencia de aminoácido de cadena ligera quimérica
DILLTQSPAILSVSPGERVSFSCRASQNI~~GT~~SIQWYQ~~QRT~~NGSP~~RL~~LIR~~SSSESISGIP~~SRFSG
SGSGTDFTLSINSVESEDIADYYC~~QQSNTWP~~FTFGSGTKLEIK

SEC ID NO:2

Parte de la secuencia de aminoácido de cadena pesada quimérica
EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFT~~NYIIH~~HWKQEPGQGLEWIGYFNPYNH~~GTKY~~
~~NEKFKG~~RATLTADKSSNTAYMDLSSLTSEDSAIYYCAR~~SGPYAWF~~DTWGQGTTVTVSS

SEC ID NO:3

Secuencia de aminoácido de cadena ligera quimérica
DILLTQSPAILSVSPGERVSFSC~~RASQNI~~GT~~SI~~QWYQ~~QRT~~NGSP~~RL~~LIR~~SSSESISGIP~~SRFSG
SGSGTDFTLSINSVESEDIADYYC~~QQSNTWP~~FTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
GTASVVCLLN~~NFY~~P~~RE~~AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH
KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

200
99

SEC ID NO:4

Secuencia de aminoácido de cadena pesada quimérica

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYFTFTNYIIHWVKQEPGQGLEWIGYFNPYNHGTKY
NEKFKGRATLTADKSSNTAYMDLSSLTSEDSAIYYCARSGPYAWFDTWGQGTTTVTVSSAS
5 TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
10 CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEC ID NO:5

Secuencia de nucleótido que codifica un polipéptido de SEC ID NO:1

15 GACATTCTGCTGACCCAGTCTCCAGCCATCCTGTCTGTGAGTCCAGGAGAAAGAGTCA
GTTTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAACATTGGCACAAGCATACAGTGGTATCAACAAAGA
ACAAATGGTTCTCCAAGGCTTCTCATAAGGTCTTCTTCTGAGTCTATCTCTGGGATCCCT
TCCAGGTTTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACTCTTAGCATCAACAGTGTGGA
GTCTGAAGATATTGCAGATTATTACTGTCAACAAAGTAATACCTGGCCATTACGTTTCGG
20 CTCGGGGACCAAGCTTGAAATCAAA

SEC ID NO:6

Secuencia de nucleótido que codifica un polipéptido de SEC ID NO:2

25 GAGGTGCAGCTGCAGCAGTCAGGACCTGAACTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAG
ATGTCCTGCAAGGCCTCTGGATACACATTCACTAATTATATTATCCACTGGGTGAAGCA

101
100

GGAGCCTGGTCAGGGCCTTGAATGGATTGGATATTTTAATCCTTACAATCATGGTACTA
AGTACAATGAGAAGTTCAAAGGCAGGGCCACACTAACTGCAGACAAATCCTCCAACACA
GCCTACATGGACCTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGATCTACTACTGTGCAA
GATCAGGACCCTATGCCTGGTTTGACACCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTC

5 CTCA

SEC ID NO:7

**Parte de secuencia de aminoácido de cadena ligera humanizada
designada humV2 (humV2 = VLm)**

10 DILLTQSPAT LSLSPGERAT FSCRASQNIG TSIQWYQQKT NGAPRLLIRS SSESISGIPS
RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SNTWPFTFGQ GTKLEIK

SEC ID NO:8

**Parte de secuencia de aminoácido de cadena ligera humanizada
designada humV1 (humV1 = VLh)**

15 DILLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQNIG TSIQWYQQKP GQAPRLLIRS SSESISGIPS
RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SNTWPFTFGQ GTKLEIK

SEC ID NO:9

20 **Parte de secuencia de aminoácido de cadena pesada humanizada
designada VHE**

EVQLVESGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYIIHWVKQE PGQGLEWIGY
FNPNHGTKY NEKFKGRATL TANKSISTAY MELSSLRSED TAVYYCARSG
PYAWFDTWGQ GTTVTVSS

25

SEC ID NO:10

Parte de secuencia de aminoácido de cadena pesada humanizada designada VHQ

QVQLVESGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYIIHWVKQE PGQGLEWIGY

5 FNPYNHGTKY NEKFKGRATL TANKSISTAY MELSSLRSED TAVYYCARSG
PYAWFDTWGQ GTTVTVSS

SEC ID NO:11

Secuencia de nucleótido que codifica la secuencia de aminoácido

10 **SEC ID NO:9**

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCAGGAGCCGAAGTGAAAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAG
GTGTCCTGCAAGGCCTCTGGATACACATTCATAATTATATTATCCACTGGGTGAAGCA
GGAGCCTGGTCAGGGCCTTGAATGGATTGGATATTTTAATCCTTACAATCATGGTACTA
AGTACAATGAGAAGTTCAAAGGCAGGGCCACACTAACTGCAAACAAATCCATCAGCACA
15 GCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGCGCTCTGAGGACACTGCGGTCTACTACTGTGCAA
GATCAGGACCCTATGCCTGGTTTGACACCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTC
CTCA

SEC ID NO:12

20 **Secuencia de nucleótido que codifica la secuencia de aminoácido**

SEC ID NO: 10

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCAGGAGCCGAAGTGAAAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAG
GTGTCCTGCAAGGCCTCTGGATACACATTCATAATTATATTATCCACTGGGTGAAGCA
GGAGCCTGGTCAGGGCCTTGAATGGATTGGATATTTTAATCCTTACAATCATGGTACTA
25 AGTACAATGAGAAGTTCAAAGGCAGGGCCACACTAACTGCAAACAAATCCATCAGCACA
GCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGCGCTCTGAGGACACTGCGGTCTACTACTGTGCAA

103
192

GATCAGGACCCTATGCCTGGTTTGACACCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTC
CTCA

SEC ID NO:13

5 Secuencia de nucleótido que codifica la secuencia de aminoácido

SEC ID NO: 7

GACATTCTGCTGACCCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTCTGAGTCCAGGAGAAAGAGCCA
CTTTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAACATTGGCACAAGCATACAGTGGTATCAACAAAA
ACAAATGGTGCTCCAAGGCTTCTCATAAGGTCTTCTTCTGAGTCTATCTCTGGGATCCC
10 TTCCAGGTTTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACTCTTACCATCAGCAGTCTGG
AGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAACAAAGTAATACCTGGCCATTACAGTTC
GGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA

SEC ID NO:14

15 Secuencia de nucleótido que codifica la secuencia de aminoácido

SEC ID NO: 8

GACATTCTGCTGACCCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTCTGAGTCCAGGAGAAAGAGCCA
CTCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAACATTGGCACAAGCATACAGTGGTATCAACAAAA
CCAGGTCAGGCTCCAAGGCTTCTCATAAGGTCTTCTTCTGAGTCTATCTCTGGGATCCC
20 TTCCAGGTTTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACTCTTACCATCAGCAGTCTGG
AGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAACAAAGTAATACCTGGCCATTACAGTTC
GGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA

SEC ID NO:15

**25 Secuencia de nucleótido del vector de expresión HCMV-G1 HuA6-
VHQ**

104
193

**(Secuencia de ADN Completa de un vector de expresión de
cadena pesada que comprende SEC ID NO: 12 (VHQ) de 3921-
4274)**

5 1 AGCTTTTTGC AAAAGCCTAG GCCTCCAAAA AAGCCTCCTC ACTACTTCTG
51 GAATAGCTCA GAGGCCGAGG CGGCCTCGGC CTCTGCATAA ATAAAAAAAA
101 TTAGTCAGCC ATGGGGCGGA GAATGGGCGG AACTGGGCGG AGTTAGGGGC
151 GGGATGGGCG GAGTTAGGGG CGGGACTATG GTTGCTGACT AATTGAGATG
201 CATGCTTTGC AACTTCTGCT CTGCTGGGGA GCCTGGTTGC TGACTAATTG
10 251 AGATGCATGC TTTGCATACT TCTGCCTGCT GGGGAGCCTG GGGACTTTCC
301 ACACCCTAAC TGACACACAT TCCACAGCTG CCTCGCGCGT TTCGGTGATG
351 ACGGTGAAAA CCTCTGACAC ATGCAGCTCC CGGAGACGGT CACAGCTTGT
401 CTGTAAGCGG ATGCCGGGAG CAGACAAGCC CGTCAGGGCG CGTCAGCGGG
451 TGTTGGCGGG TGTCGGGGCG CAGCCATGAC CCAGTCACGT AGCGATAGCG
15 501 GAGTGTATAC TGGCTTAAct ATGCGGCATC AGAGCAGATT GTACTGAGAG
551 TGCACCATAT GCGGTGTGAA ATACCGCACA GATGCGTAAG GAGAAAATAC
601 CGCATCAGGC GCTCTTCCGC TTCCTCGCTC ACTGACTCGC TCGCTCGGT
651 CGTTCGGCTG CGGCGAGCGG TATCAGCTCA CTCAAAGGCG GTAATACGGT
701 TATCCACAGA ATCAGGGGAT AACGCAGGAA AGAACATGTG AGCAAAAGGC
20 751 CAGCAAAAGG CCAGGAACCG TAAAAAGGCC GCGTTGCTGG CGTTTTTCCA
801 TAGGCTCCGC CCCCTGACG AGCATCACAA AAATCGACGC TCAAGTCAGA
851 GGTGGCGAAA CCCGACAGGA CTATAAGAT ACCAGGCGTT TCCCCCTGGA
901 AGCTCCCTCG TCGCTCTCC TGTTCCGACC CTGCCGCTTA CCGGATACCT
951 GTCCGCCTTT CTCCCTTCGG GAAGCGTGGC GCTTCTCAT AGCTCACGCT

106
194

1001 GTAGGTATCT CAGTTCGGTG TAGGTCGTTT GCTCCAAGCT GGGCTGTGTG
1051 CACGAACCCC CCGTTCAGCC CGACCGCTGC GCCTTATCCG GTAACATATCG
1101 TCTTGAGTCC AACCCGGTAA GACACGACTT ATCGCCACTG GCAGCAGCCA
1151 CTGGTAACAG GATTAGCAGA GCGAGGTATG TAGGCGGTGC TACAGAGTTC
5 1201 TTGAAGTGGT GGCCTAACTA CGGCTACACT AGAAGGACAG TATTTGGTAT
1251 CTGCGCTCTG CTGAAGCCAG TTACCTTCGG AAAAAGAGTT GGTAGCTCTT
1301 GATCCGGCAA ACAAACCACC GCTGGTAGCG GTGGTTTTTT TGTTTGCAAG
1351 CAGCAGATTA CGCGCAGAAA AAAAGGATCT CAAGAAGATC CTTTGATCTT
1401 TTCTACGGGG TCTGACGCTC AGTGGAACGA AAATCAGCT TAAGGGATTT
10 1451 TGGTCATGAG ATTATCAAAA AGGATCTTCA CCTAGATCCT TTAAATTAA
1501 AAATGAAGTT TTAAATCAAT CTAAAGTATA TATGAGTAAA CTTGGTCTGA
1551 CAGTTACCAA TGCTTAATCA GTGAGGCACC TATCTCAGCG ATCTGTCTAT
1601 TTCGTTTCATC CATAGTTGCC TGAATCCCCG TCGTGTAGAT AACTACGATA
1651 CGGGAGGGCT TACCATCTGG CCCAGTGCT GCAATGATAC CGCGAGACCC
15 1701 ACGCTCACCG GCTCCAGATT TATCAGCAAT AAACCAGCCA GCCGGAAGGG
1751 CCGAGCGCAG AAGTGGTCCT GCAACTTTAT CCGCCTCCAT CCAGTCTATT
1801 AATTGTTGCC GGGAAGCTAG AGTAAGTAGT TCGCCAGTTA ATAGTTTGCG
1851 CAACGTTGTT GCCATTGCTG CAGGCATCGT GGTGTCACGC TCGTCGTTTG
1901 GTATGGCTTC ATTCAGCTCC GGTTCCCAAC GATCAAGGCG AGTTACATGA
20 1951 TCCCCCATGT TGTGCAAAAA AGCGGTTAGC TCCTTCGGTC CTCCGATCGT
2001 TGTGAGAAGT AAGTTGGCCG CAGTGTTATC ACTCATGGTT ATGGCAGCAC
2051 TGCATAATTC TCTTACTGTC ATGCCATCCG TAAGATGCTT TTCTGTGACT
2101 GGTGAGTACT CAACCAAGTC ATTCTGAGAA TAGTGTATGC GGCGACCGAG
2151 TTGCTCTTGC CCGGCGTCAA CACGGGATAA TACCGCGCCA CATAGCAGAA

106
195

2201 CTTTAAAAGT GCTCATCATT GGAAAACGTT CTTCGGGGCG AAAACTCTCA
2251 AGGATCTTAC CGCTGTTGAG ATCCAGTTCG ATGTAACCCA CTCGTGCACC
2301 CAACTGATCT TCAGCATCTT TTACTTTCAC CAGCGTTTCT GGGTGAGCAA
2351 AAACAGGAAG GCAAAATGCC GCAAAAAGG GAATAAGGGC GACACGGAAA
5 2401 TGTTGAATAC TCATACTCTT CCTTTTTCAA TATTATTGAA GCATTTATCA
2451 GGGTTATTGT CTCATGAGCG GATACATATT TGAATGTATT TAGAAAAATA
2501 AACAAATAGG GGTTCGCGC ACATTTCCCC GAAAAGTGCC ACCTGACGTC
2551 TAAGAAACCA TTATTATCAT GACATTAACC TATAAAAATA GCGGTATCAC
2601 GAGGCCCTTT CGTCTTCAAG AATTCAGCTT GGCTGCAGTG AATAATAAAA
10 2651 TGTGTGTTTG TCCGAAATAC GCGTTTTGAG ATTTCTGTCTG CCGACTAAAT
2701 TCATGTCGCG CGATAGTGGT GTTTATCGCC GATAGAGATG GCGATATTGG
2751 AAAAATCGAT ATTTGAAAAT ATGGCATATT GAAAATGTCTG CCGATGTGAG
2801 TTTCTGTGTA ACTGATATCG CCATTTTTCC AAAAGTGATT TTTGGGCATA
2851 CGCGATATCT GGCGATAGCG CTTATATCGT TTACGGGGGA TGGCGATAGA
15 2901 CGACTTTGGT GACTTGGGCG ATTCTGTGTG TCGCAAATAT CGCAGTTTCG
2951 ATATAGGTGA CAGACGATAT GAGGCTATAT CGCCGATAGA GGCGACATCA
3001 AGCTGGCACA TGGCCAATGC ATATCGATCT ATACATTGAA TCAATATTGG
3051 CCATTAGCCA TATTATTCAT TGGTTATATA GCATAAATCA ATATTGGCTA
3101 TTGGCCATTG CACACGTTGT ATCCATATCA TAATATGTAC ATTTATATTG
20 3151 GCTCATGTCC AACATTACCG CCATGTTGAC ATTGATTATT GACTAGTTAT
3201 TAATAGTAAT CAATTACGGG GTCATTAGTT CATAGCCCAT ATATGGAGTT
3251 CCGCGTTACA TAACTTACGG TAAATGGCCC GCCTGGCTGA CCGCCAACG
3301 ACCCCCGCCC ATTGACGTCA ATAATGACGT ATGTTCCCAT AGTAACGCCA
3351 ATAGGGACTT TCCATTGACG TCAATGGGTG GAGTATTTAC GGTAAACTGC

3401 CCACTTGGCA GTACATCAAG TGTATCATAT GCCAAGTACG CCCCCTATTG
3451 ACGTCAATGA CGGTAAATGG CCCGCCTGGC ATTATGCCCA GTACATGACC
3501 TTATGGGACT TTCCTACTTG GCAGTACATC TACGTATTAG TCATCGCTAT
3551 TACCATGGTG ATGCGGTTTT GGCAGTACAT CAATGGGCGT GGATAGCGGT
5 3601 TTGACTCACG GGGATTTCCTA AGTCTCCACC CCATTGACGT CAATGGGAGT
3651 TTGTTTTGGC ACCAAAATCA ACGGGACTTT CCAAATGTC GTAACAACCTC
3701 CGCCCCATTG ACGCAAATGG GCGGTAGGCG TGTACGGTGG GAGGTCTATA
3751 TAAGCAGAGC TCGTTTAGTG AACCGTCAGA TCGCCTGGAG ACGCCATCCA
3801 CGCTGTTTTG ACCTCCATAG AAGACACCGG GACCGATCCA GCCTCCGCAA
10 3851 GCTTGCCGCC ACCATGGACT GGACCTGGAG GGTGTTCTGC CTGCTGGCCG
3901 TGGCCCCCGG CGCCCACAGC CAGGTGCAGC TGGTGGAGTC AGGAGCCGAA
3951 GTGAAAAAGC CTGGGGCTTC AGTGAAGGTG TCCTGCAAGG CCTCTGGATA
4001 CACATTCACT AATTATATTA TCCACTGGGT GAAGCAGGAG CCTGGTCAGG
4051 GCCTTGAATG GATTGGATAT TTTAATCCTT ACAATCATGG TACTAAGTAC
15 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 GGCAGGCCAG GCCTGACCTT GGCTTTGGGG CAGGGAGGGG
20 4351 GCTAAGGTGA GGCAGGTGGC GCCAGCCAGG TGCACACCCA ATGCCCATGA
4401 GCCCAGACAC TGGACGCTGA ACCTCGCGGA CAGTTAAGAA CCCAGGGGCC
4451 TCTGCGCCCT GGGCCCAGCT CTGTCCCACA CCGCGGTCAC ATGGCACCAC
4501 CTCTCTTGCA GCCTCCACCA AGGGCCCATC GGTCTTCCCC CTGGCACCCCT
4551 CCTCCAAGAG CACCTCTGGG GGCACAGCGG CCCTGGGCTG CCTGGTCAAG

108
107

4601 GACTACTTCC CCGAACCGGT GACGGTGTCTG TGGAACTCAG GCGCCCTGAC
4651 CAGCGGCGTG CACACCTTCC CGGCTGTCCT ACAGTCCTCA GGACTCTACT
4701 CCCTCAGCAG CGTGGTGACC GTGCCCTCCA GCAGCTTGGG CACCCAGACC
4751 TACATCTGCA ACGTGAATCA CAAGCCCAGC AACACCAAGG TGGACAAGAA
5 4801 AGTTGGTGAG AGGCCAGCAC AGGGAGGGAG GGTGTCTGCT GGAAGCCAGG
4851 CTCAGCGCTC CTGCCTGGAC GCATCCCGGC TATGCAGCCC CAGTCCAGGG
4901 CAGCAAGGCA GGCCCCGTCT GCCTCTTCAC CCGGAGGCCT CTGCCCGCCC
4951 CACTCATGCT CAGGGAGAGG GTCTTCTGGC TTTTCCCCA GGCTCTGGGC
5001 AGGCACAGGC TAGGTGCCCC TAACCCAGGC CCTGCACACA AAGGGGCAGG
10 5051 TGCTGGGCTC AGACCTGCCA AGAGCCATAT CCGGGAGGAC CCTGCCCTG
5101 ACCTAAGCCC ACCCCAAAGG CCAAACCTCTC CACTCCCTCA GCTCGGACAC
5151 CTTCTCTCCT CCCAGATTCC AGTAACTCCC AATCTTCTCT CTGCAGAGCC
5201 CAAATCTTGT GACAAAACCTC ACACATGCCC ACCGTGCCCCA GGTAAGCCAG
5251 CCCAGGCCTC GCCCTCCAGC TCAAGGCGGG ACAGGTGCCC TAGAGTAGCC
15 5301 TGCATCCAGG GACAGGCCCC AGCCGGGTGC TGACACGTCC ACCTCCATCT
5351 CTTCTCTCAGC ACCTGAACTC CTGGGGGGAC CGTCAGTCTT CCTCTTCCCC
5401 CCAAACCCA AGGACACCCT CATGATCTCC CGGACCCCTG AGGTCACATG
5451 CGTGGTGGTG GACGTGAGCC ACGAAGACCC TGAGGTCAAG TTCAACTGGT
5501 ACGTGGACGG CGTGGAGGTG CATAATGCCA AGACAAAGCC GCGGGAGGAG
20 5551 CAGTACAACA GCACGTACCG TGTGGTCAGC GTCCTCACCG TCCTGCACCA
5601 GGACTGGCTG AATGGCAAGG AGTACAAGTG CAAGGTCTCC AACAAAGCCC
5651 TCCCAGCCCC CATCGAGAAA ACCATCTCCA AAGCCAAAGG TGGGACCCGT
5701 GGGGTGCGAG GGCCACATGG ACAGAGGCCG GCTCGGCCCA CCCTCTGCCC
5751 TGAGAGTGAC CGCTGTACCA ACCTCTGTCC CTACAGGGCA GCCCCGAGAA

109
108

5801 CCACAGGTGT ACACCCTGCC CCCATCCCGG GATGAGCTGA CCAAGAACCA
5851 GGTCAAGCTG ACCTGCCTGG TCAAAGGCTT CTATCCCAGC GACATCGCCG
5901 TGGAGTGGGA GAGCAATGGG CAGCCGGAGA ACAACTACAA GACCACGCCT
5951 CCCGTGCTGG ACTCCGACGG CTCCTTCTTC CTCTACAGCA AGCTCACCGT
5 6001 GGACAAGAGC AGGTGGCAGC AGGGGAACGT CTTCTCATGC TCCGTGATGC
6051 ATGAGGCTCT GCACAACCAC TACACGCAGA AGAGCCTCTC CCTGTCTCCG
6101 GGTAAATGAG TGCACGCGCC GGCAAGCCCC CGCTCCCCGG GCTCTCGCGG
6151 TCGCACGAGG ATGCTTGGCA CGTACCCCTT GTACATACTT CCCGGGCGCC
6201 CAGCATGGAA ATAAAGCACC CAGCGCTGCC CTGGGCCCTT GCGAGACTGT
10 6251 GATGGTTCTT TCCACGGGTC AGGCCGAGTC TGAGGCCTGA GTGGCATGAG
6301 ATCTGATATC ATCGATGAAT TCGAGCTCGG TACCCGGGGA TCGATCCAGA
6351 CATGATAAGA TACATTGATG AGTTTGGACA AACCACAACCT AGAATGCAGT
6401 GAAAAAATG CTTTATTTGT GAAATTTGTG ATGCTATTGC TTTATTTGTA
6451 ACCATTATAA GCTGCAATAA ACAAGTTAAC AACAACAATT GCATTCATTT
15 6501 TATGTTTCAG GTTCAGGGGG AGGTGTGGGA GGTTTTTTAA AGCAAGTAAA
6551 ACCTCTACAA ATGTGGTATG GCTGATTATG ATCTCTAGTC AAGGCACTAT
6601 ACATCAAATA TTCCTTATTA ACCCCTTTAC AAATTAAAAA GCTAAAGGTA
6651 CACAATTTTT GAGCATAGTT ATTAATAGCA GACACTCTAT GCCTGTGTGG
6701 AGTAAGAAAA AACAGTATGT TATGATTATA ACTGTTATGC CTACTTATAA
20 6751 AGGTTACAGA ATATTTTTCC ATAATTTTCT TGTATAGCAG TGCAGCTTTT
6801 TCCTTTGTGG TGTAAATAGC AAAGCAAGCA AGAGTTCTAT TACTAAACAC
6851 AGCATGACTC AAAAACTTA GCAATTCTGA AGGAAAGTCC TTGGGGTCTT
6901 CTACCTTTCT CTTCTTTTTT GGAGGAGTAG AATGTTGAGA GTCAGCAGTA
6951 GCCTCATCAT CACTAGATGG CATTTCTTCT GAGCAAAACA GGTTTTCCCTC

40
109

7001 ATTAAAGGCA TTCCACCACT GCTCCCATTC ATCAGTTCCA TAGGTTGGAA
7051 TCTAAAATAC ACAAACAATT AGAATCAGTA GTTTAACACA TTATACACTT
7101 AAAAATTTTA TATTTACCTT AGAGCTTTAA ATCTCTGTAG GTAGTTTGTC
7151 CAATTATGTC ACACCACAGA AGTAAGGTTC CTTACAAAG ATCCGGGACC
5 7201 AAAGCGGCCA TCGTGCCTCC CCACTCCTGC AGTTCGGGGG CATGGATGCG
7251 CGGATAGCCG CTGCTGGTTT CCTGGATGCC GACGGATTG CACTGCCGGT
7301 AGAACTCCGC GAGGTCGTCC AGCCTCAGGC AGCAGCTGAA CCAACTCGCG
7351 AGGGGATCGA GCCCGGGGTG GGCGAAGAAC TCCAGCATGA GATCCCCGCG
7401 CTGGAGGATC ATCCAGCCGG CGTCCCGGAA AACGATTCCG AAGCCCAACC
10 7451 TTTCATAGAA GGCGGCGGTG GAATCGAAAT CTCGTGATGG CAGGTTGGGC
7501 GTCGCTTGGT CGGTCATTTT GAACCCCAAG GTCCCGCTCA GAAGAACTCG
7551 TCAAGAAGGC GATAGAAGGC GATGCGCTGC GAATCGGGAG CGGCGATACC
7601 GTAAAGCACG AGGAAGCGGT CAGCCCATTC GCCGCCAAGC TCTTCAGCAA
7651 TATCACGGGT AGCCAACGCT ATGTCCTGAT AGCGGTCCGC CACACCCAGC
15 7701 CGGCCACAGT CGATGAATCC AGAAAAGCGG CCATTTTCCA CCATGATATT
7751 CGGCAAGCAG GCATCGCCAT GGGTCACGAC GAGATCCTCG CCGTCGGGCA
7801 TGCGCGCCTT GAGCCTGGCG AACAGTTCGG CTGGCGCGAG CCCCTGATGC
7851 TCTTCGTCCA GATCATCCTG ATCGACAAGA CCGGCTTCCA TCCGAGTACG
7901 TGCTCGCTCG ATGCGATGTT TCGCTTGGTG GTCGAATGGG CAGGTAGCCG
20 7951 GATCAAGCGT ATGCAGCCGC CGCATTGCAT CAGCCATGAT GGATACTTTC
8001 TCGGCAGGAG CAAGGTGAGA TGACAGGAGA TCCTGCCCCG GCACTTCGCC
8051 CAATAGCAGC CAGTCCCTTC CCGCTTCAGT GACAACGTCG AGCACAGCTG
8101 CGCAAGGAAC GCCCGTCGTG GCCAGCCACG ATAGCCGCGC TGCCTCGTCC
8151 TGCAGTTCAT TCAGGGCACC GGACAGGTG GTCTTGACAA AAAGAACCGG

471
110

8201 GCGCCCCTGC GCTGACAGCC GGAACACGGC GGCATCAGAG CAGCCGATTG
8251 TCTGTTGTGC CCAGTCATAG CCGAATAGCC TCTCCACCCA AGCGGCCGGA
8301 GAACCTGCGT GCAATCCATC TTGTTCAATC ATGCGAAACG ATCCTCATCC
8351 TGTCTCTTGA TCAGATCTTG ATCCCCTGCG CCATCAGATC CTTGGCGGCA
5 8401 AGAAAGCCAT CCAGTTTACT TTGCAGGGCT TCCCAACCTT ACCAGAGGGC
8451 GCCCCAGCTG GCAATTCCGG TTCGCTTGCT GTCCATAAAA CCGCCCAGTC
8501 TAGCTATCGC CATGTAAGCC CACTGCAAGC TACCTGCTTT CTCTTTGCGC
8551 TTGCGTTTTTC CCTTGTCAG ATAGCCCAGT AGCTGACATT CATCCGGGGT
8601 CAGCACCGTT TCTGCGGACT GGCTTTCTAC GTGTTCCGCT TCCTTTAGCA
10 8651 GCCCTTGCGC CCTGAGTGCT TCGGCAGCG TGAAGCT

SEC ID NO:16

Secuencia de nucleótido del vector de expresión HCMV-G1 HuA6-VHE

15 (Secuencia de ADN completa de un vector de expresión de cadena pesada humanizado que comprende SEC ID NO: 11 (VHE) de 3921-4274)

1 AGCTTTTTTG AAAAGCCTAG GCCTCCAAAA AAGCCTCCTC ACTACTTCTG
20 51 GAATAGCTCA GAGGCCGAGG CGGCCTCGGC CTCTGCATAA ATAAAAAAAA
101 TTAGTCAGCC ATGGGGCGGA GAATGGGCGG AACTGGGCGG AGTTAGGGGC
151 GGGATGGGCG GAGTTAGGGG CGGGACTATG GTTGCTGACT AATTGAGATG
201 CATGCTTTGC ATACTTCTGC CTGCTGGGGA GCCTGGTTGC TGACTAATTG
251 AGATGCATGC TTTGCATACT TCTGCCTGCT GGGGAGCCTG GGGACTTTCC

42
111

301 ACACCCTAAC TGACACACAT TCCACAGCTG CCTCGCGCGT TTCGGTGATG
351 ACGGTGAAAA CCTCTGACAC ATGCAGCTCC CGGAGACGGT CACAGCTTGT
401 CTGTAAGCGG ATGCCGGGAG CAGACAAGCC CGTCAGGGCG CGTCAGCGGG
451 TGTTCGGCGG TGTCCGGGCG CAGCCATGAC CCAGTCACGT AGCGATAGCG
5 501 GAGTGTATAC TGGCTTAACT ATGCGGCATC AGAGCAGATT GTACTGAGAG
551 TGCACCATAT GCGGTGTGAA ATACCGCACA GATGCGTAAG GAGAAAATAC
601 CGCATCAGGC GCTCTTCCGC TTCCTCGCTC ACTGACTCGC TCGCTCGGT
651 CGTTCGGCTG CGGCGAGCGG TATCAGCTCA CTCAAAGGCG GTAATACGGT
701 TATCCACAGA ATCAGGGGAT AACGCAGGAA AGAACATGTG AGCAAAAGGC
10 751 CAGCAAAAGG CCAGGAACCG TAAAAGGCC GCGTTGCTGG CGTTTTTCCA
801 TAGGCTCCGC CCCCTGACG AGCATCACAA AAATCGACGC TCAAGTCAGA
851 GGTGGCGAAA CCCGACAGGA CTATAAAGAT ACCAGGCGTT TCCCCTGGA
901 AGCTCCCTCG TCGCTCTCC TGTTCGACC CTGCCGCTTA CCGGATACCT
951 GTCCGCCTTT CTCCCTTCGG GAAGCGTGGC GCTTTCTCAT AGCTCACGCT
15 1001 GTAGGTATCT CAGTTCGGTG TAGGTCGTTT GCTCCAAGCT GGGCTGTGTG
1051 CACGAACCCC CCGTTCAGCC CGACCGCTGC GCCTTATCCG GTAACATATCG
1101 TCTTGAGTCC AACCCGGTAA GACACGACTT ATCGCCACTG GCAGCAGCCA
1151 CTGGTAACAG GATTAGCAGA GCGAGGTATG TAGGCGGTGC TACAGAGTTC
1201 TTGAAGTGGT GGCCTAACTA CGGCTACACT AGAAGGACAG TATTTGGTAT
20 1251 CTGCGCTCTG CTGAAGCCAG TTACCTTCGG AAAAAGAGTT GGTAGCTCTT
1301 GATCCGGCAA ACAAAACCACC GCTGGTAGCG GTGGTTTTTT TGTTCGAAG
1351 CAGCAGATTA CGCGCAGAAA AAAAGGATCT CAAGAAGATC CTTTGATCTT
1401 TTCTACGGGG TCTGACGCTC AGTGGAACGA AAATCACGT TAAGGGATTT
1451 TGGTCATGAG ATTATCAAAA AGGATCTTCA CCTAGATCCT TTAAATTAA

1/3
1/2

1501 AAATGAAGTT TTAAATCAAT CTAAAGTATA TATGAGTAAA CTTGGTCTGA
1551 CAGTTACCAA TGCTTAATCA GTGAGGCACC TATCTCAGCG ATCTGTCTAT
1601 TTCGTTCATC CATAGTTGCC TGACTCCCCG TCGTGTAGAT AACTACGATA
1651 CGGGAGGGCT TACCATCTGG CCCAGTGCT GCAATGATAC CGCGAGACCC
5 1701 ACGCTCACCG GCTCCAGATT TATCAGCAAT AAACCAGCCA GCCGGAAGGG
1751 CCGAGCGCAG AAGTGGTCCT GCAACTTTAT CCGCCTCCAT CCAGTCTATT
1801 AATTGTTGCC GGGAAGCTAG AGTÁAGTAGT TCGCCAGTTA ATAGTTTGCG
1851 CAACGTTGTT GCCATTGCTG CAGGCATCGT GGTGTCACGC TCGTCGTTTG
1901 GTATGGCTTC ATTCAGCTCC GGTTCCTAAC GATCAAGGCG AGTTACATGA
10 1951 TCCCCCATGT TGTGCAAAAA AGCGGTTAGC TCCTTCGGTC CTCCGATCGT
2001 TGTGAGAAGT AAGTTGGCCG CAGTGTTATC ACTCATGGTT ATGGCAGCAC
2051 TGCATAATTC TCTTACTGTC ATGCCATCCG TAAGATGCTT TTCTGTGACT
2101 GGTGAGTACT CAACCAAGTC ATTCTGAGAA TAGTGTATGC GGCGACCGAG
2151 TTGCTCTTGC CCGGCGTCAA CACGGGATAA TACCGCGCCA CATAGCAGAA
15 2201 CTTTAAAAGT GCTCATCATT GGAAAACGTT CTTGCGGGCG AAAACTCTCA
2251 AGGATCTTAC CGCTGTTGAG ATCCAGTTCG ATGTAACCCA CTCGTGCACC
2301 CAACTGATCT TCAGCATCTT TACTTTTAC CAGCGTTTCT GGGTGAGCAA
2351 AAACAGGAAG GCAAAATGCC GCAAAAAGG GAATAAGGGC GACACGGAAA
2401 TGTTGAATAC TCATACTCTT CCTTTTCAA TATTATTGAA GCATTTATCA
20 2451 GGGTTATTGT CTCATGAGCG GATACATATT TGAATGTATT TAGAAAAATA
2501 AACAAATAGG GGTTCCGCGC ACATTTCCCC GAAAAGTGCC ACCTGACGTC
2551 TAAGAAACCA TTATTATCAT GACATTAACC TATAAAAATA GCGGTATCAC
2601 GAGGCCCTTT CGTCTTCAAG AATTCAGCTT GGCTGCAGTG AATAATAAAA
2651 TGTGTGTTTG TCCGAAATAC GCGTTTTGAG ATTTCTGTCG CCGACTAAAT

144
113

2701 TCATGTCGCG CGATAGTGGT GTTTATCGCC GATAGAGATG GCGATATTGG
2751 AAAAATCGAT ATTTGAAAAT ATGGCATATT GAAAATGTCG CCGATGTGAG
2801 TTTCTGTGTA ACTGATATCG CCATTTTTC CC AAAAGTGATT TTTGGGCATA
2851 CGCGATATCT GGCGATAGCG CTTATATCGT TTACGGGGGA TGGCGATAGA
5 2901 CCACTTTGGT GACTTGGGCG ATTCTGTGTG TCGCAAATAT CGCAGTTTCG
2951 ATATAGGTGA CAGACGATAT GAGGCTATAT CGCCGATAGA GGCGACATCA
3001 AGCTGGCACA TGGCCAATGC ATATCGATCT ATACATTGAA TCAATATTGG
3051 CCATTAGCCA TATTATTCAT TGGTTATATA GCATAAATCA ATATTGGCTA
3101 TTGGCCATTG CATACGTTGT ATCCATATCA TAATATGTAC ATTTATATTG
10 3151 GCTCATGTCC AACATTACCG CCATGTTGAC ATTGATTATT GACTAGTTAT
3201 TAATAGTAAT CAATTACGGG GTCATTAGTT CATAGCCCAT ATATGGAGTT
3251 CCGCGTTACA TAACTTACGG TAAATGGCCC GCCTGGCTGA CCGCCCAACG
3301 ACCCCCGCCC ATTGACGTCA ATAATGACGT ATGTTCCCAT AGTAACGCCA
3351 ATAGGGACTT TCCATTGACG TCAATGGGTG GAGTATTTAC GGTAAACTGC
15 3401 CCACTTGGCA GTACATCAAG TGTATCATAT GCCAAGTACG CCCCTATTG
3451 ACGTCAATGA CGGTAAATGG CCCGCCTGGC ATTATGCCCA GTACATGACC
3501 TTATGGGACT TTCCTACTTG GCAGTACATC TACGTATTAG TCATCGCTAT
3551 TACCATGGTG ATGCGGTTTT GGCAGTACAT CAATGGGCGT GGATAGCGGT
3601 TTGACTCACG GGGATTTC CAAGTCTCCACC CCATTGACGT CAATGGGAGT
20 3651 TTGTTTTGGC ACCAAAATCA ACGGGACTTT CCAAATGTC GTAACAAC TC
3701 CGCCCCATTG ACGCAAATGG GCGGTAGGCG TGTACGGTGG GAGGTCTATA
3751 TAAGCAGAGC TCGTTTAGTG AACCCTCAGA TCGCCTGGAG ACGCCATCCA
3801 CGCTGTTTTG ACCTCCATAG AAGACACCGG GACCGATCCA GCCTCCGCAA
3851 GCTTGCCGCC ACCATGGACT GGACCTGGAG GGTGTTCTGC CTGCTGGCCG

115
114

3901 TGGCCCCCGG CGCCACAGC GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC AGGAGCCGAA
3951 GTGAAAAGC CTGGGGCTTC AGTGAAGGTG TCCTGCAAGG CCTCTGGATA
4001 CACATTCACT AATTATATTA TCCACTGGGT GAAGCAGGAG CCTGGTCAGG
4051 GCCTTGAATG GATTGGATAT TTTAATCCTT ACAATCATGG TACTAAGTAC
5 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 GGCAGGCCAG GCCTGACCTT GGCTTTGGGG CAGGGAGGGG
10 4351 GCTAAGGTGA GGCAGGTGGC GCCAGCCAGG TGCACACCCA ATGCCCATGA
4401 GCCCAGACAC TGGACGCTGA ACCTCGCGGA CAGTTAAGAA CCCAGGGGCC
4451 TCTGCGCCCT GGGCCCAGCT CTGTCCCACA CCGCGGTCAC ATGGCACCAC
4501 CTCTCTTGCA GCCTCCACCA AGGGCCATC GGTCTTCCCC CTGGCACCCT
4551 CCTCCAAGAG CACCTCTGGG GGCACAGCGG CCCTGGGCTG CCTGGTCAAG
15 4601 GACTACTTCC CCGAACCGGT GACGGTGTCG TGGAATCAG GCGCCCTGAC
4651 CAGCGGCGTG CACACCTTCC CGGCTGTCCT ACAGTCCTCA GGACTCTACT
4701 CCCTCAGCAG CGTGGTGACC GTGCCCTCCA GCAGCTTGGG CACCCAGACC
4751 TACATCTGCA ACGTGAATCA CAAGCCCAGC AACACCAAGG TGGACAAGAA
4801 AGTTGGTGAG AGGCCAGCAC AGGGAGGGAG GGTGTCTGCT GGAAGCCAGG
20 4851 CTCAGCGCTC CTGCCTGGAC GCATCCCGGC TATGCAGCCC CAGTCCAGGG
4901 CAGCAAGGCA GGCCCCGTCT GCCTCTTCAC CCGGAGGCCT CTGCCCCGCC
4951 CACTCATGCT CAGGGAGAGG GTCTTCTGGC TTTTCCCCA GGCTCTGGGC
5001 AGGCACAGGC TAGGTGCCCC TAACCCAGGC CCTGCACACA AAGGGGCAGG
5051 TGCTGGGCTC AGACCTGCCA AGAGCCATAT CCGGGAGGAC CCTGCCCTG

116
115

5101 ACCTAAGCCC ACCCCAAAGG CCAAACCTCTC CACTCCCTCA GCTCGGACAC
5151 CTTCTCTCCT CCCAGATTCC AGTAACTCCC AATCTTCTCT CTGCAGAGCC
5201 CAAATCTTGT GACAAAACCTC ACACATGCCC ACCGTGCCCCA GGTAAGCCAG
5251 CCCAGGCCTC GCCCTCCAGC TCAAGGCGGG ACAGGTGCCC TAGAGTAGCC
5 5301 TGCATCCAGG GACAGGCCCC AGCCGGGTGC TGACACGTCC ACCTCCATCT
5351 CTTCTCTCAGC ACCTGAACTC CTGGGGGGAC CGTCAGTCTT CCTCTTCCCC
5401 CCAAAACCCA AGGACACCCT CATGATCTCC CGGACCCCTG AGGTCACATG
5451 CGTGGTGGTG GACGTGAGCC ACGAAGACCC TGAGGTCAAG TTCAACTGGT
5501 ACGTGGACGG CGTGGAGGTG CATAATGCCA AGACAAAGCC GCGGGAGGAG
10 5551 CAGTACAACA GCACGTACCG TGTGGTCAGC GTCCTCACCG TCCTGCACCA
5601 GGACTGGCTG AATGGCAAGG AGTACAAGTG CAAGGTCTCC AACAAAGCCC
5651 TCCCAGCCCC CATCGAGAAA ACCATCTCCA AAGCCAAAGG TGGGACCCGT
5701 GGGGTGCGAG GGCCACATGG ACAGAGGCCG GCTCGGCCCA CCCTCTGCCC
5751 TGAGAGTGAC CGCTGTACCA. ACCTCTGTCC CTACAGGGCA GCCCCGAGAA
15 5801 CCACAGGTGT ACACCCTGCC CCCATCCCGG GATGAGCTGA CCAAGAACCA
5851 GGTGAGCCTG ACCTGCCTGG TCAAAGGCTT CTATCCCAGC GACATCGCCG
5901 TGGAGTGGGA GAGCAATGGG CAGCCGGAGA ACAACTACAA GACCACGCCT
5951 CCCGTGCTGG ACTCCGACGG CTCCTTCTTC CTCTACAGCA AGCTCACCGT
6001 GGACAAGAGC AGGTGGCAGC AGGGGAACGT CTTCTCATGC TCCGTGATGC
20 6051 ATGAGGCTCT GCACAACCAC TACACGCAGA AGAGCCTCTC CCTGTCTCCG
6101 GGTAAATGAG TGCGACGGCC GGCAAGCCCC CGCTCCCCGG GCTCTCGCGG
6151 TCGCACGAGG ATGCTTGGCA CGTACCCCTT GTACATACTT CCCGGGCGCC
6201 CAGCATGGAA ATAAAGCACC CAGCGCTGCC CTGGGCCCCT GCGAGACTGT
6251 GATGGTTCTT TCCACGGGTC AGGCCGAGTC TGAGGCCTGA GTGGCATGAG

777
116

6301 ATCTGATATC ATCGATGAAT TCGAGCTCGG TACCCGGGGA TCGATCCAGA
6351 CATGATAAGA TACATTGATG AGTTTGGACA AACCACAAC TACAATGCAGT
6401 GAAAAAATG CTTTATTTGT GAAATTTGTG ATGCTATTGC TTTATTTGTA
6451 ACCATTATAA GCTGCAATAA ACAAGTTAAC AACAACAATT GCATTTCATT
5 6501 TATGTTTCAG GTTCAGGGGG AGGTGTGGGA GGTTTTTTAA AGCAAGTAAA
6551 ACCTCTACAA ATGTGGTATG GCTGATTATG ATCTCTAGTC AAGGCACTAT
6601 ACATCAAATA TTCCTTATTA ACCCCTTTAC AAATTAAAAA GCTAAAGGTA
6651 CACAATTTTT GAGCATAGTT ATTAATAGCA GACACTCTAT GCCTGTGTGG
6701 AGTAAGAAAA AACAGTATGT TATGATTATA ACTGTTATGC CTACTTATAA
10 6751 AGGTTACAGA ATATTTTTCC ATAATTTTCT TGTATAGCAG TGCAGCTTTT
6801 TCCTTTGTGG TGTAATAGC AAAGCAAGCA AGAGTTCTAT TACTAAACAC
6851 AGCATGACTC AAAAAACTTA GCAATTCTGA AGGAAAGTCC TTGGGGTCTT
6901 CTACCTTTCT CTTCTTTTTT GGAGGAGTAG AATGTTGAGA GTCAGCAGTA
6951 GCCTCATCAT CACTAGATGG CATTCTTCT GAGCAAAACA GGTTTTCCTC
15 7001 ATTAAAGGCA TTCCACCACT GCTCCCATTC ATCAGTTCCA TAGGTTGGAA
7051 TCTAAAATAC ACAAACAATT AGAATCAGTA GTTTAACACA TTATACACTT
7101 AAAAATTTTA TATTTACCTT AGAGCTTTAA ATCTCTGTAG GTAGTTTGTC
7151 CAATTATGTC ACACCACAGA AGTAAGGTTT CTTCAAAAG ATCCGGGACC
7201 AAAGCGGCCA TCGTGCCTCC CCACTCCTGC AGTTCGGGGG CATGGATGCG
20 7251 CGGATAGCCG CTGCTGGTTT CCTGGATGCC GACGGATTTG CACTGCCGGT
7301 AGAACTCCGC GAGGTCGTCC AGCCTCAGGC AGCAGCTGAA CCAACTCGCG
7351 AGGGGATCGA GCCCGGGGTG GGCGAAGAAC TCCAGCATGA GATCCCCGCG
7401 CTGGAGGATC ATCCAGCCGG CGTCCCGGAA AACGATTCCG AAGCCCAACC
7451 TTTCATAGAA GGCGGCGGTG GAATCGAAAT CTCGTGATGG CAGGTTGGGC

276
118

7501 GTCGCTTGGT CGGTCATTTT GAACCCCAGA GTCCCGCTCA GAAGAACTCG
7551 TCAAGAAGGC GATAGAAGGC GATGCGCTGC GAATCGGGAG CGGCGATACC
7601 GTAAAGCACG AGGAAGCGGT CAGCCCATTTC GCCGCCAAGC TCTTCAGCAA
7651 TATCACGGGT AGCCAACGCT ATGTCCTGAT AGCGGTCCGC CACACCCAGC
5 7701 CGGCCACAGT CGATGAATCC AGAAAAGCGG CCATTTTCCA CCATGATATT
7751 CGGCAAGCAG GCATCGCCAT GGGTCACGAC GAGATCCTCG CCGTCGGGCA
7801 TGC GCGCCTT GAGCCTGGCG AACAGTTCGG CTGGCGCGAG CCCCTGATGC
7851 TCTTCGTCCA GATCATCCTG ATCGACAAGA CCGGCTTCCA TCCGAGTACG
7901 TGCTCGCTCG ATGCGATGTT TCGCTTGGTG GTCGAATGGG CAGGTAGCCG
10 7951 GATCAAGCGT ATGCAGCCGC CGCATTGCAT CAGCCATGAT GGATACTTTC
8001 TCGGCAGGAG CAAGGTGAGA TGACAGGAGA TCCTGCCCCG GCACTTCGCC
8051 CAATAGCAGC CAGTCCCTTC CCGCTTCAGT GACAACGTCG AGCACAGCTG
8101 CGCAAGGAAC GCCCGTCGTG GCCAGCCACG ATAGCCGCGC TGCCTCGTCC
8151 TGCAGTTCAT TCAGGGCACC GGACAGGTCG GTCTTGACAA AAAGAACCGG
15 8201 GCGCCCCCTGC GCTGACAGCC GGAACACGGC GGCATCAGAG CAGCCGATTG
8251 TCTGTTGTGC CCAGTCATAG CCGAATAGCC TCTCCACCCA AGCGGCCGGA
8301 GAACCTGCGT GCAATCCATC TTGTTCAATC ATGCGAAACG ATCCTCATCC
8351 TGTCTCTTGA TCAGATCTTG ATCCCCTGCG CCATCAGATC CTTGGCGGCA
8401 AGAAAGCCAT CCAGTTTACT TTGCAGGGCT TCCCAACCTT ACCAGAGGGC
20 8451 GCCCCAGCTG GCAATTCCGG TTCGCTTGCT GTCCATAAAA CCGCCCAGTC
8501 TAGCTATCGC CATGTAAGCC CACTGCAAGC TACCTGCTTT CTCTTTGCGC
8551 TTGCGTTTTT CCTTGTCCAG ATAGCCCAGT AGCTGACATT CATCCGGGGT
8601 CAGCACCGTT TCTGCGGACT GGCTTTCTAC GTGTTCCGCT TCCTTTAGCA
8651 GCCCTTGCGC CCTGAGTGCT TGCGGCAGCG TGAAGCT

SEC 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
5 ligera humanizado que comprende SEC ID NO: 14 (humV1=VLh) de
3964-4284)**

```

1  CTAGCTTTTT GCAAAAGCCT AGGCCTCCAA AAAAGCCTCC TCACTACTTC
51  TGGAATAGCT CAGAGGCCGA GCGGCCTCG GCCTCTGCAT AAATAAAAAA
10  101 AATTAGTCAG CCATGGGGCG GAGAATGGGC GGAAGTGGGC GGAGTTAGGG
151  GCGGGATGGG CGGAGTTAGG GCGGGACTA TGGTTGCTGA CTAATTGAGA
201  TGCATGCTTT GCATACTTCT GCCTGCTGGG GAGCCTGGTT GCTGACTAAT
251  TGAGATGCAT GCTTTGCATA CTTCTGCCTG CTGGGGAGCC TGGGGACTTT
301  CCACACCCTA ACTGACACAC ATTCCACAGC TGCCTCGCGC GTTTCGGTGA
15  351 TGACGGTGAA AACCTCTGAC ACATGCAGCT CCCGGAGACG GTCACAGCTT
401  GTCTGTAAGC GGATGCCGGG AGCAGACAAG CCCGTCAGGG CGCGTCAGCG
451  GGTGTTGGCG GGTGTCGGGG CGCAGCCATG ACCCAGTCAC GTAGCGATAG
501  CGGAGTGTAT ACTGGCTTAA CTATGCGGCA TCAGAGCAGA TTGTACTGAG
551  AGTGCACCAT ATGCGGTGTG AAATACCGCA CAGATGCGTA AGGAGAAAAT
20  601 ACCGCATCAG GCGCTCTTCC GCTTCCTCGC TCACTGACTC GCTGCGCTCG
651  GTCGTTTCGGC TCGGGCGAGC GGTATCAGCT CACTCAAAGG CGGTAATACG
701  GTTATCCACA GAATCAGGGG ATAACGCAGG AAAGAACATG TGAGCAAAAG
751  GCCAGCAAAA GGCCAGGAAC CGTAAAAAGG CCGCGTTGCT GCGGTTTTTC
801  CATAGGCTCC GCCCCCTGA CGAGCATCAC AAAAATCGAC GCTCAAGTCA

```


120
119

851 GAGGTGGCGA AACCCGACAG GACTATAAAG ATACCAGGCG TTTCCCCCTG
901 GAAGCTCCCT CGTGCGCTCT CCTGTTCCGA CCCTGCCGCT TACCGGATAC
951 CTGTCCGCCT TTCTCCCTTC GGAAGCGTG GCGCTTTCTC ATAGCTCACG
1001 CTGTAGGTAT CTCAGTTCGG TGTAGGTCGT TCGCTCCAAG CTGGGCTGTG
5 1051 TGCACGAACC CCCCGTTCAG CCCGACCGCT GCGCCTTATC CGGTAACATAT
1101 CGTCTTGAGT CCAACCCGGT AAGACACGAC TTATCGCCAC TGGCAGCAGC
1151 CACTGGTAAC AGGATTAGCA GAGCGAGGTA TGTAGGCGGT GCTACAGAGT
1201 TCTTGAAGTG GTGGCCTAAC TACGGCTACA CTAGAAGGAC AGTATTTGGT
1251 ATCTGCGCTC TGCTGAAGCC AGTTACCTTC GGAAAAAGAG TTGGTAGCTC
10 1301 TTGATCCGGC AAACAAACCA CCGCTGGTAG CCGTGGTTTT TTTGTTTGCA
1351 AGCAGCAGAT TACGCGCAGA AAAAAAGGAT CTCAAGAAGA TCCTTTGATC
1401 TTTTCTACGG GGTCTGACGC TCAGTGGAAC GAAAACTCAC GTTAAGGGAT
1451 TTTGGTCATG AGATTATCAA AAAGGATCTT CACCTAGATC CTTTTAAATT
1501 AAAAATGAAG TTTTAAATCA ATCTAAAGTA TATATGAGTA AACTTGGTCT
15 1551 GACAGTTACC AATGCTTAAT CAGTGAGGCA CCTATCTCAG CGATCTGTCT
1601 ATTTGTTTCA TCCATAGTTG CCTGACTCCC CGTCGTGTAG ATAACCTACGA
1651 TACGGGAGGG CTTACCATCT GGCCCCAGTG CTGCAATGAT ACCGCGAGAC
1701 CCACGCTCAC CGGCTCCAGA TTTATCAGCA ATAAACCAGC CAGCCGGAAG
1751 GGCCGAGCGC AGAAGTGGTC CTGCAACTTT ATCCGCCTCC ATCCAGTCTA
20 1801 TTAATTGTTG CCGGGAAGCT AGAGTAAGTA GTTCGCCAGT TAATAGTTTG
1851 CGCAACGTTG TTGCCATTGC TGCAGGCATC GTGGTGTCAC GTCGTCGTT
1901 TGGTATGGCT TCATTCAGCT CCGGTTCCCA ACGATCAAGG CGAGTTACAT
1951 GATCCCCCAT GTTGTGCAAA AAAGCGGTTA GCTCCTTCGG TCCTCCGATC
2001 GTTGTGAGAA GTAAGTTGGC CGCAGTGTTA TCACTCATGG TTATGGCAGC

121
120

2051 ACTGCATAAT TCTCTTACTG TCATGCCATC CGTAAGATGC TTTTCTGTGA
2101 CTGGTGAGTA CTCAACCAAG TCATTCTGAG AATAGTGTAT GCGGCGACCG
2151 AGTTGCTCTT GCCCGGCGTC AACACGGGAT AATACCGCGC CACATAGCAG
2201 AACTTTAAAA GTGCTCATCA TTGGAAAACG TTCTTCGGGG CGAAAACCTCT
5 2251 CAAGGATCTT ACCGCTGTTG AGATCCAGTT CGATGTAACC CACTCGTGCA
2301 CCCAACTGAT CTTCAGCATC TTTTACTTTC ACCAGCGTTT CTGGGTGAGC
2351 AAAAACAGGA AGGCAAAATG CCGCAAAAAA GGAATAAGG GCGACACGGA
2401 AATGTTGAAT ACTCATACTC TTCCTTTTTT AATATTATTG AAGCATTTAT
2451 CAGGGTTATT GTCTCATGAG CGGATACATA TTTGAATGTA TTTAGAAAAA
10 2501 TAAACAAATA GGGGTTCCGC GCACATTTCC CCGAAAAGTG CCACCTGACG
2551 TCTAAGAAAC CATTATTATC ATGACATTAA CCTATAAAAA TAGGCGTATC
2601 ACGAGGCCCT TTCGTCTTCA AGAATTCAGC TTGGCTGCAG TGAATAATAA
2651 AATGTGTGTT TGTCCGAAAT ACGCGTTTTG AGATTCTCTGT CGCCGACTAA
2701 ATTCATGTCG CGCGATAGTG GTGTTTATCG CCGATAGAGA TGGCGATATT
15 2751 GGAAAAATCG ATATTTGAAA ATATGGCATA TTGAAAATGT CGCCGATGTG
2801 AGTTTCTGTG TAACTGATAT CGCCATTTTT CCAAAGTGA TTTTGGGCA
2851 TACGCGATAT CTGGCGATAG CGCTTATATC GTTTACGGGG GATGGCGATA
2901 GACGACTTTG GTGACTTGGG CGATTCTGTG TGTCGCAAAT ATCGCAGTTT
2951 CGATATAGGT GACAGACGAT ATGAGGCTAT ATCGCCGATA GAGGCGACAT
20 3001 CAAGCTGGCA CATGGCCAAT GCATATCGAT CTATACATTG AATCAATATT
3051 GGCCATTAGC CATATTATTC ATTGGTTATA TAGCATAAAT CAATATTGGC
3101 TATTGGCCAT TGCATACGTT GATCCATAT CATAATATGT ACATTTATAT
3151 TGGCTCATGT CCAACATTAC CGCCATGTTG ACATTGATTA TTGACTAGTT
3201 ATTAATAGTA ATCAATTACG GGGTCATTAG TTCATAGCCC ATATATGGAG

822
121

3251 TTCCGCGTTA CATAACTTAC GGTAAATGGC CCGCCTGGCT GACCGCCCAA
3301 CGACCCCCGC CCATTGACGT CAATAATGAC GTATGTTCCC ATAGTAACGC
3351 CAATAGGGAC TTTCCATTGA CGTCAATGGG TGGAGTATTT ACGGTAAACT
3401 GCCCACTTGG CAGTACATCA AGTGTATCAT ATGCCAAGTA CGCCCCCTAT
5 3451 TGACGTCAAT GACGGTAAAT GGCCCGCCTG GCATTATGCC CAGTACATGA
3501 CCTTATGGGA CTTTCCTACT TGGCAGTACA TCTACGTATT AGTCATCGCT
3551 ATTACCATGG TGATGCGGTT TTGGCAGTAC ATCAATGGGC GTGGATAGCG
3601 GTTTGACTCA CGGGGATTTT CAAGTCTCCA CCCCATTGAC GTCAATGGGA
3651 GTTTGTTTTG GCACCAAAT CAACGGGACT TTCCAAAATG TCGTAACAAC
10 3701 TCCGCCCCAT TGACGCAAAT GGGCGGTAGG CGTGTACGGT GGGAGGTCTA
3751 TATAAGCAGA GCTCGTTTAG TGAACCGTCA GATCGCCTGG AGACGCCATC
3801 CACGCTGTTT TGACCTCCAT AGAAGACACC GGGACCGATC CAGCCTCCGC
3851 AAGCTTGATA TCGAATTCCT GCAGCCCGGG GGATCCGCCC GCTTGCCGCC
3901 ACCATGGAGA CCCCCGCCA GCTGCTGTTC CTGCTGCTGC TGTGGCTGCC
15 3951 CGACACCACC GGCACATTC TGCTGACCCA GTCTCCAGCC ACCCTGTCTC
4001 TGAGTCCAGG AGAAAGAGCC ACTCTCTCCT GCAGGGCCAG TCAGAACATT
4051 GGCACAAGCA TACAGTGGTA TCAACAAAA CCAGGTCAGG CTCCAAGGCT
4101 TCTCATAAGG TCTTCTTCTG AGTCTATCTC TGGGATCCCT TCCAGGTTTA
4151 GTGGCAGTGG ATCAGGGACA GATTTTACTC TTACCATCAG CAGTCTGGAG
20 4201 CCTGAAGATT TTGCAGTGTA TTAAGTCAA CAAAGTAATA CCTGGCCATT
4251 CACGTTTCGGC CAGGGGACCA AGCTGGAGAT CAAACGTGAG TATTCTAGAA
4301 AGATCCTAGA ATTCTAAACT CTGAGGGGGT CGGATGACGT GGCCATTCTT
4351 TGCCTAAAGC ATTGAGTTTA CTGCAAGGTC AGAAAAGCAT GCAAAGCCCT
4401 CAGAATGGCT GCAAAGAGCT CCAACAAAAC AATTTAGAAC TTTATTAAGG

4451 AATAGGGGGA AGCTAGGAAG AAACTCAAAA CATCAAGATT TTAAATACGC
4501 TTCTTGGTCT CCTTGCTATA ATTATCTGGG ATAAGCATGC TGTTTTCTGT
4551 CTGTCCCTAA CATGCCCTGT GATTATCCGC AAACAACACA CCCAAGGGCA
4601 GAACTTTGTT ACTTAAACAC CATCCTGTTT GCTTCTTTCC TCAGGAACTG
5 4651 TGGCTGCACC ATCTGTCTTC ATCTTCCCGC CATCTGATGA GCAGTTGAAA
4701 TCTGGAAGTCT CCTCTGTTGT GTGCCTGCTG AATAACTTCT ATCCCAGAGA
4751 GGCCAAAGTA CAGTGGAAGG TGGATAACGC CCTCCAATCG GGTAAGTCCC
4801 AGGAGAGTGT CACAGAGCAG GACAGCAAGG ACAGCACCTA CAGCCTCAGC
4851 AGCACCCCTGA CGCTGAGCAA AGCAGACTAC GAGAAACACA AAGTCTACGC
10 4901 CTGCGAAGTC ACCCATCAGG GCCTGAGCTC GCCCGTCACA AAGAGCTTCA
4951 ACAGGGGAGA GTGTTAGAGG GAGAAGTGCC CCCACCTGCT CCTCAGTTCC
5001 AGCCTGACCC CCTCCCATCC TTTGGCCTCT GACCCTTTTT CCACAGGGGA
5051 CCTACCCCTA TTGCGGTCCT CCAGCTCATC TTTCACCTCA CCCCCCTCCT
5101 CCTCCTTGGC TTTAATTATG CTAATGTTGG AGGAGAATGA ATAAATAAAG
15 5151 TGAATCTTTG CACCTGTGGT TTCTCTCTTT CCTCATTTAA TAATTATTAT
5201 CTGTTGTTTA CCAACTACTC AATTTCTCTT ATAAGGGACT AAATATGTAG
5251 TCATCCTAAG GCGCATAACC ATTTATAAAA ATCATCCTTC ATTCTATTTT
5301 ACCCTATCAT CCTCTGCAAG ACAGTCCTCC CTCAAACCCA CAAGCCTTCT
5351 GTCCTCACAG TCCCCTGGGC CATGGTAGGA GAGACTTGCT TCCTTGTTTT
20 5401 CCCCTCCTCA GCAAGCCCTC ATAGTCCTTT TTAAGGGTGA CAGGTCTTAC
5451 AGTCATATAT CCTTTGATTC AATTCCCTGA GAATCAACCA AAGCAAATTT
5501 TTCAAAGAA GAAACCTGCT ATAAAGAGAA TCATTCATTG CAACATGATA
5551 TAAAATAACA ACACAATAAA AGCAATTAAA TAAACAAACA ATAGGGAAAT
5601 GTTTAAGTTC ATCATGGTAC TTAGACTTAA TGGAATGTCA TGCCTTATTT

120
122

124
23

5651 ACATTTTAA ACAGGTACTG AGGGACTCCT GTCTGCCAAG GGCCGTATTG
 5701 AGTACTTTCC ACAACCTAAT TTAATCCACA CTATACTGTG AGATTAAAAA
 5751 CATTCATTAA AATGTTGCAA AGGTTCTATA AAGCTGAGAG ACAAATATAT
 5801 TCTATAACTC AGCAATCCCA CTTCTAGATG ACTGAGTGTC CCCACCCACC
 5 5851 AAAAACTAT GCAAGAATGT TCAAAGCAGC TTTATTTACA AAAGCCAAAA
 5901 ATTGGAAATA GCCCGATTGT CCAACAATAG AATGAGTTAT TAAACTGTGG
 5951 TATGTTTATA CATTAGAATA CCCAATGAGG AGAATTAACA AGCTACAAC
 6001 ATACCTACTC ACACAGATGA ATCTCATAAA AATAATGTGA CATAAGAGAA
 6051 ACTCAATGCA AAAGATATGT TCTGTATGTT TTCATCCATA TAAAGTTCAA
 10 6101 AACCAGGTAA AAATAAAGTT AGAAATTTGG ATGGAAATTA CTCTTAGCTG
 6151 GGGGTGGGCG AGTTAGTGCC TGGGAGAAGA CAAGAAGGGG CTTCTGGGGT
 6201 CTTGGTAATG TTCTGTTCTT CGTGTGGGGT TGTGCAGTTA TGATCTGTGC
 6251 ACTGTTCTGT ATACACATTA TGCTTCAAAA TAACTTCACA TAAAGAACAT
 6301 CTTATACCCA GTTAATAGAT AGAAGAGGAA TAAGTAATAG GTCAAGACCA
 15 6351 CGCAGCTGGT AAGTGGGGGG GCCTGGGATC AAATAGCTAC CTGCCTAATC
 6401 CTGCCCTCTT GAGCCCTGAA TGAGTCTGCC TTCCAGGGCT CAAGGTGCTC
 6451 AACAAAACAA CAGGCCTGCT ATTTTCCTGG CATCTGTGCC CTGTTTGGCT
 6501 AGCTAGGAGC ACACATACAT AGAAATTAAA TGAAACAGAC CTTAGCAAG
 6551 GGGACAGAGG ACAGAATTAA CCTTGCCAG AACTGGAAA CCCATGTATG
 20 6601 AACACTCACA TGTTTGGGAA GGGGGAAGGG CACATGTAAA TGAGGACTCT
 6651 TCCTCATTCT ATGGGGCACT CTGGCCCTGC CCCTCTCAGC TACTCATCCA
 6701 TCCAACACAC CTTTCTAAGT ACCTCTCTCT GCCTACACTC TGAAGGGGTT
 6751 CAGGAGTAAC TAACACAGCA TCCCTTCCCT CAAATGACTG ACAATCCCTT
 6801 TGTCTGCTT TGTTTTTCTT TCCAGTCAGT ACTGGGAAAG TGGGGAAGGA

125
124

6851 CAGTCATGGA GAAACTACAT AAGGAAGCAC CTTGCCCTTC TGCCTCTTGA
6901 GAATGTTGAT GAGTATCAAA TCTTTCAAAC TTTGGAGGTT TGAGTAGGGG
6951 TGAGACTCAG TAATGTCCCT TCCAATGACA TGAAC TTGCT CACTCATCCC
7001 TGGGGGCCAA ATTGAACAAT CAAAGGCAGG CATAATCCAG CTATGAATTC
5 7051 TAGGATCGAT CCAGACATGA TAAGATACAT TGATGAGTTT GGACAAACCA
7101 CAACTAGAAT GCAGTGAAAA AAATGCTTTA TTTGTGAAAT TTGTGATGCT
7151 ATTGCTTTAT TTGTAACCAT TATAAGCTGC AATAACAAG TTAACAACAA
7201 CAATTGCATT CATTTTATGT TTCAGGTTCA GGGGGAGGTG TGGGAGGTTT
7251 TTTAAAGCAA GTAAAACCTC TACAAATGTG GTATGGCTGA TTATGATCTC
10 7301 TAGTCAAGGC ACTATACATC AAATATTCCT TATTAACCCC TTTACAAATT
7351 AAAAAGCTAA AGGTACACAA TTTTGTAGCA TAGTTATTAA TAGCAGACAC
7401 TCTATGCCTG TGTGGAGTAA GAAAAACAG TATGTTATGA TTATAACTGT
7451 TATGCCTACT TATAAAGGTT ACAGAATATT TTTCCATAAT TTTCTTGTAT
7501 AGCAGTGCAG CTTTTTCCTT TGTGGTGTAA ATAGCAAAGC AAGCAAGAGT
15 7551 TCTATTACTA AACACAGCAT GACTCAAAAA ACTTAGCAAT TCTGAAGGAA
7601 AGTCCTTGGG GTCTTCTACC TTTCTCTTCT TTTTGGAGG AGTAGAATGT
7651 TGAGAGTCAG CAGTAGCCTC ATCATCACTA GATGGCATT TTTCTGAGCA
7701 AAACAGGTTT TCCTCATTAAGGCATTCCA CCACTGCTCC CATTTCATCAG
7751 TTCCATAGGT TGGAATCTAA AATACACAAA CAATTAGAAT CAGTAGTTTA
20 7801 ACACATTATA CACTTAAAAA TTTTATATTT ACCTTAGAGC TTTAAATCTC
7851 TGTAGGTAGT TTGTCCAATT ATGTCACACC ACAGAAGTAA GGTTCCTTCA
7901 CAAAGATCCG GGACCAAAGC GGCCATCGTG CCTCCCCACT CCTGCAGTTC
7951 GGGGGCATGG ATGCGCGGAT AGCCGCTGCT GGTTTCCTGG ATGCCGACGG
8001 ATTTGCACTG CCGGTAGAAC TCCGCGAGGT CGTCCAGCCT CAGGCAGCAG

126
125

8051 CTGAACCAAC TCGCGAGGGG ATCGAGCCCG GGGTGGGCGA AGAACTCCAG
8101 CATGAGATCC CCGCGCTGGA GGATCATCCA GCCGGCGTCC CGGAAAACGA
8151 TTCCGAAGCC CAACCTTTCA TAGAAGGCGG CGGTGAATC GAAATCTCGT
8201 GATGGCAGGT TGGGCGTCGC TTGGTCGGTC ATTTCGAACC CCAGAGTCCC
5 8251 GCTCAGAAGA ACTCGTCAAG AAGGCGATAG AAGGCGATGC GCTGCGAATC
8301 GGGAGCGGCG ATACCGTAAA GCACGAGGAA GCGGTCAGCC CATTGCGCGC
8351 CAAGCTCTTC AGCAATATCA CGGGTAGCCA ACGCTATGTC CTGATAGCGG
8401 TCCGCCACAC CCAGCCGGCC ACAGTCGATG AATCCAGAAA AGCGGCCATT
8451 TTCCACCATG ATATTCGGCA AGCAGGCATC GCCATGGGTC ACGACGAGAT
10 8501 CCTCGCCGTC GGGCATGCGC GCCTTGAGCC TGGCGAACAG TTCGGCTGGC
8551 GCGAGCCCCT GATGCTCTTC GTCCAGATCA TCCTGATCGA CAAGACCGGC
8601 TTCCATCCGA GTACGTGCTC GCTCGATGCG ATGTTTCGCT TGGTGGTCGA
8651 ATGGGCAGGT AGCCGGATCA AGCGTATGCA GCCGCCGCAT TGCATCAGCC
8701 ATGATGGATA CTTTCTCGGC AGGAGCAAGG TGAGATGACA GGAGATCCTG
15 8751 CCCCGGCACT TCGCCCAATA GCAGCCAGTC CCTTCCCGCT TCAGTGACAA
8801 CGTCGAGCAC AGCTGCGCAA GGAACGCCCC TCGTGGCCAG CCACGATAGC
8851 CGCGCTGCCT CGTCCTGCAG TTCATTGAGG GCACCGGACA GGTCGGTCTT
8901 GACAAAAAGA ACCGGGCGCC CCTGCGCTGA CAGCCGGAAC ACGGCGGCAT
8951 CAGAGCAGCC GATTGTCTGT TGTGCCAGT CATAGCCGAA TAGCCTCTCC
20 9001 ACCCAAGCGG CCGGAGAACC TCGTGCAAT CCATCTTGTT CAATCATGCG
9051 AAACGATCCT CATCCTGTCT CTTGATCAGA TCTTGATCCC CTGCGCCATC
9101 AGATCCTTGG CGGCAAGAAA GCCATCCAGT TTACTTTGCA GGGCTTCCCA
9151 ACCTTACCAG AGGGCGCCCC AGCTGGCAAT TCCGGTTCGC TTGCTGTCCA
9201 TAAAACCGCC CAGTCTAGCT ATCGCCATGT AAGCCCACTG CAAGCTACCT

127
126

9251 GCTTTCTCTT TGCCTTGCG TTTTCCCTTG TCCAGATAGC CCAGTAGCTG
9301 ACATTCATCC GGGGTCAGCA CCGTTTCTGC GGACTGGCTT TCTACGTGTT
9351 CCGCTTCCTT TAGCAGCCCT TGCGCCCTGA GTGCTTGCGG CAGCGTGAAG

5 **SEC ID NO:18**

Secuencia de nucleótido del vector de expresión HCMV-K HuAb-VL1 hum V2 (Secuencia de ADN completa de un vector de expresión de cadena ligera humanizado que comprende SEC ID NO: 13 (humV2=VLm) de 3926-4246)

10

1 CTAGCTTTTT GCAAAAGCCT AGGCCTCCAA AAAAGCCTCC TCACTACTTC
51 TGGAATAGCT CAGAGGCCGA GCGGCCTCG GCCTCTGCAT AAATAAAAAA
101 AATTAGTCAG CCATGGGGCG GAGAATGGGC GGAAGTGGGC GGAGTTAGGG
151 GCGGGATGGG CGGAGTTAGG GCGGGGACTA TGGTTGCTGA CTAATTGAGA
15 201 TGCATGCTTT GCATACTTCT GCCTGCTGGG GAGCCTGGTT GCTGACTAAT
251 TGAGATGCAT GCTTTGCATA CTTCTGCCTG CTGGGGAGCC TGGGGACTTT
301 CCACACCCTA ACTGACACAC ATTCCACAGC TGCCTCGCGC GTTTCGGTGA
351 TGACGGTGAA AACCTCTGAC ACATGCAGCT CCCGGAGACG GTCACAGCTT
401 GTCTGTAAGC GGATGCCGGG AGCAGACAAG CCCGTCAGGG CGCGTCAGCG
20 451 GGTGTTGGCG GGTGTCGGGG CGCAGCCATG ACCCAGTCAC GTAGCGATAG
501 CGGAGTGTAT ACTGGCTTAA CTATGCGGCA TCAGAGCAGA TTGTACTGAG
551 AGTGCACCAT ATGCGGTGTG AAATACCGCA CAGATGCGTA AGGAGAAAAT
601 ACCGCATCAG GCGCTCTTCC GCTTCCTCGC TCACTGACTC GCTGCGCTCG
651 GTCGTTCTGGC TCGGGCGAGC GGTATCAGCT CACTCAAAGG CGGTAATACG

428
128

701 GTTATCCACA GAATCAGGGG ATAACGCAGG AAAGAACATG TGAGCAAAAG
751 GCCAGCAAAA GGCCAGGAAC CGTAAAAAGG CCGCGTTGCT GGC GTTTTTTC
801 CATAGGCTCC GCCCCCTGA CGAGCATCAC AAAAATCGAC GCTCAAGTCA
851 GAGGTGGCGA AACCCGACAG GACTATAAAG ATACCAGGCG TTTCCCCCTG
5 901 GAAGCTCCCT CGTGCGCTCT CCTGTTCCGA CCCTGCCGCT TACCGGATAC
951 CTGTCCGCCT TTCTCCCTTC GGAAGCGTG GCGCTTTCTC ATAGCTCACG
1001 CTGTAGGTAT CTCAGTTCGG TGTAGGTCGT TCGCTCCAAG CTGGGCTGTG
1051 TGCACGAACC CCCCGTTCAG CCCGACCGCT GCGCCTTATC CGGTA ACTAT
1101 CGTCTTGAGT CCAACCCGGT AAGACACGAC TTATCGCCAC TGGCAGCAGC
10 1151 CACTGGTAAC AGGATTAGCA GAGCGAGGTA TGTAGGCGGT GCTACAGAGT
1201 TCTTGAAGTG GTGGCCTAAC TACGGCTACA CTAGAAGGAC AGTATTTGGT
1251 ATCTGCGCTC TGCTGAAGCC AGTTACCTTC GGAAAAAGAG TTGGTAGCTC
1301 TTGATCCGGC AAACAAACCA CCGCTGGTAG CGGTGGTTTT TTTGTTTGCA
1351 AGCAGCAGAT TACGCGCAGA AAAAAAGGAT CTCAAGAAGA TCCTTTGATC
15 1401 TTTTCTACGG GGTCTGACGC TCAGTGGAAC GAAAACTCAC GTTAAGGGAT
1451 TTTGGTCATG AGATTATCAA AAAGGATCTT CACCTAGATC CTTTTAAATT
1501 AAAAATGAAG TTTTAAATCA ATCTAAAGTA TATATGAGTA AACTTGGTCT
1551 GACAGTTACC AATGCTTAAT CAGTGAGGCA CCTATCTCAG CGATCTGTCT
1601 ATTTTCGTTCA TCCATAGTTG CCTGACTCCC CGTCGTGTAG ATAACTACGA
20 1651 TACGGGAGGG CTTACCATCT GGCCCCAGTG CTGCAATGAT ACCGCGAGAC
1701 CCACGCTCAC CGGCTCCAGA TTTATCAGCA ATAAACCAGC CAGCCGGAAG
1751 GGCCGAGCGC AGAAGTGGTC CTGCAACTTT ATCCGCCTCC ATCCAGTCTA
1801 TTAATTGTTG CCGGGAAGCT AGAGTAAGTA GTTCGCCAGT TAATAGTTTG
1851 CGCAACGTTG TTGCCATTGC TGCAGGCATC GTGGTGTCAC GCTCGTCGTT

129
128

1901 TGGTATGGCT TCATTCAGCT CCGGTTCCCA ACGATCAAGG CGAGTTACAT
1951 GATCCCCCAT GTTGTGCAAA AAAGCGGTTA GCTCCTTCGG TCCTCCGATC
2001 GTTGTGAGAA GTAAGTTGGC CGCAGTGTTA TCACTCATGG TTATGGCAGC
2051 ACTGCATAAT TCTCTTACTG TCATGCCATC CGTAAGATGC TTTTCTGTGA
5 2101 CTGGTGAGTA CTCAACCAAG TCATTCTGAG AATAGTGTAT GCGGCGACCG
2151 AGTTGCTCTT GCCCGGCGTC AACACGGGAT AATACCGCGC CACATAGCAG
2201 AACTTTAAAA GTGCTCATCA TTGGAAAACG TTCTTCGGGG CGAAAACCTCT
2251 CAAGGATCTT ACCGCTGTTG AGATCCAGTT CGATGTAACC CACTCGTGCA
2301 CCCAACTGAT CTTCAGCATC TTTTACTTTC ACCAGCGTTT CTGGGTGAGC
10 2351 AAAAACAGGA AGGCAAAATG CCGCAAAAAA GGAATAAGG GCGACACGGA
2401 AATGTTGAAT ACTCATACTC TTCCTTTTTT AATATTATTG AAGCATTTAT
2451 CAGGGTTATT GTCTCATGAG CGGATACATA TTTGAATGTA TTTAGAAAAA
2501 TAAACAAATA GGGGTTCCGC GCACATTTCC CCGAAAAGTG CCACCTGACG
2551 TCTAAGAAAC CATTATTATC ATGACATTAA CCTATAAAAA TAGGCGTATC
15 2601 ACGAGGCCCT TTCGTCTTCA AGAATTCAGC TTGGCTGCAG TGAATAATAA
2651 AATGTGTGTT TGTCCGAAAT ACGCGTTTTG AGATTTCTGT CGCCGACTAA
2701 ATTCATGTCG CGCGATAGTG GTGTTTATCG CCGATAGAGA TGGCGATATT
2751 GGAAAAATCG ATATTTGAAA ATATGGCATA TTGAAAATGT CGCCGATGTG
2801 AGTTTCTGTG TAACTGATAT CGCCATTTTT CCAAAGTGA TTTTGGGCA
20 2851 TACGCGATAT CTGGCGATAG CGCTTATATC GTTTACGGGG GATGGCGATA
2901 GACGACTTTG GTGACTTGGG CGATTCTGTG TGTCGCAAAT ATCGCAGTTT
2951 CGATATAGGT GACAGACGAT ATGAGGCTAT ATCGCCGATA GAGGCGACAT
3001 CAAGCTGGCA CATGGCCAAT GCATATCGAT CTATACATTG AATCAATATT
3051 GGCCATTAGC CATATTATTC ATTGGTTATA TAGCATAAAT CAATATTGGC

120
129

3101 TATTGGCCAT TGCATACGTT GTATCCATAT CATAATATGT ACATTTATAT
3151 TGGCTCATGT CCAACATTAC CGCCATGTTG ACATTGATTA TTGACTAGTT
3201 ATTAATAGTA ATCAATTACG GGGTCATTAG TTCATAGCCC ATATATGGAG
3251 TTCCGCGTTA CATAACTTAC GGTAAATGGC CCGCCTGGCT GACCGCCCAA
5 3301 CGACCCCCGC CCATTGACGT CAATAATGAC GTATGTTCCC ATAGTAACGC
3351 CAATAGGGAC TTTCCATTGA CGTCAATGGG TGGAGTATTT ACGGTAAACT
3401 GCCCACTTGG CAGTACATCA AGTGTATCAT ATGCCAAGTA CGCCCCCTAT
3451 TGACGTCAAT GACGGTAAAT GGCCCGCCTG GCATTATGCC CAGTACATGA
3501 CCTTATGGGA CTTTCCTACT TGGCAGTACA TCTACGTATT AGTCATCGCT
10 3551 ATTACCATGG TGATGCGGTT TTGGCAGTAC ATCAATGGGC GTGGATAGCG
3601 GTTTGACTCA CGGGGATTTC CAAGTCTCCA CCCCATTGAC GTCAATGGGA
3651 GTTTGTTTTG GCACCAAAT CAACGGGACT TTCCAAAATG TCGTAACAAC
3701 TCCGCCCCAT TGACGCAAAT GGGCGGTAGG CGTGTACGGT GGGAGGTCTA
3751 TATAAGCAGA GCTCGTTTAG TGAACCGTCA GATCGCCTGG AGACGCCATC
15 3801 CACGCTGTTT TGACCTCCAT AGAAGACACC GGGACCGATC CAGCCTCCGC
3851 AAGCTTGCCG CCACCATGGA GACCCCCGCC CAGCTGCTGT TCCTGCTGCT
3901 GCTGTGGCTG CCCGACACCA CCGGCGACAT TCTGCTGACC CAGTCTCCAG
3951 CCACCCTGTC TCTGAGTCCA GGAGAAAGAG CCACTTTCTC CTGCAGGGCC
4001 AGTCAGAACA TTGGCACAAG CATAAGTGG TATCAACAAA AAACAAATGG
20 4051 TGCTCCAAGG CTTCTCATAA GGTCTTCTTC TGAGTCTATC TCTGGGATCC
4101 CTTCCAGGTT TAGTGGCAGT GGATCAGGGA CAGATTTTAC TCTTACCATC
4151 AGCAGTCTGG AGCCTGAAGA TTTTGCAGTG TATTACTGTC AACAAAGTAA
4201 TACCTGGCCA TTCACGTTTC GCCAGGGGAC CAAGCTGGAG ATCAAACGTG
4251 AGTATTCTAG AAAGATCCTA GAATTCTAAA CTCTGAGGGG GTCGGATGAC

121
190

4301 GTGGCCATTC TTTGCCTAAA GCATTGAGTT TACTGCAAGG TCAGAAAAGC
4351 ATGCAAAGCC CTCAGAATGG CTGCAAAGAG CTCCAACAAA ACAATTTAGA
4401 ACTTTATTAA GGAATAGGGG GAAGCTAGGA AGAAACTCAA AACATCAAGA
4451 TTTTAAATAC GCTTCTTGGT CTCCTTGCTA TAATTATCTG GGATAAGCAT
5 4501 GCTGTTTTCT GTCTGTCCCT AACATGCCCT GTGATTATCC GCAAACAACA
4551 CACCCAAGGG CAGAACTTTG TTA CTTAAAC ACCATCCTGT TTGCTTCTTT
4601 CCTCAGGAAC TGTGGCTGCA CCATCTGTCT TCATCTTCCC GCCATCTGAT
4651 GAGCAGTTGA AATCTGGAAC TGCCTCTGTT GTGTGCCTGC TGAATAACTT
4701 CTATCCCAGA GAGGCCAAAG TACAGTGGAA GGTGGATAAC GCCCTCCAAT
10 4751 CGGGTAACTC CCAGGAGAGT GTCACAGAGC AGGACAGCAA GGACAGCACC
4801 TACAGCCTCA GCAGCACCCT GACGCTGAGC AAAGCAGACT ACGAGAAACA
4851 CAAAGTCTAC GCCTGCGAAG TCACCCATCA GGGCCTGAGC TCGCCCGTCA
4901 CAAAGAGCTT CAACAGGGGA GAGTGTTAGA GGGAGAAGTG CCCCCACCTG
4951 CTCCTCAGTT CCAGCCTGAC CCCCTCCCAT CCTTTGGCCT CTGACCCTTT
15 5001 TTCCACAGGG GACCTACCCC TATTGCGGTC CTCCAGCTCA TCTTTCACCT
5051 CACCCCCCTC CTCCTCCTTG GCTTTAATTA TGCTAATGTT GGAGGAGAAT
5101 GAATAAATAA AGTGAATCTT TGCACCTGTG GTTTCTCTCT TTCCTCATTT
5151 AATAATTATT ATCTGTTGTT TACCAACTAC TCAATTTCTC TTATAAGGGA
5201 CTAAATATGT AGTCATCCTA AGGCGCATAA CCATTTATAA AAATCATCCT
20 5251 TCATTCTATT TTACCCTATC ATCCTCTGCA AGACAGTCCT CCCTCAAACC
5301 CACAAGCCTT CTGTCCTCAC AGTCCCCTGG GCCATGGTAG GAGAGACTTG
5351 CTCCTTGTT TTCCCCTCCT CAGCAAGCCC TCATAGTCCT TTTTAAGGGT
5401 GACAGGTCTT ACAGTCATAT ATCCTTTGAT TCAATTCCTT GAGAATCAAC
5451 CAAAGCAAAT TTTTCAAAG AAGAAACCTG CTATAAAGAG AATCATTCAT

5501 TGCAACATGA TATAAAATAA CAACACAATA AAAGCAATTA AATAAACAAA
5551 CAATAGGGAA ATGTTTAAGT TCATCATGGT ACTTAGACTT AATGGAATGT
5601 CATGCCTTAT TTACATTTTT AAACAGGTAC TGAGGGACTC CTGTCTGCCA
5651 AGGGCCGTAT TGAGTACTTT CCACAACCTA ATTTAATCCA CACTATACTG
5 5701 TGAGATTAAA AACATTCATT AAAATGTTGC AAAGGTTCTA TAAAGCTGAG
5751 AGACAAATAT ATTCTATAAC TCAGCAATCC CACTTCTAGA TGACTGAGTG
5801 TCCCCACCCA CCAAAAAACT ATGCAAGAAT GTTCAAAGCA GCTTTATTTA
5851 CAAAAGCCAA AAATTGGAAA TAGCCCGATT GTCCAACAAT AGAATGAGTT
5901 ATTAAACTGT GGTATGTTTA TACATTAGAA TACCCAATGA GGAGAATTAA
10 5951 CAAGCTACAA CTATACCTAC TCACACAGAT GAATCTCATA AAAATAATGT
6001 TACATAAGAG AACTCAATG CAAAAGATAT GTTCTGTATG TTTTCATCCA
6051 TATAAAGTTC AAAACCAGGT AAAAATAAAG TTAGAAATTT GGATGGAAAT
6101 TACTCTTAGC TGGGGGTGGG CGAGTTAGTG CCTGGGAGAA GACAAGAAGG
6151 GGCTTCTGGG GTCTTGGTAA TGTTCGTGTC CTCGTGTGGG GTTGTGCAGT
15 6201 TATGATCTGT GCACTGTTCT GTATACACAT TATGCTTCAA AATAACTTCA
6251 CATAAAGAAC ATCTTATACC CAGTTAATAG ATAGAAGAGG AATAAGTAAT
6301 AGGTCAAGAC CACGCAGCTG GTAAGTGGGG GGGCCTGGGA TCAAATAGCT
6351 ACCTGCCTAA TCCTGCCCTC TTGAGCCCTG AATGAGTCTG CCTTCCAGGG
6401 CTCAAGGTGC TCAACAAAAC AACAGGCCTG CTATTTTCCT GGCATCTGTG
20 6451 CCCTGTTTGG CTAGCTAGGA GCACACATAC ATAGAAATTA AATGAAACAG
6501 ACCTTCAGCA AGGGGACAGA GGACAGAATT AACCTTGCCC AGACACTGGA
6551 AACCCATGTA TGAACACTCA CATGTTTGGG AAGGGGGAAG GGCACATGTA
6601 AATGAGGACT CTTCTCATT CTATGGGGCA CTCTGGCCCT GCCCTCTCA
6651 GCTACTCATC CATCCAACAC ACCTTTCTAA GTACCTCTCT CTGCCTACAC

123
132

6701 TCTGAAGGGG TTCAGGAGTA ACTAACACAG CATCCCTTCC CTCAAATGAC
6751 TGACAATCCC TTTGTCCTGC TTTGTTTTTC TTTCCAGTCA GTACTGGGAA
6801 AGTGGGGAAG GACAGTCATG GAGAACTAC ATAAGGAAGC ACCTTGCCCT
6851 TCTGCCTCTT GAGAATGTTG ATGAGTATCA AATCTTTCAA ACTTTGGAGG
5 6901 TTTGAGTAGG GGTGAGACTC AGTAATGTCC CTTCCAATGA CATGAACTTG
6951 CTCACTCATC CCTGGGGGCC AAATTGAACA ATCAAAGGCA GGCATAATCC
7001 AGCTATGAAT TCTAGGATCG ATCCAGACAT GATAAGATAC ATTGATGAGT
7051 TTGGACAAAC CACAAC TAGA ATGCAGTGAA AAAAATGCTT TATTTGTGAA
7101 ATTTGTGATG CTATTGCTTT ATTTGTAACC ATTATAAGCT GCAATAAACA
10 7151 AGTTAACAAC AACAATTGCA TTCATTTTAT GTTTCAGGTT CAGGGGGAGG
7201 TGTGGGAGGT TTTTAAAGC AAGTAAACC TCTACAAATG TGGTATGGCT
7251 GATTATGATC TCTAGTCAAG GCACTATACA TCAAATATTC CTTATTAACC
7301 CCTTTACAAA TTAAAAAGCT AAAGGTACAC AATTTTGTAG CATAGTTATT
7351 AATAGCAGAC ACTCTATGCC TGTGTGGAGT AAGAAAAAAC AGTATGTTAT
15 7401 GATTATAACT GTTATGCCTA CTTATAAAGG TTACAGAATA TTTTCCATA
7451 ATTTTCTTGT ATAGCAGTGC AGCTTTTTCC TTTGTGGTGT AAATAGCAAA
7501 GCAAGCAAGA GTTCTATTAC TAAACACAGC ATGACTCAAA AAACCTAGCA
7551 ATTCTGAAGG AAAGTCCTTG GGGTCTTCTA CCTTTCTCTT CTTTTTTGGA
7601 GGAGTAGAAT GTTGAGAGTC AGCAGTAGCC TCATCATCAC TAGATGGCAT
20 7651 TTCTTCTGAG CAAACAGGT TTCCTCATT AAAGGCATTC CACCACTGCT
7701 CCCATTCATC AGTTCCATAG GTTGGAATCT AAAATACACA AACAATTAGA
7751 ATCAGTAGTT TAACACATTA TACACTTAAA AATTTTATAT TTACCTTAGA
7801 GCTTTAAATC TCTGTAGGTA GTTTGTCCAA TTATGTCACA CCACAGAAGT
7851 AAGGTTCCCTT CACAAAGATC CGGGACCAAA GCGGCCATCG TGCCTCCCCA

134
133

7901 CTCCTGCAGT TCGGGGGCAT GGATGCGCGG ATAGCCGCTG CTGGTTTCCT
7951 GGATGCCGAC GGATTTGCAC TGCCGGTAGA ACTCCGCGAG GTCGTCCAGC
8001 CTCAGGCAGC AGCTGAACCA ACTCGCGAGG GGATCGAGCC CGGGGTGGGC
8051 GAAGAACTCC AGCATGAGAT CCCC GCGCTG GAGGATCATC CAGCCGGCGT
5 8101 CCCGAAAAC GATTCCGAAG CCCAACCTTT CATAGAAGGC GGCGGTGGAA
8151 TCGAAATCTC GTGATGGCAG GTTGGGCGTC GCTTGGTCGG TCATTTTCGAA
8201 CCCAGAGTC CCGCTCAGAA GAACTCGTCA AGAAGGCGAT AGAAGGCGAT
8251 GCGCTGCGAA TCGGGAGCGG CGATACCGTA AAGCACGAGG AAGCGGTCAG
8301 CCCATTCGCC GCCAAGCTCT TCAGCAATAT CACGGGTAGC CAACGCTATG
10 8351 TCCTGATAGC GGTCCGCCAC ACCCAGCCGG CCACAGTCGA TGAATCCAGA
8401 AAAGCGGCCA TTTTCCACCA TGATATTCGG CAAGCAGGCA TCGCCATGGG
8451 TCACGACGAG ATCCTCGCCG TCGGGCATGC GCGCCTTGAG CCTGGCGAAC
8501 AGTTCGGCTG GCGCGAGCCC CTGATGCTCT TCGTCCAGAT CATCCTGATC
8551 GACAAGACCG GCTTCCATCC GAGTACGTGC TCGCTCGATG CGATGTTTCG
15 8601 CTTGGTGGTC GAATGGGCAG GTAGCCGGAT CAAGCGTATG CAGCCGCCGC
8651 ATTGCATCAG CCATGATGGA TACTTTCTCG GCAGGAGCAA GGTGAGATGA
8701 CAGGAGATCC TGCCCCGGCA CTTGCCCCAA TAGCAGCCAG TCCCTTCCCG
8751 CTTCAGTGAC AACGTCGAGC ACAGCTGCGC AAGGAACGCC CGTCGTGGCC
8801 AGCCACGATA GCCGCGCTGC CTCGTCCTGC AGTTCATTCA GGCACCGGA
20 8851 CAGGTCGGTC TTGACAAAAA GAACCGGGCG CCCCTGCGCT GACAGCCGGA
8901 ACACGGCGGC ATCAGAGCAG CCGATTGTCT GTTGTGCCCA GTCATAGCCG
8951 AATAGCCTCT CCACCCAAGC GGCCGGAGAA CCTGCGTGCA ATCCATCTTG
9001 TTCAATCATG CGAAACGATC CTCATCCTGT CTCTTGATCA GATCTTGATC
9051 CCCTGCGCCA TCAGATCCTT GGCGGCAAGA AAGCCATCCA GTTTACTTTG

135
134

9101 CAGGGCTTCC CAACCTTACC AGAGGGCGCC CCAGCTGGCA ATTCCGGTTC
9151 GCTTGCTGTC CATAAAACCG CCCAGTCTAG CTATCGCCAT GTAAGCCCAC
9201 TGCAAGCTAC CTGCTTTCTC TTTGCGCTTG CGTTTTCCCT TGTCCAGATA
9251 GCCCAGTAGC TGACATTCAT CCGGGGTCAG CACCGTTTCT GCGGACTGGC
5 9301 TTTCTACGTG TTCCGCTTCC TTTAGCAGCC CTTGCGCCCT GAGTGCTTGC
9351 GGCAGCGTGA AG

SEC ID NO:31:

Parte de la secuencia de aminoácido de cadena pesada
10 **humanizada designada VHE-N73D**
EVQLVESGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYIIHWVKQE PGQGLEWIGY
ENPYNHGTKY NEKFKGRATL TADKSISTAY MELSSLRSED TAVYYCARSG
PYAWFDTWGQ GTTVTVSS

15 **SEC ID NO:32:**

Parte de la secuencia de aminoácido de cadena pesada
humanizada designada VHQ-N73D
QVQLVESGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYIIHWVKQE PGQGLEWIGY ENPYNHGTKY
NEKFKGRATL TADKSISTAY MELSSLRSED TAVYYCARSG PYAWFDTWGQ GTTVTVSS
20

SEC ID NO:33:

Secuencia de nucleótido que codifica la secuencia de aminoácido
SEC ID NO: 8
GACATTCTGCTGACCCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTCTGAGTCCAGGAGAAAGAGCCA
25 CTCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAACATTGGCACAAGCATACAGTGGTATCAACAAAAA

135

CCAGGTCAGGCTCCAAGGCTTCTCATAAGGTCTTCTTCTGAGTCTATCTCTGGGATCCC
TTCCAGGTTTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACTCTTACCATCAGCAGTCTGG
AGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAACAAAGTAATACCTGGCCATTACAGTTC
GGCCAGGGGACCAAGCTTGAAATCAAA

5

SEC ID NO:34:

Secuencia de nucleótido que codifica la secuencia de aminoácido

SEC ID NO: 31

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCAGGAGCCGAAGTGAAAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAG
10 GTGTCCTGCAAGGCCTCTGGATACACATTCACTAATTATATTATCCACTGGGTGAAGCA
GGAGCCTGGTCAGGGCCTTGAATGGATTGGATATTTTAATCCTTACAATCATGGTACTA
AGTACAATGAGAAGTTCAAAGGCAGGGCCACACTAACTGCAGACAAATCCATCAGCACA
GCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGCGCTCTGAGGACACTGCGGTCTACTACTGTGCAA
GATCAGGACCCTATGCCTGGTTTGACACCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTC
15 CTCA

SEC ID NO:35

Secuencia de nucleótido que codifica la secuencia de aminoácido

SEC ID NO: 32

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCAGGAGCCGAAGTGAAAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAG
20 GTGTCCTGCAAGGCCTCTGGATACACATTCACTAATTATATTATCCACTGGGTGAAGCA
GGAGCCTGGTCAGGGCCTTGAATGGATTGGATATTTTAATCCTTACAATCATGGTACTA
AGTACAATGAGAAGTTCAAAGGCAGGGCCACACTAACTGCAGACAAATCCATCAGCACA
GCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGCGCTCTGAGGACACTGCGGTCTACTACTGTGCAA
25 GATCAGGACCCTATGCCTGGTTTGACACCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTC
CTCA

127
196**SEC ID No 36****Secuencia de nucleótido del vector de expresión LCVLISp20**

1 CTAGAGTCCT AGAGAGGTCT GGTGGAGCCT GCAAAAGTCC AGCTTTCAAA
 5 51 GGAACACAGA AGTATGTGTA TGGAATATTA GAAGATGTTG CTTTACTCT
 101 TAAGTTGGTT CCTAGGAAAA ATAGTTAAAT ACTGTGACTT TAAAATGTGA
 151 GAGGGTTTTTC AAGTACTCAT TTTTTTAAAT GTCCAAAATT TTTGTCAATC
 201 AATTTGAGGT CTTGTTTGTG TAGAACTGAC ATTACTTAAA GTTTAACCGA
 251 GGAATGGGAG TGAGGCTCTC TCATACCCTA TTCAGAACTG ACTTTTAACA
 10 301 ATAATAAATT AAGTTTAAAA TATTTTAAA TGAATTGAGC AATGTTGAGT
 351 TGGAGTCAAG ATGGCCGATC AGAACCAGAA CACCTGCAGC AGCTGGCAGG
 401 AAGCAGGTCA TGTGGCAAGG CTATTTGGGG AAGGGAAAAT AAAACCACTA
 451 GGTAAACTTG TAGCTGTGGT TTGAAGAAGT GGTTTGGAAA CACTCTGTCC
 501 AGCCCCACCA AACCGAAAGT CCAGGCTGAG CAAAACACCA CCTGGGTAAT
 15 551 TTGCATTTCT AAAATAAGTT GAGGATTCAG CCGAACTGG AGAGGTCCTC
 601 TTTTAACTTA TTGAGTTCAA CCTTTTAATT TTAGCTTGAG TAGTTCTAGT
 651 TTCCCCAAAC TTAAGTTTAT CGACTTCTAA AATGTATTTA GAACTCATTT
 701 TCAAAATTAG GTTATGTAAG AAATTGAAGG ACTTTAGTGT CTTTAATTTT
 751 TAATATATTT AGAAAACCTC TTAAAATTAC TCTATTATTC TTCCCTCTGA
 20 801 TTATTGGTCT CCATTCAATT CTTTTCCAAT ACCCGAAGCA TTTACAGTGA
 851 CTTTGTTTCAT GATCTTTTTT AGTTGTTTGT TTTGCCTTAC TATTAAGACT
 901 TTGACATTCT GGTCAAAACG GCTTCACAAA TCTTTTTTCAA GACCACTTTC
 951 TGAGTATTCA TTTTAGGAGA AATACTTTTT TTTTAAATGA ATGCAATTAT
 1001 CTAGGACCTG CAGGCATGCT GTTTTCTGTC TGTCCCTAAC ATGCCCTGTG

128
(38)

1051 ATTATCCGCA AACAAACACAC CCAAGGGCAG AACTTTGTTA CTTAAACACC
1101 ATCCTGTTTG CTTCTTTCCT CAGGAACTGT GGCTGCACCA TCTGTCTTCA
1151 TCTTCCCGCC ATCTGATGAG CAGTTGAAAT CTGGAACTGC CTCTGTTGTG
1201 TGCCTGCTGA ATAACCTTCTA TCCCAGAGAG GCCAAAGTAC AGTGGAAGGT
5 1251 GGATAACGCC CTCCAATCGG GTAACCTCCA GGAGAGTGTC ACAGAGCAGG
1301 ACAGCAAGGA CAGCACCTAC AGCCTCAGCA GCACCCTGAC GCTGAGCAAA
1351 GCAGACTACG AGAAACACAA AGTCTACGCC TCGGAAGTCA CCCATCAGGG
1401 CCTGAGCTCG CCCGTCACAA AGAGCTTCAA CAGGGGAGAG TGTTAGAGGG
1451 AGAAGTGCCC CCACCTGCTC CTCAGTTCCA GCCTGACCCC CTCCCATCCT
10 1501 TTGGCCTCTG ACCCTTTTTTC CACAGGGGAC CTACCCCTAT TGCGGTCCTC
1551 CAGCTCATCT TTCACCTCAC CCCCTCCTC CTCCTTGGCT TTAATTATGC
1601 TAATGTTGGA GGAGAATGAA TAAATAAAGT GAATCTTTGC ACCTGTGGTT
1651 TCTCTCTTTC CTCATTTAAT AATTATTATC TGTTGTTTTA CCAACTACTC
1701 AATTTCTCTT ATAAGGGACT AAATATGTAG TCATCCTAAG GCGGGATATC
15 1751 GAGATCTGAA GCTGATCCAG ACATGATAAG ATACATTGAT GAGTTTGGAC
1801 AAACCACAAC TAGAATGCAG TGAAAAAAT GCTTTATTTG TGAAATTTGT
1851 GATGCTATTG CTTTATTTGT AACCATTATA AGCTGCAATA AACAAGTTAA
1901 CAACAACAAT TGCATTCATT TTATGTTTCA GGTTTCAGGGG GAGGTGTGGG
1951 AGGTTTTTTA AAGCAAGTAA AACCTCTACA AATGTGGTAT GGCTGATTAT
20 2001 GATCTCTAGT CAAGGCACTA TACATCAAAT ATTCCTTATT AACCCCTTTA
2051 CAAATTAAAA AGCTAAAGGT ACACAATTTT TGAGCATAGT TATTAATAGC
2101 AGACACTCTA TGCCTGTGTG GAGTAAGAAA AAACAGTATG TTATGATTAT
2151 AACTGTTATG CCTACTTATA AAGGTTACAG AATATTTTTTC CATAATTTTC
2201 TTGTATAGCA GTGCAGCTTT TTCCTTTGTG GTGTAAATAG CAAAGCAAGC

2251 AAGAGTTCTA TTACTAAACA CAGCATGACT CAAAAAACTT AGCAATTCTG
2301 AAGGAAAGTC CTTGGGGTCT TCTACCTTTC TCTTCTTTTT TGGAGGAGTA
2351 GAATGTTGAG AGTCAGCAGT AGCCTCATCA TCACTAGATG GCATTTCTTC
2401 TGAGCAAAAC AGGTTTTCTT CATTAAAGGC ATTCCACCAC TGCTCCCATT
5 2451 CATCAGTTCC ATAGGTGGA ATCTAAAATA CACAAACAAT TAGAATCAGT
2501 AGTTTAACAC ATTATACACT TAAAAATTTT ATATTTACCT TAGAGCTTTA
2551 AATCTCTGTA GGTAGTTTGT CCAATTATGT CACACCACAG AAGTAAGGTT
2601 CCTTCACAAA GATCCGGACC AAAGCGGCCA TCGTGCCTCC CCACTCCTGC
2651 AGTTCGGGGG CATGGATGCG CGGATAGCCG CTGCTGGTTT CCTGGATGCC
10 2701 GACGGATTTG CACTGCCGGT AGAACTCCGC GAGGTCGTCC AGCCTCAGGC
2751 AGCAGCTGAA CCAACTCGCG AGGGGATCGA GCATCCCCCA TGGTCTTATA
2801 AAAATGCATA GCTTTAGGAG GGGAGCAGAG AACTTGAAAG CATCTTCCTG
2851 TTAGTCTTTC TTCTCGTAGA CTTCAAACCTT ATACTTGATG CCTTTTTCTT
2901 CCTGGACCTC AGAGAGGACG CCTGGGTATT CTGGGAGAAG TTTATATTTT
15 2951 CCCAAATCAA TTTCTGGGAA AAACGTGTCA CTTTCAAATT CCTGCATGAT
3001 CCTTGTCACA AAGAGTCTGA GGTGGCCTGG TTGATTCATG GCTTCCTGGT
3051 AAACAGAACT GCCTCCGACT ATCCAAACCA TGTCTACTTT ACTTGCCAAT
3101 TCCGGTTGTT CAATAAGTCT TAAGGCATCA TCCAAACTTT TGGCAAGAAA
3151 ATGAGCTCCT CGTGGTGGTT CTTTGAGTTC TCTACTGAGA ACTATATTAA
20 3201 TTCTGTCCTT TAAAGGTCGA TTCTTCTCAG GAATGGAGAA CCAGGTTTTT
3251 CTACCCATAA TCACCAGATT CTGTTTACCT TCCACTGAAG AGGTTGTGGT
3301 CATTCTTTGG AAGTACTTGA ACTCGTTCCT GAGCGGAGGC CAGGGTCGGT
3351 CTCCGTTCTT GCCAATCCCC ATATTTTGGG ACACGGCGAC GATGCAGTTC
3401 AATGGTCGAA CCATGATGGC AGCGGGGATA AAATCCTACC AGCCTTCACG

140
139

3451 CTAGGATTGC CGTCAAGTTT GGGGGTACCG AGCTCGAATT AGCTTTTTTGC
3501 AAAAGCCTAG GCCTCCAAAA AAGCCTCCTC ACTACTTCTG GAATAGCTCA
3551 GAGGGCCGAG GCGGCCTCGG CCTCTGCATA AATAAAAAAA ATTAGTCAGC
3601 CATGGGGCGG AGAATGGGCG GAACTGGGCG GAGTTAGGGG CGGGATGGGC
5 3651 GGAGTTAGGG GCGGGACTAT GGTGCTGAC TAATTGAGAT GCATGCTTTG
3701 CATACTTCTG CCTGCTGGGG AGCCTGGGGA CTTTCCACAC CTGGTTGCTG
3751 ACTAATTGAG ATGCATGCTT TGCATACTTC TGCCTGCTGG GGAGCCTGGG
3801 GACTTTCCAC ACCCTAACTG ACACACATTC CACAGCTGCC TCGCGCGTTT
3851 CGGTGATGAC GGTGAAAACC TCTGACACAT GCAGCTCCCG GAGACGGTCA
10 3901 CAGCTTGTCT GTAAGCGGAT GCCGGGAGCA GACAAGCCCG TCAGGGCGCG
3951 TCAGCGGGTG TTGGCGGGTG TCGGGGCGCA GCCATGACCC AGTCACGTAG
4001 CGATAGCGGA GTGTATACTG GCTTAACTAT GCGGCATCAG AGCAGATTGT
4051 ACTGAGAGTG CACCATATGC GGCCGCATAT GCGGTGTGAA ATACCGCACA
4101 GATGCGTAAG GAGAAAATAC CGCATCAGGC GCTCTTCCGC TTCCTCGCTC
15 4151 ACTGACTCGC TGCCTCGGT CGTTCGGCTG CGGCGAGCGG TATCAGCTCA
4201 CTCAAAGGCG GTAATACGGT TATCCACAGA ATCAGGGGAT AACGCAGGAA
4251 AGAACATGTG AGCAAAAGGC CAGCAAAAGG CCAGGAACCG TAAAAAGGCC
4301 GCGTTGCTGG CGTTTTTCCA TAGGCTCCGC CCCCTGACG AGCATCACAA
4351 AAATCGACGC TCAAGTCAGA GGTGGCGAAA CCCGACAGGA CTATAAAGAT
20 4401 ACCAGGCGTT TCCCCCTGGA AGCTCCCTCG TCGCTCTCC TGTTCGACC
4451 CTGCCGCTTA CCGGATACCT GTCCGCCTTT CTCCCTTCGG GAAGCGTGGC
4501 GCTTTCTCAT AGCTCACGCT GTAGGTATCT CAGTTCGGTG TAGGTCGTTC
4551 GCTCCAAGCT GGGCTGTGTG CACGAACCCC CCGTTCAGCC CGACCGCTGC
4601 GCCTTATCCG GTAACATATCG TCTTGAGTCC AACCCGGTAA GACACGACTT

141
140

4651 ATCGCCACTG GCAGCAGCCA CTGGTAACAG GATTAGCAGA GCGAGGTATG
4701 TAGGCGGTGC TACAGAGTTC TTGAAGTGGT GGCCTAACTA CGGCTACACT
4751 AGAAGGACAG TATTTGGTAT CTGCGCTCTG CTGAAGCCAG TTACCTTCGG
4801 AAAAAGAGTT GGTAGCTCTT GATCCGGCAA ACAAACCACC GCTGGTAGCG
5 4851 GTGGTTTTTT TGTTTGCAAG CAGCAGATTA CGCGCAGAAA AAAAGGATCT
4901 CAAGAAGATC CTTTGATCTT TTCTACGGGG TCTGACGCTC AGTGGAACGA
4951 AAATCACGT TAAGGGATTT TGGTCATGAG ATTATCAAAA AGGATCTTCA
5001 CCTAGATCCT TTAAATTAA AAATGAAGTT TTAAATCAAT CTAAAGTATA
5051 TATGAGTAAA CTTGGTCTGA CAGTTACCAA TGCTTAATCA GTGAGGCACC
10 5101 TATCTCAGCG ATCTGTCTAT TTCGTTTCATC CATAGTTGCC TGACTCCCCG
5151 TCGTGTAGAT AACTACGATA CGGGAGGGCT TACCATCTGG CCCCAGTGCT
5201 GCAATGATAC CGCGAGACCC ACGCTCACCG GCTCCAGATT TATCAGCAAT
5251 AAACCAGCCA GCCGGAAGGG CCGAGCGCAG AAGTGGTCCT GCAACTTTAT
5301 CCGCCTCCAT CCAGTCTATT AATTGTTGCC GGGAAGCTAG AGTAAGTAGT
15 5351 TCGCCAGTTA ATAGTTTGCG CAACGTTGTT GCCATTGCTG CAGGCATCGT
5401 GGTGTCACGC TCGTCGTTTG GTATGGCTTC ATTCAGCTCC GGTTCCCAAC
5451 GATCAAGGCG AGTTACATGA TCCCCATGT TGTGCAAAAA AGCGGTTAGC
5501 TCCTTCGGTC CTCCGATCGT TGTCAGAAGT AAGTTGGCCG CAGTGTTATC
5551 ACTCATGGTT ATGGCAGCAC TGCATAATTC TCTTACTGTC ATGCCATCCG
20 5601 TAAGATGCTT TTCTGTGACT GGTGAGTACT CAACCAAGTC ATTCTGAGAA
5651 TAGTGTATGC GGCGACCGAG TTGCTCTTGC CCGGCGTCAA CACGGGATAA
5701 TACCGCGCCA CATAGCAGAA CTTTAAAAGT GTCATCATT GGAAAACGTT
5751 CTTCGGGGCG AAAACTCTCA AGGATCTTAC CGCTGTTGAG ATCCAGTTTCG
5801 ATGTAACCCA CTCGTGCACC CAACTGATCT TCAGCATCTT TACTTTTCAC

142
141

5851 CAGCGTTTCT GGGTGAGCAA AAACAGGAAG GCAAAATGCC GCAAAAAGG
5901 GAATAAGGGC GACACGGAAA TGTGAATAC TCATACTCTT CCTTTTCAA
5951 TATTATTGAA GCATTTATCA GGGTTATTGT CTCATGAGCG GATACATATT
6001 TGAATGTATT TAGAAAAATA AACAAATAGG GGTTCCGCGC ACATTTCCCC
5 6051 GAAAAGTGCC ACCTGACGTC TAAGAAACCA TTATTATCAT GACATTAACC
6101 TATAAAAATA GGCGTATCAC GAGGCCCTTT CGTCTTCAAG AATTCAGCTG
6151 CTCGAGGAAG AGCTCAAACC CATGCTACTC TCTGGCTTGA TGAAGCAAC
6201 GCTTTCATAG CTGAGCTGTC ATAAATAATA AAGAGATTTT TTTATTAATA
6251 TTGAAAAGAT GGGTTATTTA TGTAAGACTC TGTCTTCATT TTAAAACCA
10 6301 CACCTTCCAG TAGTATTCTG TTA CTGTTCT GGCAATCACT GTGATCAAGA
6351 AGCTACACGG TGAGTTGTGC TTCTCAGTCC TAAGGGATAC ATCTACAAGA
6401 GGCTCCCATA CTCGAAGCTC AGGAAACATT GTAGAAAAGG AGGCAAAAGA
6451 CTGACAGAGC CAGAGGACCA AGAAATTTGT TGTGAGGTTG TGTCTCCTAC
6501 TAACAATATA AGCAATATCT ATAAATTGTT GATATCATGG CTACTAAAAT
15 6551 GTGAGTTGAA CGAGGAGGAC ACAAATGAAC ATGACAATCA GAATGAGGCC
6601 TCTCACCTGC AAAAAACACT ATAGAGAAGC AGATAAAGCT GTCAGCAGAA
6651 GAGGCGCACC TCCTTATAGA AGAAGCCTAC CAGGTTTGAT ATATCAGCCT
6701 TGAAAACCTA CATAGTATTT ACATTATATC GAGTCTATGA GACATATTTA
6751 GTAATGCATA TGTATGTGTG TGTGTGCATG TATGTGTGTA AATACATATG
20 6801 TTCATAGAAA AATGTGTAAA AAGAGATCAT GAATTTAAGA GAGAACTGGG
6851 ACAATTTTTT TCAGGGAGTT GTAATCAGGA AAGTTAAGGG AAAAATGTTG
6901 TAATTAAAAT TCAGGCTCAG AAACAAACAA AGGAAAAGAA AAAAAACAA
6951 CAACAACAAC AAAAAACAA AACAAAGGAG AAGCTGTATG GCCACAATAG
7001 CATCTACAGC TAACTGTGAA AGGATAATGG AACAAGTTAT GTACTGCCTA

7051 GAGCAGTATG ATGCCTAAAT CATCTCGACA TGGAGGAAAA TAGAACAAAG
7101 ACACTCTACA TAGACTATGA TAGAAATCAA AATAAGGTGT AAGACATAGA
7151 ACATTAGTTT TGTTTGTGTG TCAAAGAGAC TCACATTCCC ACAAAAAAAT
7201 CTGTGGGATT TTACAGGTCT GCAATAAGCT GCTGACCTGA TGATTTCTGC
5 7251 AGCTGTGCCT ACCCTTTGCT GATTTGCATG TACCCAAAGC ATAGCTTACT
7301 GACATGAGGA TTTCTTCATA GTCAGGTCAC ACCCTTTGCT GGAGTCAGAA
7351 TCACACTGAT CACACACAGT CATGAGTGTG CTCACTCAGG TCCTGGCGTT
7401 GCTGCTGCTG TGGCTTACAG GTAATGAAGA CAGCACTAGA ATTTTATTGA
7451 GCTTCCTGTA CACTGTGCTG CTTGTCTCTG TGAAAATTCT CTTGTGAATT
10 7501 AATCATGTGG GGATCTGTTT TCAATTTTTC AATTGTAGGT ACGCGTTGTG
7551 ACATTCTGCT GACCCAGTCT CCAGCCACCC TGTCTCTGAG TCCAGGAGAA
7601 AGAGCCACTC TCTCCTGCAG GGCCAGTCAG AACATTGGCA CAAGCATACA
7651 GTGGTATCAA CAAAACCAG GTCAGGCTCC AAGGCTTCTC ATAAGGTCTT
7701 CTTCTGAGTC TATCTCTGGG ATCCCTTCCA GGTTTAGTGG CAGTGGATCA
15 7751 GGGACAGATT TTACTCTTAC CATCAGCAGT CTGGAGCCTG AAGATTTTGC
7801 AGTGTATTAC TGTCAACAAA GTAATACCTG GCCATTACAG TTCGGCCAGG
7851 GGACCAAGCT TGAAATCAAA CGTAAGTAGA ATCCAAAGTC TCTTTCTTCC
7901 GTTGTCTATG TCTGTGGCTT CTATGTCTAA AAATGATGTA TAAAATCTTA
7951 CTCTGAAACC AGATTCTGGC ACTCTCCAAG GCAAAGATAC AGAGTAACTC
20 8001 CGTAAGCAAA GCTGGGAATA GGCTAGACAT GTTCTCTGGA GAATGAATGC
8051 CAGTGTAATA ATTAACACAA GTGATAGTTT CAGAAATGCT CTAGTT

SEC ID NO:37**Secuencia de nucleótido del vector de expresión
HCVHEN73DSp20**

5 1 ctagagaggt ctggtggagc ctgcaaaagt ccagctttca aaggaaacaca gaagtatgtg
 61 tatggaatat tagaagatgt tgcttttact cttaagttgg ttcctaggaa aaatagttaa
 121 atactgtgac tttaaaatgt gagaggggtt tcaagtactc atttttttaa atgtocaaaa
 181 tttttgtcaa tcaatttgag gtcttggttg tgtagaactg acattactta aagtttaacc
 241 gaggaatggg agtgaggctc tctcataccc tattcagaac tgacttttaa caataataaa
 10 301 ttaagtttaa aatattttta aatgaattga gcaatgttga gttggagtca agatggccga
 361 tcagaaccag aacacctgca gcagctggca ggaagcaggt catgtggcaa ggctatttgg
 421 ggaagggaaa ataaaaccac taggtaaact tgtagctgtg gtttgaagaa gtggttttga
 481 aacactctgt ccagccccac caaacgaaa gtccaggctg agcaaaacac cacctgggta
 541 atttgcatth caataataag ttgaggattc agccgaaact ggagaggtcc tcttttaact
 15 601 tattgagttc aaccttttaa ttttagcttg agtagttcta gtttcccaa acttaagttt
 661 atcgacttct aaaatgtatt taagctttct ggggcaggcc aggcctgacc ttggctttgg
 721 ggcagggagg gggctaaggt gaggcaggtg gcgccagcca ggggcacagc caatgcccat
 781 gagcccagac actggacgct gaacctcgcg gacagttaag aaccagggg cctctgcgcc
 841 ctgggcccag ctctgtcca caccgggtc acatggcacc acctctcttg cagctccac
 20 901 caagggcca tgggtcttc cctggcacc ctctccaag agcaactctg ggggcacagc
 961 ggccctgggc tgctgttca aggactactt cccgaaccg gtgacggtgt cgtggaactc
 1021 aggcgccttg accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc ctacagtct caggactcta
 1081 ctccctcagc agcgtggtga cgtgcctc cagcagcttg ggcacccaga cctacatctg
 1141 caacgtgaat cacaagcca gcaacaccaa ggggcacagg agagttggtg agaggccagc
 25 1201 acagggaggg aggtgtctg ctggaagcca ggctcagcg tctgcctgg acgcatcccg

145
144

1261 gctatgcagt ccaggtccag ggcagcaagg caggccccgt ctgcctcttc aoccgagggc
1321 ctctgtcccc ccactcatg ctcagggaga gggctctctg gctttttccc caggctctgg
1381 gcaggcacag gctaggtgcc cctaaccag gccctgcaca caagggccca ggccctgggc
1441 tcagacctgc caagagccat atccgggagg accctgcccc tgacctaaag ccacccaaa
5 1501 ggccaaactc tccactcoct cagcacgtac accttctctc ctocagatt ccagtaactc
1561 ccaatcttct ctctgcagag cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccacgtgcc
1621 caggtaagcc agcccaggcc tcgcccoca gctcaaggcg ggacaggtgc cctagagtag
1681 cctgcatcca gggacaggcc ccagccgggt gctgacacgt ccacctocat ctcttctca
1741 gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc ttctcttcc cccaaaacc caaggacacc
10 1801 ctcatgatct ccggacccc tgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac
1861 cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag
1921 ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtggtca ggtctctcac cgtctgcac
1981 caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaagggtct ccacgaagac ccccatccc
2041 cccatogaga aaaccatctc caaagccaaa ggtgggaccc gtggggtgag agggccacat
15 2101 ggacaggtgc cggctogggc caccctctgc cctgagagtg accgtgttac caacctctgt
2161 ccagcatgg cagccccgag aaccacaggt gtacacctg ccccatccc gggaggagat
2221 gaccaagaac caggtcagcc tgacctgct ggtcaaaggc ttctatcca ggcacatgc
2281 cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccaogc ctccgtgct
2341 ggactccgac ggctccttct tcctctatag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca
20 2401 gcaggggaac gtcttctcat gtcogtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacga
2461 gaagagctc tcctgtccc cgggtaaatg agtgcgacgg ccggcaagcc ccgctcccc
2521 gggctctcgc ggtgcacga ggatgcttg cacgtacccc gtctacatac ttcccaggca
2581 ccagcatgg aaataaagca ccaccactg ccctgggccc ctgcgagact gtgatggttc
2641 ttccacggg tcaggcogag tctgaggcct gagtggcatg agggaggcag agcgggtccc
25 2701 actgtcccca cactggcca ggctgtgcag gtgtgcctgg gcgcctagg gtggggtca

2761 gccaggggct gccctcggca ggggtggggga tttccacggg tggccctccc tccagcagca
 2821 gctgccctgg gctggggccac gaagagcctt agggccacat ggggacagac acacagcccc
 2881 tgctctgtga ggagactgtc ctgtcctgtg agcgccctgt cctccgaccc cgatgcccac
 2941 tcgggggcat gcctagtcca tgcgcgtagg gacaggccct ccctcaccca tctaccccca
 5 3001 cggcactaac ccctggggcc cctgcccagc ctgcaccccg catggggaca caaccgactc
 3061 cgggtaaatg cactctoggg ccctgtggag ggactggtgc agatggccac acacacactc
 3121 agcccaggcc cgttcaacaa accccgcact gaggttggtc gagcgggagt gcggccagag
 3181 cctgcctcgg ccgtcagggg ggactcccg gctcactoga aggaggtgcc accatttcag
 3241 ctttggtagc ttttcttctt cttttaaat tttctaaagt cattaattgt ctttgatgtt
 10 3301 tcttttgtga tgacaataaa atatcctttt taagtcttgt acttcgtgat gggagccgcc
 3361 ttctgtgtc caogcgctc ctgcccccg tgggaagcac ggtcaggagg aggctggtcc
 3421 agctgcacct cgggggctcc ctgcactgc caogcgctc ctgcagccac acgcattgcc
 3481 cgagcgaccc tccctggccc ctgtcactac atggacccct ggggcttctc ctcttttcta
 3541 catggatgca gtttctctc ctgctgggca cggctgctgc tgcctggtc actctgcggg
 15 3601 ggacagggcc tccagggaaa gctgggtoga ggctgggagc tggctcaggc ttcccaggca
 3661 gagccacagg gagggccttc cagaaccaac catggtccga agcgagaggt ggggtgtcaga
 3721 tccagacatg ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc acaactagaa tgcagtgaag
 3781 aaaatgcttt atttgtgaaa tttgtgatgc tattgcttta ttttaaagca ttataagctg
 3841 caataaaca gttaacaaca acaattgcat tcattttatg tttcagggtc agggggaggt
 20 3901 gtgggaggtt ttttaaagca agtaaacct ctacaaatgt ggtatggctg attatgatct
 3961 ctagtcaagg cactatacat caaatattcc ttattaaccc ctttacaat taaaaagcta
 4021 aaggtagaca atttttgagc atagttatta atagcagaca ctctatgcct gtgtggagta
 4081 agaaaaaaca gtatgttatg attataactg ttatgcctac ttataaaggt tacagaatat
 4141 ttttcataa ttttttgaa tagcagtga gcttttccct ttgtggtgta aatagcaaag
 25 4201 caagcaagag ttctattact aaacacagca tgactcaaaa aacttagcaa ttctgaagga

146
145

4261 aagtccttgg ggtcttctac ctttctcttc ttttttggag gagtagaatg ttgagagtca
 4321 gcagtagcct catcatcact agatggcatt tcttctgagc aaaacagggtt ttcttcatta
 4381 aaggcattcc accactgctc ccattcatca gttccatagg ttggaatcta aaatacacia
 4441 acaattagaa tcagtagttt aacacattat acacttaaaa attttatatt taccttagag
 5 4501 ctttaaactct ctgtaggtag tttgtccaat tatgtcacac cacagaagta aggttctctc
 4561 acaaagatcc ggaccaaagc ggccatcgtg cctccccact cctgcagttc gggggcatgg
 4621 atgcgcggat agcgcgtgct ggtttctctg atgcgcgacg attataactg ccggtagaac
 4681 tcgcgcaggt cgtccagcct caggcagcag ctgaaccaac tcgcgcgggg atgcgcgggc
 4741 ggggtgggcga agaactccag catgagatcc ccgcgcgtga ggatcatcca gcgcgcgtcc
 10 4801 cggaaaacga ttccgaagcc caacctttca tagaaggcgg cgggtggaatc gaaatctcgt
 4861 gatggcaggt tgggcgtcgc ttggtcgtgc atttcgaacc ccagagtccc gctcagaaga
 4921 actcgtcaag aaggcgatag aaggcgatgc gctgcgaatc gggagcggcg atacgtaaa
 4981 gcaogaggaa ggcgtcagcc cattcgccgc caagctcttc agcaatatca cgggtagcca
 5041 acgctatgtc ctgatagcgg tcgccacac ccagccggcc acagtcgatg aatccagaaa
 15 5101 agcggccatt ttccaccatg atattcgga agcaggcatc gccatgggtc aogaogagat
 5161 cctgcgcgtc gggcatgcgc gccttgagcc tggcgaacag ttgcgctggc gcgagccct
 5221 gatgctcttc gtccagatca tctgatcga caagaccggc ttccatccga gtacgtgctc
 5281 gctcgatgcg atgtttcgct tgggtgtcga atgggcaggt agccgatca agcgtatga
 5341 gcgcgcgat tgcatcagcc atgatggata ctttctcggc aggagcaagg tgagatgaca
 20 5401 ggagatcctg ccccggcact tcgcccaata gcagccagtc ccttcccgct tcagtgacaa
 5461 cgtcgagcac agctgcgcaa ggaacgcccg tcgtggccag ccacgatagc cgcgctgcct
 5521 cgtcctgcag ttcatcagg gcaccggaca ggtcgtctt gacaaaaaga accgggcgcc
 5581 cctgcgctga cagccggaac accgggcgat cagagcagcc gattgtctgt tgtgccagt
 5641 catagccgaa tagcctctcc acccaagcgg ccggagaacc tgctgcaat ccatcttgtt
 25 5701 caatcatgcg aaacgatcct catcctgtct cttgatcaga tcttgatccc ctgcgccatc

148
147

5761 agatccttgg cggcaagaaa gccatccagt ttactttgca gggcttccca accttaccag
 5821 agggcgcccc agctggcaat tccggttcgc ttgctgtcca taaaaccgcc cagtctagct
 5881 atogccatgt aagcccactg caagctacct gctttctctt tgcgcttgcg ttttcccttg
 5941 tccagatagc ccagtagctg acattcatcc ggggtcagca ccgtttctgc ggactggctt
 5 6001 tctacgtgtt ccgcttctct tagcagccct tgcgccctga gtgcttgogg cagcgtgaag
 6061 ctttttgcaa aagcctaggc ctccaaaaaa gcctcctcac tacttctgga atagctcaga
 6121 ggccgaggcg gcctcggcct ctgcataaat aaaaaaaatt agtcagccat gggcgggaga
 6181 atgggcgga ctgggaggag ttagggggcg gatgggagg gttagggggg ggactatggt
 6241 tgctgactaa ttgagatgca tgctttgcat acttctgcct gctggggagc ctggggactt
 10 6301 tccacacctg gttgctgact aattgagatg catgctttgc atacttctgc ctgctgggga
 6361 gcctggggac tttccacacc ctaactgaca cacattccac agctgcctcg ccggtttogg
 6421 tgatgacggt gaaaacctct gacacatgca gctcccgag acggtcacag cttgtctgta
 6481 agcggatgcc gggagcagac aagcccgta gggcgcgta gcgggtgttg gcgggtgtcg
 6541 gggcgagcc atgaccagt cacgtagoga tagcggagtg tatactggct taactatgog
 15 6601 gcatcagagc agattgtact gagagtgcac catatgcggt gtgaaatacc gcacagatgc
 6661 gtaaggagaa aataccgat caggcgctct tccgcttctt cgtcactga ctogctgcgc
 6721 tcggtcgttc ggctgoggcg agcggatca gctcactcaa aggcggtaat acggttatcc
 6781 acagaatcag gggataacgc aggaagaac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg
 6841 aaccgtaaaa aggcgcggtt gctggcggtt ttccataggc tccgcccccc tgacgagcat
 20 6901 cacaaaaatc gacgctcaag tcagaggtgg cgaaaccoga caggactata aagataccag
 6961 gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc cgacctgcc gcttaccgga
 7021 tacctgtcog cttttctccc ttogggaagc gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg
 7081 tatctcagtt cgggtgtagg cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcacga acccccggtt
 7141 cagcccgacc gctgcgctt atcggtaac tatcgtcttg agtccaacc ggtaagacac
 25 7201 gacttatcgc cactggcagc agccactggt aaagggaata gcagagcgag gtatgtaggc

7261 ggtgctacag agttcttgaa gtggtggcct aactacggct acactagaag gacagtattt
 7321 ggtatctgog ctctgctgaa gccagttacc ttcggaaaaa gagttggtag ctcttgatcc
 7381 ggagaaaaaa ccaccgctgg tagcgggtgt ttttttgttt gcaagcagca gattacgcgc
 7441 agaaaaaaag gatctcaaga agatcctttg atcttttcta cggggtctga cgctcagtgg
 5 7501 aacgaaaact caogttaagg gattttggtc atgagattat caaaaaggat cttcacctag
 7561 atccttttaa attaaaaatg aagttttaaa tcaatctaaa gtatatatga gtaaacttgg
 7621 tctgacagtt accaatgctt aatgattgag gcacctatct cagcgatctg tctatttcgt
 7681 tcatccatag ttgcctgact ccccgctgtg tagataacta cgatacggga gggcttacca
 7741 tctggcccca gtgctgcaat gataccgoga gaccacgct caccggctcc agatttatca
 10 7801 gcaataaacc agccagccgg aagggccgag cgcagaagtg gtccctgcaac tttatccgcc
 7861 tocatocagt ctattaattg ttgccgggaa gctagagtaa gtagttogcc agttaatagt
 7921 ttgcgcaacg ttgttgccat tgctgcaggc atcgtggtgt cacgctogtc gtttggtatg
 7981 gcttcattca gctccggttc ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc catgttgtgc
 8041 aaaaaagcgg ttagctcctt cggctcctcg atcgttgtca gaagtaagtt ggcgcagtg
 15 8101 ttatcactca tggttatggc agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga
 8161 tgcttttctg tgactggtga gtactcaacc aagtcattct ggaaatgttg tatgcggcga
 8221 ccgagttgct cttgcccggc gtcaacacgg gataataccg cgccacatag cagaacttta
 8281 aaagtgtca tcattggaaa acgttcttgc gggcgaaaac tctcaaggat cttaccgctg
 8341 ttgagatoca gttogatgta accactcgt gcaccaact gatcttcagc atcttttact
 20 8401 ttcaccagcg tttctgggtg agaaaaaaaa gtaaggagaa atgccgcaa aaaggggaata
 8461 agggcgacac ggaaatgttg aatactcata ctcttcttt ttcaatatta ttgaagcatt
 8521 tatcaggggtt attgtctcat gagcggatac atatttgaat gtatttagaa aaataaaca
 8581 ataggggttc cgcgcacatt tccccgaaa gtgccacctg acgtctaaga aaccattatt
 8641 atcatgacat taacctataa aaataggcgt atcacgaggc cctttcgtct tcaagaattc
 25 8701 gagctoggtc cccatcagcc aaaaagcatg cctgccacac aacatcaatt tctggaaaac

150
149

8761 gctacactta attatttcta gtagaacagc ttttttgttt gccaaaaaga atcacctata
8821 gtggcatcta agaaaaaaaa ggagaaaaaa atcacaaaga aatgattgag aggcataata
8881 aaaattatca aaaaattatg agttttacga ttttattttt ttccaagttg aaatcatagg
8941 gtggctttta cacagtgaca aggaatgtgc atgctgccat tatggtgctc tgcctaaaat
5 9001 gggtggagcc ttgtcatgct acagagaaac tgtcatacag caggggggtgc caaatttcca
9061 tattttttta tatcattgag caggtgcaca gaagaccaga aagcactttc tatcaggctg
9121 gccttctctt tcctttccag tatgaagcaa aaactgccaa tgaaactagc aattgttaaa
9181 ttcttttttc aaacagtatt tgtgctatca gaacatagtg cattcaaaag tctagcctga
9241 gagaacaacc cagttttatt cattctctct actacctctc tcattcccac tgtttgtgtt
10 9301 ctccctccca ttttaattgt ctatctagtc caaactaagc acacgatcca gtccacatta
9361 aacaacatgt ttttatttta agtcaaatac aagacacctt taatatcagc ccttgttcat
9421 aatogtgctt ctagtgactt aatgtacatg tcacactgta ctggtgggtt ttgtgtctca
9481 tcatgaacaa tgttgtgaag gtattaagtg gagagtaagc agaattagat tctctaatg
9541 atgcacccc aactaagag cagaaataat attaaaaata gaaaaaaaag ttttaattga
15 9601 gatttcaa at acccaggtat gagctgcagt ttcttcaagt taaagcatcg aggttgtcag
9661 ttacactatt acaggaaaca tatgcagagt ttttatttta gtatattagt tttcacatat
9721 ggggaattgc tattaacta tttttttttt tcaaatgctt accattgtaa atgagtttgt
9781 gacttttgtt aggtgagtgc acatgactct ggatgcctaa gaggactgaa gaagttggag
9841 ttataggtag ttttatttta ctgactgtt cagtgtctaaa aatacaactg aggtccttta
20 9901 aactgctgtt catgaacttc ttaattgata tatctcatga gatctctaaa ctatttttat
9961 tatgacacgt ttcaccattt tcaactgtaac gatttttatg ttttatatta atgtaactat
10021 atgacacttc caaaaatccc catattcaca attgaactgt ttcaaagttt taccttgact
10081 tatgggaaat gaaaaccac attttataat tttaaaatga aatgtttatt ttttattttt
10141 gcaaatttca caaggaaaga ttagtcaactg gtgtgtgaga gcagaggagc ataagagttc
25 10201 aggaatagaa tccattatga ttctggaggc aaggaagaac tgatgccaaag gtttcagtat

.,!

151
2
150

10261 aagagcagta tccactggaa aggataaagt cactacatct gagcacagag caggacatct
10321 acataatgag tggctactaa tgggccactg ttacactggt atatgtataa ggctcaagaa
10381 tgagcactga ggctgtaagg tgtatgggtg aggacatcag gatgtaaacc cagctcaggt
10441 agaggactca gaggacagca cagtcagcat gaactaataa acatcagata agataaggca
5 10501 caagctcagc tatatagggg aagggatctt tgtaaactctg attgtgcatc cagtctagtt
10561 caatgtgact taggaagccc agtcatatgc aaatctagag aagactttag agtagaaatc
10621 tgaggctcac ctacataacc agcaagcgag tgaccagtta gtattaagtc accacttctt
10681 agacatcatg gcttgggtgt ggaccttgcc attcctgatg gcagctgccc aaagtaagac
10741 attaaaaata agagttccaa ggggaattga agcagttcca tgaataactca ccttctgtg
10 10801 ttcttttcac aggtgtccag gcagaggtgc agctggtgga gtcaggagcc gaagtgaana
10861 agcctggggc tgttgtgaag gtgtcctgca aggcctctgg atacacattc actaattata
10921 ttatccactg ggtgaagcag ggcctgggtc agggccttga atggattgga tattttaatc
10981 cttacaatca tggactaag tacaatgaga agttcaaagg cagggccaca ctaactgcag
11041 acaaatccat cagcacagcc tacatggagc tcagcagcct gcgctctgag gacactgogg
15 11101 tctactactg tgcaagatca ggacctatg cctggtttga cacctggggc caagggacca
11161 cggtcacogt ctctcaggt aagaatggcc actctagggc ctttgttttc tgctgctgcc
11221 tgtgggattt catgagcatt gcaaagtgt cctcgggaca tgttcogagg ggacctgggc
11281 ggactggcca ggaggggacg ggcactgggg tgccttgagg atctgggagc ctctgtggat
11341 tttccgatgc ctttggaana tgggactgag gttgggtgcg tctgagacag taactcagcc
20 11401 tgggggcttg gtgaagatcg ccgcacagca gogagtcogt gaaatatctt atttagactt
11461 gtgaggtgcg ctgtgtgtca attacatct taaatccttt attggctgga aagagaattg
11521 ttggagtggg tgaatccagc caggagggac gcggggggat cca

SEC ID NO: 38**Secuencia de nucleótido del vector de expresión
HCVHQN73DSp20**

1 CTAGAGAGGT CTGGTGGAGC CTGCAAAGT CCAGCTTTCA AAGGAACACA GAAGTATGTG
 5 61 TATGGAATAT TAGAAGATGT TGCTTTTACT CTTAAGTTGG TTCTAGGAA AATAGTTAA
 121 ATACTGTGAC TTTAAAATGT GAGAGGGTTT TCAAGTACTC ATTTTTTTAA ATGTCAAAA
 181 TTTTGTGCAA TCAATTTGAG GTCTTGTTTG TGTAGAACTG ACATTACTTA AAGTTTAACC
 241 GAGGAATGGG AGTGAGGCTC TCTCATACC TATTGAGAAC TGACTTTTAA CAATAATAAA
 301 TTAAGTTTAA AATATTTTTA AATGAATTGA GCAATGTTGA GTTGGAGTCA AGATGGCOGA
 10 361 TCAGAACAG AACACCTGCA GCAGCTGGCA GGAAGCAGGT CATGTGGCAA GGCTATTTGG
 421 GGAAGGGAAA ATAAAACAC TAGGTAACT TGTAGCTGTG GTTGAAGAA GTGGTTTTGA
 481 AACACTCTGT CCAGCCCCAC CAAACGAAA GTCCAGGCTG AGCAAAACAC CAOCTGGGTA
 541 ATTTGCATTT CTAAAATAAG TTGAGGATTC AGCOGAACT GGAGAGGTCC TCTTTTAACT
 601 TATTGAGTTC AACCTTTTAA TTTTAGCTTG AGTAGTTCTA GTTCCOCAA ACTTAAGTTT
 15 661 ATGACTTCT AAAATGTATT TAAGCTTTCT GGGGCAGGOC AGGCTGACC TTGGCTTTGG
 721 GGCAGGGAGG GGGCTAAGGT GAGGCAGGTG GGGCAGOCA GTTGACACACC CAATGOCAT
 781 GAGOCAGAC ACTGGACGCT GAACTOGOG GACAGTTAAG AAOCCAGGGG CCTCTGOGOC
 841 CTGGGOCAG CTCTGTCCA CACOGGGTC ACATGGCAC ACCTCTCTTG CAGCTOCAC
 901 CAAGGGCCA TGGTCTTCC CCTGGCAC ACCCTCCAAG AGCAOCTCTG GGGGCACAGC
 20 961 GGOCCTGGGC TGCTGGTCA AGGACTACTT CCCCAGACG GTGACGGTGT CGTGGAACTC
 1021 AGGOGOCCTG ACCAGOGGOG TGCACACCTT CCGGCTGTG CTACAGTCT CAGGACTCTA
 1081 CTCCCTCAGC AGGTGGTGA CGTGCCCTC CAGCAGCTTG GGCACCCAGA OCTACATCTG
 1141 CAAOGTGAAT CACAAGCCA GCAACACCA GGTGGACAAG AGAGTTGGTG AGAGGOCAGC
 1201 ACAGGGAGGG AGGGTGTCTG CTGGAA000A GGCTCAGGC TCTGOCCTGG AOGCATCCCG
 25 1261 GCTATGCAGT CCCAGTCCAG GGCAGCAAG CAGGCCCCGT CTGCTCTTC AOCGGAGGC

15B
152

1321 CTCTG000GC OCCACTCATG CTCAGGGAGA GGGTCTCTG GCTTTTTOOC CAGGCTCTGG
1381 GCAGGCACAG GCTAGGTGOC OCTAACCCAG G00CTGCACA CAAAGGGGCA GGTGCTGGGC
1441 TCAGACCTGC CAAGAGOCAT AT00GGGAGG A00CTG000C TGACCTAAGC CCAC000CAA
1501 GG0CAAACTC T0CACT00CT CAGCT0GGAC A0CTTCTCTC CT00CAGATT CCAGTAACTC
5 1561 CCAATCTTCT CTCTGCAGAG OCCAAATCTT GTGACAAAAC TCACACATGC CCAC0GTG0C
1621 CAGGTAAG0C AG00CAGG0C T0G00CT0CA GCTCAAGG0G GGACAGGTGC OCTAGAGTAG
1681 0CTGCAT0CA GGGACAGG0C 0CAG00GGGT GCTGACAGT CCACCT0CAT CTCTT0CTCA
1741 GCA0CTGAAC T0CTGGGGGG A00GTCAGT T0CTCTT0C 000AAAA0C CAAGGACACC
1801 CTCATGATCT 000GAC00C TGAGGTCA CA TG0GTGGTGG TGGACGTGAG 0CAGAGAGC
10 1861 0CTGAGGTCA AGTTCAACTG GTACGTGGAC GG0GTGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG
1921 00G0GGGAGG AGCAGTACAA CAGCACGTAC 0GTGTGGTCA G0GT0CTCAC 0GT0CTGCAC
1981 CAGGACTGGC TGAATGGCAA GGAGTACAAG TGCAAGGTCT CCAACAAAGC 0CT00CAG0C
2041 00CAT0GAGA AA0CATCTC CAAAG0CAA GGTGGGAC0C GTGGGGTGG AGGG0CACAT
2101 GGACAGAGGC 0GGCT0GG0C CA00CTCTGC 0CTGAGAGTG A00GTGTAC CA0CTCTGT
15 2161 00CTACAGGG CAG0000GAG A0CCACAGGT GTACAC00TG 0000CAT0C GGGAGGAGAT
2221 GA0CAAGAAC CAGGTCA0C TGACCTG0CT GGTCAAAGG TTTAT0CCA G0GACAT0C
2281 0GTGGAGTGG GAGAGCAATG GGCAG00GA GAACAAC TAC AAGACCA0GC CT000GTGCT
2341 GGACT00GAC GGCT0CTTCT T0CTCTATAG CAAGCTCAC GTGGACAAGA GCAGGTGGCA
2401 GCAGGGGAAC GTCTTCTCAT GCT00GTGAT GCATGAGGCT CTGCACAACC ACTACAGCA
20 2461 GAAGAG0CTC T00CTGT00C 0GGGTAAATG AGTG0GACGG 00GGCAAG0C 000GT000C
2521 GGGCTCT0GC GGTOGCA0GA GGATGCTTGG CA0GTAC00C GTCTACATAC TT00CAGGCA
2581 00CAGCATGG AAATAAGCA 00CA0CACTG 00CTGGG00C CTG0GAGACT GTGATGGTTC
2641 TTT0CA0GGG TCAGG00GAG TCTGAGG0CT GAGTGGCATG AGGGAGGCAG AG0GGGT00C
2701 ACTGT000CA CACTGG00CA GGCTGTGCAG GTGTG0CTGG G00G0CTAGG GTGGGGCTCA
25 2761 G0CAGGGGCT G00CT0GGCA GGGTGGGGGA TTTG0CAGG TGG00CT00C T0CAGCAGCA

154
153

2821 GCTGCOCTGG GCTGGGOCAC GAGAAGCOCT AGGAGCOOCT GGGGACAGAC ACACAGCOOC
2881 TGCOCTCTGTA GGAGACTGTC CTGTCTGTG AGOGCOCTGT OCTCOGACOC OGATGOOCAC
2941 TCGGGGGCAT GCCTAGTCCA TGOGGTAGG GACAGGCOCT COCTCACCCA TCTACOOCCA
3001 OGGCACTAAC COCTGGCAGC OCTGCOOCAGC CTGCAOOCG CATGGGGACA CAACOGACTC
5 3061 OGGGGACATG CACTCTCGGG COCTGTGGAG GGA CTGGTGC AGATGOOCAC ACACACACTC
3121 AGOCCAGAAC CGTTCAACAA ACCOOGCACT GAGGTTGGTC GAGCGGGAGT GGGGOCAGAG
3181 OCTGCOCTGG COGTCAGGA GGA CTCCOGG GCTCACTOGA AGGAGGTGOC ACCATTTTCA
3241 CTTTGGTAGC TTTTCTTCTT CTTTAAATTT TTCTAAAGCT CATTAAATGT CTTTGATGTT
3301 TCTTTTGTA TGACAATAAA ATATCTTTT TAAGTCTGT ACTTGTGTAT GGGAGCOGOC
10 3361 TTCTGTGTG CAGCGOCTC CTGCOOOCGG TGGGAAGCAC GTTCAGGAGG AGGCTGGTCC
3421 AGCTGCAOCT OGGGGGCTCC CTGCACTGOC COOOGCOCTC CTGCAGOCAC AOGCATTGOC
3481 OGAGOGAOC TCOCTGGCC CTGTCACTAC ATGGACCOCT GGGGCTTCTC CTCTTTTCTA
3541 CATGGATGCA GTTCTCTCTC CTGCTGGCA OGGTGTGOC TGOCTGGTC ACTCTGGGG
3601 GGACAGGGOC TCCAGGAAA GCTGGGTGCA GGCTGGGAGC TGGCTCAGGC TGGOCAGGCA
15 3661 GAGOCACAGG GAGGGCOCTC CAGAACCAAC CATGGTCCGA AGCGAGAGGT GGGTGTGAGA
3721 TCCAGACATG ATAAGATACA TTGATGAGTT TGGACAAACC ACAACTAGAA TGCAGTGAAA
3781 AAAATGCTTT ATTTGTGAAA TTTGTGATGC TATTGCTTTA TTGTAAOCA TTATAAGCTG
3841 CAATAACAA GTTAACAACA ACAATTGCAT TCATTTTATG TTTGAGGTT AGGGGGAGGT
3901 GTGGGAGGTT TTTTAAAGCA AGTAAAOCT CTACAAATGT GGTATGGCTG ATTATGATCT
20 3961 CTAGTCAAGG CACTATACAT CAAATATTC TTATTAOCC CTTTACAAAT TAAAAAGCTA
4021 AAGGTACACA ATTTTGTAGC ATAGTTATTA ATAGCAGACA CTCTATGOCT GTGTGGAGTA
4081 AGAAAAACA GTATGTTATG ATTATACTG TTATGCOCTAC TTATAAAGGT TACAGAATAT
4141 TTTTCATAA TTTTCTTGTA TAGCAGTGCA GCTTTTTOCT TTGTGGTGTA AATAGCAAAG
4201 CAAGCAAGAG TTCTATTACT AAACACAGCA TGA CTCAAAA AACTTAGCAA TTCTGAAGGA
25 4261 AAGTCTTGG GGTCTTCTAC CTTTCTCTC TTTTGTGGAG GAGTAGAATG TTGAGAGTCA

155
154

4321 GCAGTAGCCT CATCATCACT AGATGGCAAT TCTTCTGAGC AAAACAGGTT TTCTTCATTA
4381 AAGGCATTCC ACCACTGCTC CCATTTCATCA GTTCCATAGG TTGGAATCTA AAATACACAA
4441 ACAATTAGAA TCAGTAGTTT AACACATTAT ACACCTTAAAA ATTTTATATT TAOCTTAGAG
4501 CTTTAAATCT CTGTAGGTAG TTTGTCCAAT TATGTCACAC CACAGAAGTA AGGTTCTTTC
5 4561 ACAAAGATCC GGAOCAAAGC GGOCATCGTG CCTCCCCACT CCTGCAGTTC GGGGGCATGG
4621 ATGOGGGGAT AGCOGCTGCT GGTTTCTGCG ATGCOGACGG ATTTGCACTG CCGGTAGAAC
4681 TCOGOGAGGT CGTOCAGCCT CAGGCAGCAG CTGAACCAAC TCGOGAGGGG ATOGAGCOOG
4741 GGGTGGGCGA AGAACTOCAG CATGAGATCC COGOGCTGGA GGATCATOCA GOOGGOGTOC
4801 CGGAAAACGA TTCOGAAGOC CAACCTTTCA TAGAAGGCGG CGGTGGAATC GAAATCTOGT
10 4861 GATGGCAGGT TGGGCGTOGC TTGGTGGTTC ATTTGGAACC CCAGAGTCCC GCTCAGAAGA
4921 ACTCGTCAAG AAGGOGATAG AAGGOGATGC GCTGOGAATC GGGAGOGGCG ATACCGTAAA
4981 GCACGAGGAA GCGGTCAGOC CATTCGOOGC CAAGCTCTTC AGCAATATCA CGGGTAGOCA
5041 ACGCTATGTC CTGATAGCGG TCOGOCACAC CCAGOCGGCC ACAGTGGATG AATOCAGAAA
5101 AGGGGCCATT TTCCACCATG ATATTGGCA AGCAGGCATC GGCATGGGTC ACGAGAGAT
15 5161 OCTGGOOGTC GGGCATGCGC GOCFTGAGOC TGGOGAACAG TTGGGCTGGC GOGAGOOOCT
5221 GATGCTCTTC GTCCAGATCA TOCTGATOGA CAAGACCGGC TTCCATCOGA GTACGTGCTC
5281 GCTOGATGOG ATGTTTOGCT TGGTGGTOGA ATGGGCAGGT AGOOGGATCA AGOGTATGCA
5341 GOOGOGCAT TGCATCAGOC ATGATGGATA CTTTCTOGGC AGGAGCAAGG TGAGATGACA
5401 GGAGATCCTG CCOGGGCACT TOGOCOAATA GCAGCCAGTC CCTTCCCGCT TCAGTGACAA
20 5461 CGTOGAGCAC AGCTGOGCAA GGAACGCOOG TOGTGGOCAG CCACGATAGC CGGCTGCOCT
5521 CGTOCTGCAG TTCATTGAGG GCAOCCGACA GGTCGGTCTT GACAAAAAGA ACOGGGOGOC
5581 OCTGOGCTGA CAGCOGGAAC ACGGOGGCAT CAGAGCAGCC GATTGTCTGT TGTGCOOCAGT
5641 CATAGCOGAA TAGOCTCTOC ACOCAAGOGG COGGAGAAC TGGTGCAAT CCATCTTGTT
5701 CAATCATGOG AAACGATCCT CATCTGTCT CTTGATCAGA TCTTGATCCC CTGOGOCATC
25 5761 AGATCCTTGG CGGCAAGAAA GOCATOCAGT TTACTTTGCA GGGCTTCCA ACCTTACCAG

156
155

5821 AGGGGCCCC AGCTGGCAAT TOGGTTGCG TTGCTGTCCA TAAACCGCC CAGTCTAGCT
5881 ATCGCCATGT AAGCCACTG CAAGCTAOC TCTTCTCTT TCGCTTGGG TTTTCCCTTG
5941 TCAGATAGC CCAGTAGCTG ACATTCATCC GGGGTCAGCA CCGTTTCTGC GGA CTGGCTT
6001 TCTAGTGT TCGCTTCTT TAGCAGCCCT TGCGCCCTGA GTGCTTGGG CAGCGTGAAG
5 6061 CTTTTTGCAA AAGCCTAGGC CTCAAAAAA GCTCTCTCAC TACTTCTGGA ATAGCTCAGA
6121 GCGGAGGGG GCTCGGCCCT CTGCATAAAT AAAAAAATT AGTCAGCCAT GGGGCGGAGA
6181 ATGGGCGGAA CTGGGCGGAG TTAGGGGCGG GATGGGCGGA GTTAGGGGCG GGA CTATGTT
6241 TGCTGACTAA TTGAGATGCA TGCTTTGCAT ACTTCTGCT GCTGGGGAGC CTGGGGACTT
6301 TCCACACCTG GTTGCTGACT AATTGAGATG CATGCTTTC ATACTTCTGC CTGCTGGGGA
10 6361 GCTGGGGAC TTTCACACC CTAAGTACA CACATTCAC AGCTGCTCG CGGTTTGGG
6421 TGATGAGGT GAAACCTCT GACACATGCA GCTCCCGGAG ACGGTCACAG CTTGTCTGTA
6481 AGCGGATGCC GGGAGCAGAC AAGCCCGTCA GGGGCGTCA GCGGGTGTG GCGGGTGTG
6541 GGGGCGAGC ATGACCCAGT CAAGTAGCGA TAGCGGAGTG TATACTGGCT TAACTATGG
6601 GCATCAGAGC AGATTGTACT GAGAGTGCAC CATATGCGT GTGAAATACC GCACAGATGC
15 6661 GTAAGGAGAA AATACCGCAT CAGGCGCTCT TCGCTTCTT CGCTCACTGA CTGCTGCGC
6721 TGGTGTGTC GGCTGCGGCG AGCGGTATCA GCTCACTCAA AGCGGTAAT ACGGTTATCC
6781 ACAGAATCAG GGGATAAGC AGGAAAGAAC ATGTGAGCAA AAGGCCAGCA AAAGGCCAGG
6841 AACCGTAAAA AGGCGCGGTT GCTGGCGTTT TTCCATAGGC TCGCCCCC TGACGAGCAT
6901 CAAAAAATC GACGCTCAG TCAGAGGTGG CGAAACCGA CAGGACTATA AAGATACCAG
20 6961 GCGTTTCCC CTGGAAGCTC CCGTGTGCG TCTCTGTTC CGACCTGCC GCTTACCGA
7021 TAAGTGTCC OCTTCTCC TTGGGAAGC GTGGCGCTT CTCATAGCTC ACGCTGTAGG
7081 TATCTCAGTT CCGTGTAGGT CGTGTGCTC AAGCTGGCT GTGTGACGA ACGCCCGTT
7141 CAGCCGACC GCTGCGCTT ATCCGTTAC TATGTCCTG AGTCCAAACC GGTAGACAC
7201 GACTTATGC CACTGGCAGC AGCACTGGT AACAGGATTA GCAGAGCGAG GTATGTAGGC
25 7261 GGTGCTACAG AGTTCTTGA GTGGTGGCT AACTACGCT AACTAGAAG GACAGTATTT

7321 GGTATCTGOG CTCTGCTGAA GOCAGTTAOC TTOGGAAAAA GAGTTGGTAG CTCITGATOC
 7381 GGCAAAACAAA CCACCGCTGG TAGCGGTGGT TTTTTTGTTT GCAAGCAGCA GATTACGGGC
 7441 AGAAAAAAG GATCTCAAGA AGATCCTTTG ATCTTTTCTA CGGGGTCTGA OGCTCAGTGG
 7501 AACGAAACT CAOGTTAAGG GATTTTGGTC ATGAGATTAT CAAAAAGGAT CTTCAOCTAG
 5 7561 ATCCTTTTAA ATTAAAAATG AAGTTTTAAA TCAATCTAAA GTATATATGA GTAAACTTGG
 7621 TCTGACAGTT ACCAATGCTT AATCAGTGAG GCACCTATCT CAGCGATCTG TCTATTTTGT
 7681 TCATOCATAG TTGCTGACT CCGCTGCTG TAGATAACTA CGATAOCCGA GGGCTTACCA
 7741 TCTGGCCCCA GTGCTGCAAT GATACCGOGA GAOCACOGCT CACCGGCTOC AGATTTATCA
 7801 GCAATAAAC AGCCAGCCGG AAGGGCCGAG CGCAGAAGTG GTCTGCAAC TTTATCCGCC
 10 7861 TCCATOCAGT CTATTAAATTG TTGOCGGGAA GCTAGAGTAA GTAGTTGOC AGTTAATAGT
 7921 TTGOGCAACG TTGTTGOCAT TGCTGCAGGC ATCGTGGTGT CACGCTGCTC GTTTGGTATG
 7981 GCTTCATTCA GCTCCGGTTC CCAACGATCA AGGCGAGTTA CATGATCCCC CATGTTGTGC
 8041 AAAAAAGCGG TTAGCTOCTT OGGTCTOOG ATCGTTGTCA GAAGTAAGTT GCGCGCAGTG
 8101 TTATCACTCA TGGTTATGGC AGCACTGCAT AATCTCTTA CTGTCATGCC ATCCGTAAAG
 15 8161 TGCTTTTCTG TGA CTGGTGA GACTCAACC AAGTCATTCT GAGAATAGTG TATGOGGCGA
 8221 CCGAGTTGCT CTTGCCCCGC GTCAACAAGG GATAATACCG CGCCACATAG CAGAACTTTA
 8281 AAAGTGCTCA TCATTGAAA ACGTCTCTOG GGGGAAAAC TCTCAAGGAT CTTACCGCTG
 8341 TTGAGATCCA GTTCGATGTA AOCCTCTGT GCACCCAACT GATCTTCAGC ATCTTTTACT
 8401 TTCACAGOG TTTCTGGGTG AGCAAAAACA GGAAGGCAAA ATGCGGCAAA AAAGGGAATA
 20 8461 AGGGCGACAC GGAAATGTTG AATACTCATA CTCCTOCTTT TTCAATATTA TTGAAGCATT
 8521 TATCAGGGTT ATTGTCTCAT GAGCGGATAC ATATTTGAAT GTATTTAGAA AAATAAACAA
 8581 ATAGGGGTTT CCGGCACATT TCCCCGAAAA GTGOCACCTG ACGTCTAAGA AACCATTTATT
 8641 ATCATGACAT TAACCTATAA AAATAGGCGT ATCAAGAGGC CCTTTOGTCT TCAAGAATTC
 8701 GAGCTGGTGA CCCATCAGOC AAAAAGCATG CCTGCCACAC AACATCAATT TCTGGAAAAC
 25 8761 GCTACACTTA ATTATTTCTA GTAGAACAGC TCTTTGGTTT GCCAAAAGA ATCAOCTATA

158
157

8821 GTGGCATCTA AGCACAAAAA GGAGAAAAAA ATCACAAGA AATGATTGAG AGGCATAATA
 8881 AAAATTATCA AAAAATTATG AGTTTTAOGA TTTCATCTTT TTCCAAGTTG AAATCATAGG
 8941 GTGGCTTTAA CACAGTGACA AGGAATGTGC ATGCTGCCAT TATGGTGTCT TGCTAAAAT
 9001 GGTTGGAGCC TTGTCATGCT ACAGAGAAAC TGTCATACAG CAGGGGGTGC CAAATTTTCA
 5 9061 TATTTTTTTA TATCATTGAG CAGGTGCACA GAAGACCAGA AAGCACTTTC TATCAGGCTG
 9121 GCCTTCTCT TCCTTTCCAG TATGAAGCAA AAACCTGCCA TGAACTAGC AATTGTTAAA
 9181 TTCTTTTTTC AACAGTATT TGTGCTATCA GAACATAGTG CATTCAAAAG TCTAGCTGA
 9241 GAGACAACC CAGTTTTATT CATCTCTCT ACTAOCCTC TCATTOCCAC TGTTTGTGTT
 9301 CTCCCTCCCA TTTTAATTGT CTATCTAGTC CAACTAAGC ACACGATCCA GTCCACATTA
 10 9361 AACACATGT TTTCACTTTA AGTCAAATAC AAGACACCTT TAATATCAGC CCTTGTTCAT
 9421 AATCGTGCTT CTAGTGACTT AATGTACATG TCACACTGTA CTGTTGGGTT TTGTGTCTCA
 9481 TCATGAACAA TGTTGTGAAG GTATTAAAGT GAGAGTAAGC AGAATTAGAT TOCTCTAATG
 9541 ATGCACACC AACTAAGAG CAGAAATAAT ATTAAAAATA GAAAAAAAG TTTTACATGA
 9601 GATTTCAAAT ACCCAGGTAT GAGCTGCAGT TTCTTCAAGT TAAAGCATCG AGGTTGTCAG
 15 9661 TTACACTATT ACAGGAAACA TATGCAGAGT TTTTATTTTA GTATATTAGT TTTCACATAT
 9721 GTGGAATTAC TATTAACTA TTCTTCTTT TCAAATGCTT ACCATTGTAA ATGAGTTTGT
 9781 GACTTTGTGT AGGTGAGTGC ACATGACTCT GGATGCCATA GAGGACTGAA GAAGTTGGAG
 9841 TTATAGGTAG TTTTATTCTA CTTGACTGTT CAGTGCTAAA AATACAACCTG AGGTCTTTA
 9901 AACTGCTGTT CATGAACCTC TTAATTGATA TATCTCATGA GATCTCTAAA CTATTTTTAT
 20 9961 TATGACACGT TTCAOCATTT TCACTGTAA CATTTTTATG TTTTATATTA ATGTAACTAT
 10021 ATGACACTTC CAAAATCC CATATTCACA ATTGAACGT TTCAAAGTTT TACCTTGACT
 10081 TATGGGAAAT GAAACCCAC ATTTTATAAT TTTAAAATGA AATGTTTATT TTATATTTCT
 10141 GCAAATTTCA CAAGGAAAGA TTAGTCACTG GTGTGTGAGA GCAGAGGAGC ATAAGAGTTC
 10201 AGGAATAGAA TCCATTATGA TTCTGGAGGC AAGGAAGAAC TGATGCCAAG GTTTCAGTAT
 25 10261 AAGAGCAGTA TCCACTGGAA AGGATAAAGT CACTACATCT GAGCACAGAG CAGGACATCT

159
158

10321 ACATAATGAG TGGTCACTAA TGGGOCAC TG TACTGTT ATATGTATAA GGCTCAAGAA
 10381 TGAGCACTGA GGCTGTAAGG TGTATGGGTG AGGACATCAG GATGTAAACC CAGCTCAGGT
 10441 AGAGGACTCA GAGGACAGCA CAGTCAGCAT GAACTAATAA ACATCAGATA AGATAAGGCA
 10501 CAAGCTCAGC TATATAGGGT AAGGGATCTT TGTAATCTG ATTGTGCATC CAGTCTAGTT
 5 10561 CAATGTGACT TAGGAAGGCC AGTCATATGC AATCTAGAG AAGACTTTAG AGTAGAAATC
 10621 TGAGGCTCAC CTCACATACC AGCAAGCGAG TGACCAGTTA GTCTTAAGGC ACCACTTCTT
 10681 AGACATCATG GCTTGGGTGT GGAOCTTGOC ATTCTGATG GCAGCTGCCC AAAGTAAGAC
 10741 ATCAGAAAAA AGAGTTCCAA GGGGAATTGA AGCAGTTCCA TGAATACTCA CCTTCTGTG
 10801 TTCTTTTCAC AGGTGTCCAG GCACAGGTGC AGCTGGTGGG GTCAGGAGCC GAAGTGAAAA
 10 10861 AGOCTGGGGC TTCAGTGAAG GTGTCTGCA AGOCTCTGG ATACACATTC ACTAATTATA
 10921 TTATCCACTG GGTGAAGCAG GAGCTGGTC AGGGOCTGA ATGGATTGGA TATTTTAATC
 10981 CTTACAATCA TGGTACTAAG TACAATGAGA AGTTCAAAGG CAG000CACA CTAAGTGCAG
 11041 ACAAAATOCAT CAGCACAGCC TACATGGAGC TCAGCAGCCT GCGCTCTGAG GACACTGCGG
 11101 TCTACTACTG TGCAAGATCA GGACCTATG OCTGGTTGA CAOCTGGGGC CAAGGGACCA
 15 11161 CGGTACCGT CTCTCAGGT AAGAATGGCC ACTCTAGGGC CTTTGTTC TCCTGCTGCC
 11221 TGTGGGATTT CATGAGCATT GCAAAGTTGT OCTGGGACA TGTTCGAGG GGACCTGGGC
 11281 GGAAGTGGCA GGAGGGGAG GGAAGTGGG TGCTTGAGG ATCTGGGAGC CTCTGTGGAT
 11341 TTTCGATGC CTTTGAAAA TGGGACTGAG GTTGGGTGCG TCTGAGACAG TAACTCAGCC
 11401 TGGGGGCTTG GTGAAGATCG CGCACAGCA GCGAGTCGT GAAATATCTT ATTTAGACTT
 20 11461 GTGAGGTGCG CTGTGTGTCA ATTTACATCT TAAATCTTT ATTGGCTGGA AAGAGAATTG
 11521 TTGGAGTGGG TGAATOCAGC CAGGAGGGAC GGGGGGGAT OCA

SEC ID NO: 39**Secuencia de nucleótido del vector de expresión LCVL2Sp20**

25 1 CTAGAGTCCT AGAGAGGTCT GGTGGAGCCT GCAAAAGTCC AGCTTTCAAA

150
159

51 GGAACACAGA AGTATGTGTA TGGAATATTA GAAGATGTTG CTTTACTCT
 101 TAAGTTGGTT CCTAGGAAAA ATAGTTAAAT ACTGTGACTT TAAAATGTGA
 151 GAGGGTTTTC AAGTACTCAT TTTTTTAAAT GTCCAAAATT TTTGTCAATC
 201 AATTTGAGGT CTTGTTTGTG TAGAACTGAC ATTACTTAAA GTTTAACCGA
 5 251 GGAATGGGAG TGAGGCTCTC TCATACCCTA TTCAGAACTG ACTTTTAACA
 301 ATAATAAATT AAGTTTAAAA TATTTTTTAAA TGAATTGAGC AATGTTGAGT
 351 TGGAGTCAAG ATGGCCGATC AGAACCAGAA CACCTGCAGC AGCTGGCAGG
 401 AAGCAGGTCA TGTGGCAAGG CTATTTGGGG AAGGGAAAAT AAAACCACTA
 451 GGTAAACTTG TAGCTGTGGT TTGAAGAAGT GGTTTTGAAA CACTCTGTCC
 10 501 AGCCCGACCA AACCGAAAGT CCAGGCTGAG CAAAACACCA CCTGGGTAAT
 551 TTGCATTTCT AAAATAAGTT GAGGATTCAG CCGAAACTGG AGAGGTCCTC
 601 TTTTAACTTA TTGAGTTCAA CCTTTTAATT TTAGCTTGAG TAGTTCAGT
 651 TTCCCCAAC TTAAGTTTAT CGACTTCTAA AATGTATTTA GAACTCATTT
 701 TCAAAATTAG GTTATGTAAG AAATTGAAGG ACTTTAGTGT CTTTAATTTT
 15 751 TAATATATTT AGAAAACCTC TTAAAATTAC TCTATTATTC TTCCCTCTGA
 801 TTATTGGTCT CCATTCAATT CTTTTCCAAT ACCCGAAGCA TTTACAGTGA
 851 CTTTGTTTCT GATCTTTTTT AGTTGTTTGT TTTGCCTTAC TATTAAGACT
 901 TTGACATTCT GGTCAAAACG GCTTCACAAA TCTTTTTTCAA GACCACTTTC
 951 TGAGTATTCA TTTTAGGAGA AATACTTTTT TTTTAAATGA ATGCAATTAT
 20 1001 CTAGGACCTG CAGGCATGCT GTTTTCTGTC TGTCCCTAAC ATGCCCTGTG
 1051 ATTATCCGCA AACAACACAC CCAAGGGCAG AACTTTGTTA CTTAAACACC
 1101 ATCCTGTTTG CTTCTTTCCT CAGGAACTGT GGCTGCACCA TCTGTCTTCA
 1151 TCTTCCCGCC ATCTGATGAG CAGTTGAAAT CTGGAACTGC CTCTGTTGTG
 1201 TGCCTGCTGA ATAACCTCTA TCCCAGAGAG GCCAAAGTAC AGTGGAAGGT

191
160

1251 GGATAACGCC CTCCAATCGG GTAAC TCCCA GGAGAGTGTC ACAGAGCAGG
1301 ACAGCAAGGA CAGCACCTAC AGCCTCAGCA GCACCCTGAC GCTGAGCAAA
1351 GCAGACTACG AGAAACACAA AGTCTACGCC TGC GAAGTCA CCCATCAGGG
1401 CCTGAGCTCG CCCGTCACAA AGAGCTTCAA CAGGGGAGAG TGTTAGAGGG
5 1451 AGAAGTGCCC CCACCTGCTC CTCAGTTCCA GCCTGACCCC CTCCCATCCT
1501 TTGGCCTCTG ACCCTTTTTTC CACAGGGGAC CTACCCCTAT TGCGGTCCTC
1551 CAGCTCATCT TTCACCTCAC CCCCTCCTC CTCCTTGGCT TTAATTATGC
1601 TAATGTTGGA GGAGAATGAA TAAATAAAGT GAATCTTTGC ACCTGTGGTT
1651 TCTCTCTTTC CTCATTTAAT AATTATTATC TGTTGTTTTA CCAACTACTC
10 1701 AATTTCTCTT ATAAGGGACT AAATATGTAG TCATCCTAAG GCGGGATATC
1751 GAGATCTGAA GCTGATCCAG ACATGATAAG ATACATTGAT GAGTTTGGAC
1801 AAACCACAAC TAGAATGCAG TGAAAAAAT GCTTTATTTG TGAAATTTGT
1851 GATGCTATTG CTTTATTTGT AACCATTATA AGCTGCAATA AACAAGTTAA
1901 CAACAACAAT TGCATTCATT TTATGTTTCA GGTT CAGGGG GAGGTGTGGG
15 1951 AGGTTTTTTA AAGCAAGTAA AACCTCTACA AATGTGGTAT GGCTGATTAT
2001 GATCTCTAGT CAAGGCACTA TACATCAAAT ATTCCTTATT AACCCCTTTA
2051 CAAATTAAAA AGCTAAAGGT ACACAATTTT TGAGCATAGT TATTAATAGC
2101 AGACACTCTA TGCCTGTGTG GAGTAAGAAA AAACAGTATG TTATGATTAT
2151 AACTGTTATG CCTACTTATA AAGGTTACAG AATATTTTTTC CATAATTTTC
20 2201 TTGTATAGCA GTGCAGCTTT TTCCTTTGTG GTGTAAATAG CAAAGCAAGC
2251 AAGAGTTCTA TTAATAACA CAGCATGACT CAAAAA ACTT AGCAATTCTG
2301 AAGGAAAGTC CTTGGGGTCT TCTACCTTTC TCTTCTTTTT TGGAGGAGTA
2351 GAATGTTGAG AGTCAGCAGT AGCCTCATCA TCACTAGATG GCATTTCTTC
2401 TGAGCAAAAC AGGTTTTTCCT CATTAAAGGC ATTCCACCAC TGCTCCCATT

2451 CATCAGTTCC ATAGGTTGGA ATCTAAAATA CACAAACAAT TAGAATCAGT
 2501 AGTTTAACAC ATTATACACT TAAAAATTTT ATATTACCT TAGAGCTTTA
 2551 AATCTCTGTA GGTAGTTTGT CCAATTATGT CACACCACAG AAGTAAGGTT
 2601 CCTTCACAAA GATCCGGACC AAAGCGGCCA TCGTGCCTCC CCACTCCTGC
 5 2651 AGTTCGGGGG CATGGATGCG CGGATAGCCG CTGCTGGTTT CCTGGATGCC
 2701 GACGGATTTG CACTGCCGGT AGAACTCCGC GAGGTCGTCC AGCCTCAGGC
 2751 AGCAGCTGAA CCAACTCGCG AGGGGATCGA GCATCCCCCA TGGTCTTATA
 2801 AAAATGCATA GCTTTAGGAG GGGAGCAGAG AACTTGAAAG CATCTTCCTG
 2851 TTAGTCTTTC TTCTCGTAGA CTTCAAACCTT AACTTGATG CCTTTTTCTT
 10 2901 CCTGGACCTC AGAGAGGACG CCTGGGTATT CTGGGAGAAG TTTATATTTT
 2951 CCCAAATCAA TTTCTGGGAA AAACGTGTCA CTTTCAAATT CCTGCATGAT
 3001 CCTTGTCACA AAGAGTCTGA GGTGGCCTGG TTGATTCATG GCTTCCTGGT
 3051 AAACAGAACT GCCTCCGACT ATCCAAACCA TGTCTACTTT ACTTGCCAAT
 3101 TCCGGTTGTT CAATAAGTCT TAAGGCATCA TCCAAACTTT TGGCAAGAAA
 15 3151 ATGAGCTCCT CGTGGTGGTT CTTTGAGTTC TCTACTGAGA ACTATATTAA
 3201 TTCTGTCCTT TAAAGGTCGA TTCTTCTCAG GAATGGAGAA CCAGGTTTTT
 3251 CTACCCATAA TCACCAGATT CTGTTTACCT TCCACTGAAG AGGTGTGGT
 3301 CATTCTTTGG AAGTACTTGA ACTCGTTCCT GAGCGGAGGC CAGGGTCGGT
 3351 CTCCGTTCTT GCCAATCCCC ATATTTTGGG ACACGGCGAC GATGCAGTTC
 20 3401 AATGGTCGAA CCATGATGGC AGCGGGGATA AAATCCTACC AGCCTTCACG
 3451 CTAGGATTGC CGTCAAGTTT GGGGGTACCG AGCTCGAATT AGCTTTTTGC
 3501 AAAAGCCTAG GCCTCCAAA AAGCCTCCTC ACTACTTCTG GAATAGCTCA
 3551 GAGGGCCGAG GCGGCCTCGG CCTCTGCATA AATAAAAAAA ATTAGTCAGC
 3601 CATGGGGCGG AGAATGGGCG GAACTGGGCG GAGTTAGGGG CGGGATGGGC

163
162

3651 GGAGTTAGGG GCGGGACTAT GGTGCTGAC TAATTGAGAT GCATGCTTTG
3701 CATACTTCTG CCTGCTGGGG AGCCTGGGGA CTTTCCACAC CTGGTTGCTG
3751 ACTAATTGAG ATGCATGCTT TGCATACTTC TGCCTGCTGG GGAGCCTGGG
3801 GACTTTCCAC ACCCTAACTG ACACACATTC CACAGCTGCC TCGCGCGTTT
5 3851 CGGTGATGAC GGTGAAAACC TCTGACACAT GCAGCTCCCG GAGACGGTCA
3901 CAGCTTGTCT GTAAGCGGAT GCCGGGAGCA GACAAGCCCG TCAGGGCGCG
3951 TCAGCGGGTG TTGGCGGGTG TCGGGGCGCA GCCATGACCC AGTCACGTAG
4001 CGATAGCGGA GTGTATACTG GCTTAACTAT GCGGCATCAG AGCAGATTGT
4051 ACTGAGAGTG CACCATATGC GGCCGCATAT GCGGTGTGAA ATACCGCACA
10 4101 GATGCGTAAG GAGAAAATAC CGCATCAGGC GCTCTTCCGC TTCCTCGCTC
4151 ACTGACTCGC TGCCTCGGT CGTTCGGCTG CGGCGAGCGG TATCAGCTCA
4201 CTCAAAGGCG GTAATACGGT TATCCACAGA ATCAGGGGAT AACGCAGGAA
4251 AGAACATGTG AGCAAAAGGC CAGCAAAAGG CCAGGAACCG TAAAAAGGCC
4301 GCGTTGCTGG CGTTTTTCCA TAGGCTCCGC CCCCTGACG AGCATCACAA
15 4351 AAATCGACGC TCAAGTCAGA GGTGGCGAAA CCCGACAGGA CTATAAGAT
4401 ACCAGGCGTT TCCCCCTGGA AGCTCCCTCG TGCCTCTCC TGTTCGACC
4451 CTGCCGCTTA CCGGATACCT GTCCGCCTTT CTCCCTTCGG GAAGCGTGGC
4501 GCTTTCTCAT AGCTCACGCT GTAGGTATCT CAGTTCGGTG TAGGTCGTTC
4551 GCTCCAAGCT GGGCTGTGTG CACGAACCCC CCGTTCAGCC CGACCGCTGC
20 4601 GCCTTATCCG GTAACATATCG TCTTGAGTCC AACCCGGTAA GACACGACTT
4651 ATCGCCACTG GCAGCAGCCA CTGGTAACAG GATTAGCAGA GCGAGGTATG
4701 TAGGCGGTGC TACAGAGTTC TTGAAGTGGT GGCCTAACTA CGGCTACACT
4751 AGAAGGACAG TATTTGGTAT CTGCGCTCTG CTGAAGCCAG TTACCTTCGG
4801 AAAAAGAGTT GGTAGCTCTT GATCCGGCAA ACAAACCACC GCTGGTAGCG

4851 GTGGTTTTTT TGTTTGCAAG CAGCAGATTA CGCGCAGAAA AAAAGGATCT
4901 CAAGAAGATC CTTTGATCTT TTCTACGGGG TCTGACGCTC AGTGGAACGA
4951 AAACTCACGT TAAGGGATTT TGGTCATGAG ATTATCAAAA AGGATCTTCA
5001 CCTAGATCCT TTAAATTAA AAATGAAGTT TTAAATCAAT CTAAAGTATA
5 5051 TATGAGTAAA CTTGGTCTGA CAGTTACCAA TGCTTAATCA GTGAGGCACC
5101 TATCTCAGCG ATCTGTCTAT TTCGTTTCATC CATAGTTGCC TGACTCCCCG
5151 TCGTGTAGAT AACTACGATA CGGGAGGGCT TACCATCTGG CCCCAGTGCT
5201 GCAATGATAC CGCGAGACCC ACGCTCACCG GCTCCAGATT TATCAGCAAT
5251 AAACCAGCCA GCCGGAAGGG CCGAGCGCAG AAGTGGTCCT GCAACTTTAT
10 5301 CCGCCTCCAT CCAGTCTATT AATTGTTGCC GGAAGCTAG AGTAAGTAGT
5351 TCGCCAGTTA ATAGTTTGCG CAACGTTGTT GCCATTGCTG CAGGCATCGT
5401 GGTGTCACGC TCGTCGTTTG GTATGGCTTC ATTCAGCTCC GGTTCCCAAC
5451 GATCAAGGCG AGTTACATGA TCCCCCATGT TGTGCAAAAA AGCGGTTAGC
5501 TCCTTCGGTC CTCCGATCGT TGTGAGAAGT AAGTTGGCCG CAGTGTTATC
15 5551 ACTCATGGTT ATGGCAGCAC TGCATAATTC TCTTACTGTC ATGCCATCCG
5601 TAAGATGCTT TTCTGTGACT GGTGAGTACT CAACCAAGTC ATTCTGAGAA
5651 TAGTGTATGC GGCGACCGAG TTGCTCTTGC CCGGCGTCAA CACGGGATAA
5701 TACCGCGCCA CATAGCAGAA CTTTAAAAGT GTCATCATT GGAAAACGTT
5751 CTTCGGGGCG AAAACTCTCA AGGATCTTAC CGCTGTTGAG ATCCAGTTTCG
20 5801 ATGTAACCCA CTCGTGCACC CAACTGATCT TCAGCATCTT TTACTTTCAC
5851 CAGCGTTTCT GGGTGAGCAA AACAGGAAG GCAAAATGCC GCAAAAAGG
5901 GAATAAGGGC GACACGGAAA TGTTGAATAC TCATACTCTT CCTTTTTCAA
5951 TATTATTGAA GCATTTATCA GGGTTATTGT CTCATGAGCG GATACATATT
6001 TGAATGTATT TAGAAAAATA AACAAATAGG GGTTCCGCGC ACATTTCCCC

165
164

6051 GAAAAGTGCC ACCTGACGTC TAAGAAACCA TTATTATCAT GACATTAACC
6101 TATAAAAATA GGCGTATCAC GAGGCCCTTT CGTCTTCAAG AATTCAGCTG
6151 CTCGAGGAAG AGCTCAAACC CATGCTACTC TCTGGCTTGA TGGAAGCAAC
6201 GCTTTCATAG CTGAGCTGTC ATAAATAATA AAGAGATTTT TTTATTAATA
5 6251 TTGAAAAGAT GGGTTATTTA TGTAAGACTC TGTCTTCATT TTAAAAACCA
6301 CACCTTCCAG TAGTATTCTG TTACTGTTCT GGCAATCACT GTGATCAAGA
6351 AGCTACACGG TGAGTTGTGC TTCTCAGTCC TAAGGGATAC ATCTACAAGA
6401 GGCTCCCATATA CTCGAAGCTC AGGAAACATT GTAGAAAAGG AGGCAAAAGA
6451 CTGACAGAGC CAGAGGACCA AGAAATTTGT TGTGAGGTTG TGTCTCCTAC
10 6501 TAACAATATA AGCAATATCT ATAAATTGTT GATATCATGG CTACTAAAAT
6551 GTGAGTTGAA CGAGGAGGAC ACAAATGAAC ATGACAATCA GAATGAGGCC
6601 TCTCACCTGC AAAAAACACT ATAGAGAAGC AGATAAAGCT GTCAGCAGAA
6651 GAGGCGCACC TCCTTATAGA AGAAGCCTAC CAGGTTTGAT ATATCAGCCT
6701 TGAAAACCTA CATAGTATTT ACATTATATC GAGTCTATGA GACATATTTA
15 6751 GTAATGCATA TGTATGTGTG TGTGTGCATG TATGTGTGTA AATACATATG
6801 TTCATAGAAA AATGTGTAAA AAGAGATCAT GAATTTAAGA GAGAACTGGG
6851 ACAATTTTTT TCAGGGAGTT GTAATCAGGA AAGTTAAGGG AAAAATGTTG
6901 TAATTAAAAT TCAGGCTCAG AAACAAACAA AGGAAAAGAA AAAAAACAA
6951 CAACAACAAC AAAAAACAA AACAAAGGAG AAGCTGTATG GCCACAATAG
20 7001 CATCTACAGC TAACTGTGAA AGGATAATGG AACAAAGTTAT GTACTGCCTA
7051 GAGCAGTATG ATGCCTAAAT CATCTCGACA TGGAGGAAAA TAGAACAAAG
7101 ACACTCTACA TAGACTATGA TAGAAATCAA AATAAGGTGT AAGACATAGA
7151 ACATTAGTTT TGTTTGTGTG TCAAAGAGAC TCACATTCCC ACAAAAAAAT
7201 CTGTGGGATT TTACAGGTCT GCAATAAGCT GCTGACCTGA TGATTTCTGC

7251 AGCTGTGCCT ACCCTTTGCT GATTTCATG TACCCAAAGC ATAGCTTACT
 7301 GACATGAGGA TTTCTTCATA GTCAGGTCAC ACCCTTTGCT GGAGTCAGAA
 7351 TCACACTGAT CACACACAGT CATGAGTGTG CTCACTCAGG TCCTGGCGTT
 7401 GCTGCTGCTG TGGCTTACAG GTAATGAAGA CAGCACTAGA ATTTTATTGA
 5 7451 GCTTCCTGTA CACTGTGCTG CTTGTCTCTG TGAAAATTCT CTTGTGAATT
 7501 AATCATGTGG GGATCTGTTT TCAATTTTTC AATTGTAGGT ACGCGTTGTG
 7551 ACATTCTGCT GACCCAGTCT CCAGCCACCC TGTCTCTGAG TCCAGGAGAA
 7601 AGAGCCACTT TCTCCTGCAG GGCCAGTCAG AACATTGGCA CAAGCATACA
 7651 GTGGTATCAA CAAAAACAA ATGGTGCTCC AAGGCTTCTC ATAAGGTCTT
 10 7701 CTTCTGAGTC TATCTCTGGG ATCCCTTCCA GGTTTAGTGG CAGTGGATCA
 7751 GGGACAGATT TTACTCTTAC CATCAGCAGT CTGGAGCCTG AAGATTTTGC
 7801 AGTGTATTAC TGTCAACAAA GTAATACCTG GCCATTCACG TTCGGCCAGG
 7851 GGACCAAGCT TGAAATCAAA CGTAAGTAGA ATCCAAAGTC TCTTTCTTCC
 7901 GTTGTCTATG TCTGTGGCTT CTATGTCTAA AAATGATGTA TAAATCTTA
 15 7951 CTCTGAAACC AGATTCTGGC ACTCTCCAAG GCAAAGATAC AGAGTAACTC
 8001 CGTAAGCAAA GCTGGGAATA GGCTAGACAT GTTCTCTGGA GAATGAATGC
 8051 CAGTGTAATA ATTAACACAA GTGATAGTTT CAGAAATGCT CTAGTT

SEC ID NO: 40

20 Secuencia de nucleótido del vector de expresión HCVHESp20

1 CTAGAGAGGT CTGGTGGAGC CTGCAAAAGT CCAGCTTTCA AAGGAACACA
 51 GAAGTATGTG TATGGAATAT TAGAAGATGT TGCTTTTACT CTTAAGTTGG
 101 TTCTAGGAA AAATAGTTAA ATACTGTGAC TTTAAAATGT GAGAGGGTTT
 151 TCAAGTACTC ATTTTTTTTAA ATGTCCAAAA TTTTGTCAA TCAATTTGAG

201 GTCTTGTTTG TGTAGAACTG ACATTACTTA AAGTTTAAOC GAGGAATGGG
251 AGTGAGGCTC TCTCATAOCC TATTCAGAAC TGACTTTTAA CAATAATAAA
301 TTAAGTTTAA AATATTTTTTA AATGAATTGA GCAATGTTGA GTTGGAGTCA
351 AGATGGCOGA TCAGAACCAG AACACCTGCA GCAGCTGGCA GGAAGCAGGT
5 401 CATGTGGCAA GGCTATTTGG GGAAGGGAAA ATAAAACCAC TAGGTAAACT
451 TGTAGCTGTG GTTTGAAGAA GTGGTTTTGA AACACTCTGT CCAGCCCCAC
501 CAAACCGAAA GTCCAGGCTG AGCAAAACAC CAOCTGGGTA ATTTGCATTT
551 CTAAAAATAAG TTGAGGATTC AGCOGAAACT GGAGAGGTCC TCTTTTAACT
601 TATTGAGTTC AACCTTTTAA TTTTAGCTTG AGTAGTTCTA GTTTCOCCAA
10 651 ACTTAAGTTT ATCGACTTCT AAAATGTATT TAAGCTTTCT GGGGCAGGCC
701 AGGCTGACC TTGGCTTTGG GGCAGGGAGG GGGCTAAGGT GAGGCAGGTG
751 GCGCCAGCCA GGTGCACACC CAATGCCCAT GAGCCCAGAC ACTGGACGCT
801 GAACTGCGG GACAGTTAAG AACCAGGGG CCTCTGCGOC CTGGGCCOCAG
851 CTCTGTCCCA CACCGGGTC ACATGGCACC ACCTCTCTTG CAGCCTCCAC
15 901 CAAGGGCOCA TCGGTCTTCC OCCTGGCACC CTCTCCAAG AGCACCTCTG
951 GGGGCACAGC GGCCCTGGGC TGCCTGGTCA AGGACTACTT CCCCGAACCG
1001 GTGACGGTGT CGTGGAATC AGGCGCCCTG ACCAGCGGOG TGCACACCTT
1051 CCGGGCTGTC CTACAGTCTT CAGGACTCTA CTCCCTCAGC AGCGTGGTGA
1101 CCGTGCCCTC CAGCAGCTTG GGCACCCAGA CCTACATCTG CAACGTGAAT
20 1151 CACAAGCCCA GCAACACCAA GGTGGACAAG AGAGTTGGTG AGAGGOCAGC
1201 ACAGGGAGGG AGGGTGTCTG CTGGAAGCCA GGCTCAGCGC TCCTGCOCTGG
1251 ACGCATCCCG GCTATGCAGT CCCAGTOCAG GGCAGCAAGG CAGGCCCGGT
1301 CTGCTCTTTC ACCCGGAGGC CTCTGCCCGC CCCACTCATG CTCAGGGAGA
1351 GGGTCTTCTG GCTTTTTCCC CAGGCTCTGG GCAGGCACAG GCTAGGTGOC

158
167

1401 CCTAACCAG GCOCTGCACA CAAAGGGGCA GGTGCTGGGC TCAGAOCTGC
1451 CAAGAGCCAT ATCOGGGAGG ACCCTGCCCC TGACCTAAGC CCACCCCAAA
1501 GGCCAAACTC TCCACTCCCT CAGCTCGGAC ACCTTCTCTC CTCCCAGATT
1551 CCAGTAACTC CCAATCTTCT CTCTGCAGAG CCCAAATCTT GTGACAAAAC
5 1601 TCACACATGC CCACCGTGCC CAGGTAAGCC AGCCCAGGCC TCGCCCTOCA
1651 GCTCAAGGCG GGACAGGTGC CCTAGAGTAG OCTGCATCCA GGGACAGGCC
1701 CCAGCCGGGT GCTGACAAGT CCACCTCCAT CTCTTCTCTA GCACCTGAAC
1751 TCCTGGGGGG ACOGTCAGTC TTCCTCTTCC CCCCAAAACC CAAGGACACC
1801 CTCATGATCT CCOGGACCCC TGAGGTCACA TGGGTGGTGG TGGACGTGAG
10 1851 CCACGAAGAC CCTGAGGTCA AGTTCAACTG GTACGTGGAC GGCCTGGAGG
1901 TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG AGCAGTACAA CAGCAAGTAC
1951 CGTGTGGTCA GCGTCTCAC CGTCTGCAC CAGGACTGGC TGAATGGCAA
2001 GGAGTACAAG TGCAAGGTCT CCAACAAAGC CCTCCCAGCC CCATOGAGA
2051 AAACCATCTC CAAAGCCAAA GGTGGGACCC GTGGGGTGGG AGGGCCACAT
15 2101 GGACAGAGGC CGGCTGGCC CACCTCTGC CCTGAGAGTG ACOGCTGTAC
2151 CAACTCTGT CCTACAGGG CAGCCCCGAG AACACAGGT GTACACCTG
2201 CCCCATCCC GGGAGGAGAT GAACAAGAAC CAGGTCAGCC TGACCTGCT
2251 GGTCAAAGGC TTCTATCOCA GCGACATGC CGTGGAGTGG GAGAGCAATG
2301 GGCAGCCGGA GAACAACTAC AAGACCACGC CTCCCGTGCT GGACTIONGAC
20 2351 GGCTCCFTCT TCCTCTATAG CAAGCTCACC GTGGACAAGA GCAGGTGGCA
2401 GCAGGGGAAC GTCTTCTCAT GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAACC
2451 ACTACACGCA GAAGAGCCTC TCCCTGTCCC CGGGTAAATG AGTGCGACGG
2501 CCGGCAAGCC CCGCTCCCC GGGCTCTGCG GTTCGCACGA GGATGCTTGG
2551 CAGGTACCCC GTCTACATAC TTCCCAGGCA CCCAGCATGG AAATAAGCA

2601 CCCAOCCTG CCCTGGGOC CTGOGAGACT GTGATGGTTC TTTOCAOGGG
 2651 TCAGGCCGAG TCTGAGGOCT GAGTGGCATG AGGGAGGCAG AGCGGGTCCC
 2701 ACTGTCCCA CACTGGCCA GGCTGTGCAG GTGTGCCTGG GCGCCTAGG
 2751 GTGGGGCTCA GCCAGGGCT GCGCTCGGCA GGGTGGGGGA TTTGCCAGCG
 5 2801 TGGCCCTOCC TCCAGCAGCA GCTGCCCTGG GCTGGGCAC GAGAAGCCCT
 2851 AGGAGCCOCT GGGGACAGAC ACACAGCCCC TGCTCTGTA GGAGACTGTC
 2901 CTGTCTGTG AGCGCCCTGT OCTOOGACCC CGATGCCAC TCGGGGGCAT
 2951 GCTAGTCCA TGCGGTAGG GACAGGCCCT CCTCACCCA TCTACCCCCA
 3001 CGGCACTAAC CCCTGGCAGC OCTGCCAGC CTGCACCCG CATGGGGACA
 10 3051 CAACCGACTC CGGGGACATG CACTCTCGGG CCCTGTGGAG GGACTGGTGC
 3101 AGATGCCAC ACACACTC AGOOCAGACC CGTTCAACAA ACCCGCACT
 3151 GAGGTGGTC GAGGGGAGT GGGCCAGAG CCTGCCTCGG CCGTCAGGA
 3201 GGACTCCGG GCTACTCGA AGGAGGTGC ACCATTTAG CTTTGGTAGC
 3251 TTTTCTCTT CTTTAAAT TTCTAAAGCT CATTAATTGT CTTTGATGT
 15 3301 TCTTTGTGA TGACAATAAA ATATCTTTT TAAGTCTGT ACTTCGTGAT
 3351 GGGAGCCGCC TTCTGTGTC CACGCGCTC CTGCCCCCGG TGGGAAGCAC
 3401 GGTGAGGAG AGGCTGGTCC AGCTGCACT CCGGGGCTCC CTGCACTGCG
 3451 CCCCCGCTC CTGCAGCCAC AGCATTGCC CGAGCGAOC TCCCTGGGCC
 3501 CTGTCACTAC ATGGAOCCCT GGGGCTTCTC CTCTTTTCTA CATGGATGCA
 20 3551 GTTCTCTCTC CTGCTGGGCA CGGTGCTGCC TGCCCTGGTC ACTCTGCGGG
 3601 GGACAGGGCC TCAGGGAAA GCTGGGTGCA GGCTGGGAGC TGGCTCAGGC
 3651 TGGCCAGGCA GAGCCACAGG GAGGGCCTTC CAGAACCAAC CATGGTCCGA
 3701 AGCGAGAGGT GGTGTGAGA TCAGACATG ATAAGATACA TTGATGAGTT
 3751 TGGACAAACC ACAACTAGAA TGCAGTGAAA AAAATGCTTT ATTTGTGAAA

120
169

3801 TTGTGATGC TATTGCTTTA TTGTAAACCA TTATAAGCTG CAATAAACAA
3851 GTTAACAACA ACAATTGCAT TCATTTTATG TTTCAGGTC AGGGGGAGGT
3901 GTGGGAGGTT TTTTAAAGCA AGTAAACCT CTACAAATGT GGTATGGCTG
3951 ATTATGATCT CTAGTCAAGG CACTATACAT CAAATATTCC TTATTAACCC
5 4001 CTTTACAAAT TAAAAAGCTA AAGGTACACA ATTTTGTAGC ATAGTTATTA
4051 ATAGCAGACA CTCATGCTT GTGTGGAGTA AGAAAAACA GTATGTTATG
4101 ATTATAACTG TTATGCTTAC TTATAAAGGT TACAGAATAT TTTTCCATAA
4151 TTTTCTGTGA TAGCAGTGCA GCTTTTCTCT TTGTGGTGTA AATAGCAAAG
4201 CAAGCAAGAG TTCTATTACT AAACACAGCA TGAATCAAAA AACTTAGCAA
10 4251 TTCTGAAGGA AAGTCTTGG GGTCTTCTAC CTTTCTCTTC TTTTTTGGAG
4301 GAGTAGAATG TTGAGAGTCA GCAGTAGCCT CATCATCACT AGATGGCATT
4351 TCTTCTGAGC AAAACAGGTT TTCTCATTA AAGGCATTCC ACCACTGCTC
4401 CCATTCATCA GTTCCATAGG TTGGAATCTA AAATACACAA ACAATTAGAA
4451 TCAGTAGTGT AACACATTAT AACTTAAAA ATTTTATATT TACCTTAGAG
15 4501 CTTTAAATCT CTGTAGGTAG TTTGTCCAAT TATGTCACAC CACAGAAGTA
4551 AGGTTCTCTC ACAAAGATCC GGACCAAAGC GGCCATCGTG CCTCCCACT
4601 CCTGCAGTTC GGGGGCATGG ATGCGCGGAT AGCGCTGCT GGTTCCTG
4651 ATGCCGACGG ATTTGCACTG CCGGTAGAAC TCCGCGAGGT CGTCCAGCT
4701 CAGGCAGCAG CTGAACCAAC TCGCGAGGGG ATCGAGCCCG GGGTGGGCGA
20 4751 AGAACTCCAG CATGAGATCC CCGCGCTGGA GGATCATCCA GCGGGGTCC
4801 CGGAAAACGA TTCCGAAGCC CAACCTTTCA TAGAAGGCGG CCGTGGAATC
4851 GAAATCTCGT GATGGCAGGT TGGGCGTGGC TTGGTCGGTC ATTTGGAACC
4901 CCAGAGTCCC GCTCAGAAGA ACTCGTCAAG AAGGCGATAG AAGGCGATGC
4951 GCTGCGAATC GGGAGGGGCG ATACCGTAAA GCAAGAGGAA GCGGTCAGCC

171
170

5001 CATTGCGCGC CAAGCTCTTC AGCAATATCA OGGGTAGCCA ACGCTATGTC
5051 CTGATAGCGG TCCGOCACAC CCAGCCGGCC ACAGTCGATG AATOCAGAAA
5101 AGCGGCCATT TTCCACCATG ATATTGGCA AGCAGGCATC GCCATGGGTC
5151 ACGACGAGAT CCTCGOOGTC GGGCATGCGC GCGTTGAGCC TGGOGAACAG
5 5201 TTCGGCTGGC GCGAGCCCT GATGCTCTTC GTCCAGATCA TCCTGATOGA
5251 CAAGACCGGC TTCCATCOGA GTACGTGCTC GCTCGATGCG ATGTTTCGCT
5301 TGGTGGTGA ATGGGCAGGT AGCCGGATCA AGCGTATGCA GCGCCGCAT
5351 TGCATCAGCC ATGATGGATA CTTTCTCGGC AGGAGCAAGG TGAGATGACA
5401 GGAGATCCTG CCCCGGCACT TCGOCCAATA GCAGCCAGTC CCTTCCCGCT
10 5451 TCAGTGACAA CGTCGAGCAC AGCTGCGCAA GGAACGCCCG TCGTGGCCAG
5501 CCAAGATAGC CGCGCTGCTT CGTCTGCAG TTCATTGAGG GCAACGGACA
5551 GGTCGGTCTT GACAAAAGA ACCGGGCGCC CCTGCGCTGA CAGCCGGAAC
5601 ACGGCGGCAT CAGAGCAGCC GATTGTCTGT TGTGCCAGT CATAGCCGAA
5651 TAGCCTCTCC ACCCAAGCGG CCGGAGAACC TCGGTGCAAT CCATCTTGTT
15 5701 CAATCATGCG AAACGATCCT CATCTGTCT CTGATCAGA TCTTGATGCC
5751 CTGCGCCATC AGATCCTTGG CGGCAAGAAA GCCATCCAGT TTACTTTGCA
5801 GGGCTTCCA ACCTTACCAG AGGGGCGCCC AGCTGGCAAT TCCGTTTCG
5851 TTGCTGTCCA TAAACCGCC CAGTCTAGCT ATCGCCATGT AAGCCACTG
5901 CAAGCTAOCCT GCTTCTCTTT TCGCTTGCG TTTTCCCTTG TCCAGATAGC
20 5951 CCAGTAGCTG ACAATCATCC GGGGTCAGCA CCGTTTCTGC GGACTGGCTT
6001 TCTACGTGTT CCGCTTCTTT TAGCAGCCCT TCGGCCCTGA GTGCTTGCGG
6051 CAGCGTGAAG CTTTTTGCAA AAGCTAGGC CTCACAAAAA GCCTCCTCAC
6101 TACTTCTGGA ATAGCTCAGA GCGGAGGCG GCTCGGCCCT CTGCATAAAT
6151 AAAAAAATT AGTCAGOCAT GGGGCGGAGA ATGGGCGGAA CTGGGCGGAG

172
171

6201 TTAGGGGCGG GATGGGCGGA GTTAGGGGCG GGACTATGGT TGCTGACTAA
6251 TTGAGATGCA TGCTTTGCAT ACTTCTGCT GCTGGGGAGC CTGGGGACTT
6301 TOCACAOCTG GTTGCTGACT AATTGAGATG CATGCTTTGC ATACTTCTGC
6351 CTGCTGGGGA GCCTGGGGAC TTTOCACACC CTAAGTGACA CACATTCCAC
5 6401 AGCTGCCTCG CGGTTTTCGG TGATGAAGGT GAAAACCTCT GACACATGCA
6451 GCTOCCGGAG ACGGTCACAG CTTGTCTGTA AGCGGATGCC GGGAGCAGAC
6501 AAGCCCGTCA GGGGCGGTCA GGGGTGTTG GGGGTGTGG GGGGCGAGOC
6551 ATGACCCAGT CACGTAGCGA TAGCGGAGTG TATACTGGCT TAACTATGCG
6601 GCATCAGAGC AGATTGTACT GAGAGTGCAC CATATGCGGT GTGAAATAAC
10 6651 GCACAGATGC GTAAGGAGAA AATACCGCAT CAGGCGCTCT TCCGCTTCT
6701 CGCTCACTGA CTCGCTGGC TCGGTGTTT GGCTGCGGG AGCGGTATCA
6751 GCTCACTCAA AGGCGGTAAT ACGGTTATCC ACAGAATCAG GGGATAACGC
6801 AGGAAAGAAC ATGTGAGCAA AAGGCCAGCA AAAGGCCAGG AACCGTAAAA
6851 AGGCCGCGTT GCTGGGGTTT TTCCATAGGC TCCGCCCCC TGAAGAGCAT
15 6901 CACAAAATC GACGCTCAAG TCAGAGGTGG CGAAACCGA CAGGACTATA
6951 AAGATACCAG GCGTTTCCCC CTGGAAGCTC CCTCGTGGC TCTCTGTTC
7001 CGACCTTGC GCTTACCGA TACCTGTCCG CC TTCTTCC TCCGGGAAGC
7051 GTGGCGCTTT CTCATAGCTC ACGCTGTAGG TATCTCAGTT CCGTGTAGGT
7101 CGTTGCTCC AAGCTGGGCT GTGTGCACGA ACCCCCGTT CAGCCGACC
20 7151 GCTGCGCCTT ATCCGGTAAC TATCGTCTTG AGTCCAACCC GGTAAGACAC
7201 GACTTATCGC CACTGGCAGC AGCCACTGGT AACAGGATTA GCAGAGCGAG
7251 GTATGTAGGC GGTGCTACAG AGTTCTTGAA GTGGTGGCCT AACTACGGCT
7301 AACTAGAAG GACAGTATTT GGTATCTGCG CTCGTCTGAA GCCAGTTACC
7351 TTCGGAAAAA GAGTTGGTAG CTCTTGATCC GGCAACAAA CCACCGCTGG

7401 TAGCGGTGGT TTTTTTGTTT GCAAGCAGCA GATTACGCGC AGAAAAAAG
7451 GATCTCAAGA AGATCCTTTG ATCTTTTCTA CGGGGTCTGA CGCTCAGTGG
7501 AACGAAACT CACGTTAAGG GATTTTGGTC ATGAGATTAT CAAAAAGGAT
7551 CTTCACCTAG ATCCTTTTAA ATTAAAAATG AAGTTTTAAA TCAATCTAAA
5 7601 GTATATATGA GTAAACTTGG TCTGACAGTT ACCAATGCTT AATCAGTGAG
7651 GCACTATCT CAGCGATCTG TCTATTTCGT TCATCCATAG TTGCCTGACT
7701 CCCGTCGTG TAGATAACTA CGATACGGGA GGGCTTACCA TCTGGCCCCA
7751 GTGCTGCAAT GATACCGOGA GACCCAGCT CACCGGCTOC AGATTTATCA
7801 GCAATAAACC AGCCAGCCGG AAGGGCCGAG CGCAGAAGTG GTCTGCAAC
10 7851 TTTATCCGCC TCCATCCAGT CTATTAAATTG TTGCCGGGAA GCTAGAGTAA
7901 GTAGTTGCC AGTTAATAGT TTGCGCAACG TTGTTGCCAT TGCTGCAGGC
7951 ATCGTGGTGT CACGCTCGTC GTTTGGTATG GCTTCATICA GCTCCGGTTC
8001 CCAACGATCA AGGCGAGTTA CATGATCCCC CATGTTGTGC AAAAAAGCGG
8051 TTAGCTOCTT CGGTCCCTCG ATCGTTGTCA GAAGTAAGTT GGCCGCAGTG
15 8101 TTATCACTCA TGGTTATGGC AGCACTGCAT AATTCTCTTA CTGTCATGOC
8151 ATCCGTAAAGT TGCTTTTCTG TGA CTGGTGA G TACTCAACC AAGTCATTCT
8201 GAGAATAGTG TATGCGGCGA CCGAGTTGCT CTTGCCCGGC GTCAACACGG
8251 GATAATACCG CGCCACATAG CAGAACTTTA AAAGTGCTCA TCATTGGAAA
8301 ACGTTCTTCG GGGCGAAAAC TCTCAAGGAT CTTACCGCTG TTGAGATCCA
20 8351 GTTCGATGTA ACCCACTCGT GCACCCAACT GATCTTCAGC ATCTTTTACT
8401 TTCACCAGCG TTTCTGGGTG AGCAAAAACA GGAAGGCAAA ATGCCGCAAA
8451 AAAGGGAATA AGGGCGACAC GGAAATGTTG AATACTCATA CTCTTCCTTT
8501 TTCAATATTA TTGAAGCAAT TATCAGGGTT ATTGTCTCAT GAGCGGATAC
8551 ATATTTGAAT GTATTTAGAA AAATAAACAA ATAGGGGTTC CGCGCACATT

8601 TCCCCGAAAA GTGCCACCTG ACGTCTAAGA AACCATTAAT ATCATGACAT
 8651 TAACCTATAA AAATAGGGGT ATCACGAGGC CCTTTCGTCT TCAAGAATTC
 8701 GAGCTCGGTA CCCATCAGOC AAAAAGCATG CCTGCCACAC AACATCAATT
 8751 TCTGGAAAAC GCTACACTTA ATTATTTCTA GTAGAACAGC TCFTTGGTTT
 5 8801 GCCAAAAAGA ATCACCTATA GTGGCATCTA AGCACAAAAA GGAGAAAAAA
 8851 ATCACAAAGA AATGATTGAG AGGCATAATA AAAATTATCA AAAAATTATG
 8901 AGTTTTACGA TTTCATCTTT TTOCAAGTTG AAATCATAGG GTGGCTTTAA
 8951 CACAGTGACA AGGAATGTGC ATGCTGCCAT TATGGTGCTC TGCTAAAAT
 9001 GGTGGAGOC TTGTCATGCT ACAGAGAAAC TGTACATACAG CAGGGGGTGC
 10 9051 CAAATTTCCA TATTTTTTTA TATCATTGAG CAGGTGCACA GAAGACCAGA
 9101 AAGCACTTTC TATCAGGCTG GCCTTCTCTT TCCTTTCAG TATGAAGCAA
 9151 AAAGTGCCAA TGAACTAGC AATTGTTAAA TTCTTTTTTC AAACAGTATT
 9201 TGTGCTATCA GAACATAGTG CATTCAAAG TCTAGCCTGA GAGAACAACC
 9251 CAGTTTTATT CATTCCTCT ACTACCTCTC TCATTCCAC TGTTTGTGTT
 15 9301 CTCCCTCCA TTTTAATTGT CTATCTAGTC CAACTAAGC ACAOGATCCA
 9351 GTCCACATTA AACACATGT TTTCACTTTA AGTCAAATAC AAGACACCTT
 9401 TAATATCAGC CCTTGTTCAT AATCGTGCTT CTAGTGACTT AATGTACATG
 9451 TCACACTGTA CTGTTGGGTT TTGTGTCTCA TCATGAACAA TGTTGTGAAG
 9501 GTATTAAGTG GAGAGTAAGC AGAATTAGAT TCCTCTAATG ATGCACACCC
 20 9551 AACTAAGAG CAGAAATAAT ATTAAAAATA GAAAAAAAG TTTTACATGA
 9601 GATTTCAAAT ACCCAGGTAT GAGCTGCAGT TTCTTCAAGT TAAAGCATCG
 9651 AGGTTGTCAG TTACACTATT ACAGGAAACA TATGCAGAGT TTTTATTTTA
 9701 GTATATTAGT TTTACATAT GTGGAATTAC TATTAACTA TTCTTCTTTT
 9751 TCAAATGCTT ACCATTGTAA ATGAGTTTGT GACTTTGTGT AGGTGAGTGC

174
173

9801 ACATGACTCT GGATGOCTAA GAGGACTGAA GAAGTTGGAG TTATAGGTAG
 9851 TTTTATICTA CTTGACTGTT CAGTGCTAAA AATACAAC TG AGGTCCTTTA
 9901 AACTGCTGTT CATGAACTTC TTAATTGATA TATCTCATGA GATCTCTAAA
 9951 CTATTTTTAT TATGACACGT TTCACCATT TCACTGTAAC GATT TTTATG
 5 10001 TTTTATATTA ATGTAAC TAT ATGACACTTC CCAAAATCC CATATTCACA
 10051 ATTGAACTGT TTCAAAGTTT TACCTTGACT TATGGGAAAT GAAAACCCAC
 10101 ATTTTATAAT TTTAAAATGA AATGTTTATT TTATATTTCT GCAAATTTCA
 10151 CAAGGAAAGA TTAGTCACTG GTGTGTGAGA GCAGAGGAGC ATAAGAGTTC
 10201 AGGAATAGAA TCATTATGA TTCTGGAGGC AAGGAAGAAC TGATGCCAAG
 10 10251 GTTTCAGTAT AAGAGCAGTA TCCACTGGAA AGGATAAAGT CACTACATCT
 10301 GAGCACAGAG CAGGACATCT ACATAATGAG TGGTCACTAA TGGGCCACTG
 10351 TTACACTGTT ATATGTATAA GGCTCAAGAA TGAGCACTGA GGCTGTAAGG
 10401 TGTATGGGTG AGGACATCAG GATGTAAACC CAGCTCAGGT AGAGGACTCA
 10451 GAGGACAGCA CAGTCAGCAT GAACTAATAA ACATCAGATA AGATAAGGCA
 15 10501 CAAGCTCAGC TATATAGGGT AAGGGATCTT TGTAATCTG ATTGTGCATC
 10551 CAGCTAGT T CAATGTGACT TAGGAAGCC AGTCATATGC AAATCTAGAG
 10601 AAGACTTTAG AGTAGAAATC TGAGGCTCAC CTCACATAAC AGCAAGCGAG
 10651 TGACCAGTTA GTCPTAAGGC ACCACTTCTT AGACATCATG GCTTGGGTGT
 10701 GGACCTTGCC ATTCTTGATG GCAGCTGCCC AAAGTAAGAC ATCAGAAAAA
 20 10751 AGAGTTCCAA GGGGAATTGA AGCAGTTCCA TGAATACTCA CCTTCTGTG
 10801 TTCTTTTCAC AGGTGTCCAG GCAGAGGTGC AGCTGGTGGG GTCAGGAGCC
 10851 GAAGTGAAAA AGCCTGGGGC TTCAGTGAAG GTGTCTGCA AGGCTCTGG
 10901 ATACACATTC ACTAATTATA TTATCCACTG GGTGAAGCAG GAGCCTGGTC
 10951 AGGGCCTTGA ATGGATTGGA TATTTTAATC CTTACAATCA TGGTACTAAG

135
174

136
175

11001 TACAATGAGA AGTTCAAAGG CAGGGCCACA CTAAC TGCAA ACAAATCCAT
11051 CAGCACAGCC TACATGGAGC TCAGCAGCCT GCGCTCTGAG GACACTGCGG
11101 TCTACTACTG TGCAAGATCA GGAOCCTATG CCTGGTTTGA CACCTGGGGC
11151 CAAGGGACCA CGGTCACCGT CTCCTCAGGT AAGAATGGOC ACTCTAGGGC
5 11201 CTTTGTTTTTC TGCTGCTGCC TGTGGGATTT CATGAGCATT GCAAAGTTGT
11251 CCTCGGGACA TGTTCCGAGG GGAOCCTGGC GGA CTGGCCA GGAGGGGACG
11301 GGC ACTGGG TGOC TTGAGG ATCTGGGAGC CTC TGTGGAT TTTCOGATGC
11351 CTTTGAAAAA TGGGACTGAG GTTGGGTGCG TCTGAGACAG TAACTCAGCC
11401 TGGGGGCTTG GTGAAGATCG CCGCACAGCA GCGAGTCCGT GAAATATCTT
10 21451 ATTTAGACTT GTGAGGTGCG CTGTGTGTCA ATTTACATCT TAAATCCTTT
11501 ATTGGCTGGA AAGAGAATTG TTGGAGTGGG TGAATCCAGC CAGGAGGGAC
11551 GCGGGGGGAT CCA

SEC ID NO:41

15 Secuencia de nucleótido del vector de expresión HCVHQSp20

1 CTAGAGAGGT CTGGTGGAGC CTGCAAAAGT CCAGCTTTCA AAGGAACACA
51 GAAGTATGTG TATGGAATAT TAGAAGATGT TGCTTTTACT CTTAAGTTGG
101 TTCCTAGGAA AAATAGTTAA ATACTGTGAC TTTAAAATGT GAGAGGGTTT
151 TCAAGTACTC ATTTTTTTAA ATGTCCAAAA TTTTGTCAA TCAATTTGAG
20 201 GTCTTGTTTG TGTAGAACTG ACATTACTTA AAGTTTAACC GAGGAATGGG
251 AGTGAGGCTC TCTCATACCC TATTCAGAAC TGACTTTTAA CAATAATAAA
301 TTAAGTTTAA AATATTTTTTA AATGAATTGA GCAATGTTGA GTTGAGTCA
351 AGATGGCCGA TCAGAACCAG AACACCTGCA GCAGCTGGCA GGAAGCAGGT
401 CATGTGGCAA GGCTATTTGG GGAAGGGAAA ATAAAACCAC TAGGTAAACT
25 451 TGTAGCTGTG GTTTGAAGAA GTGGTTTTGA AACACTCTGT CCAGCCCCAC

477
186

501 CAAACCGAAA GTCCAGGCTG AGCAAAACAC CACCTGGGTA ATTTGCATTT
551 CTAAAATAAG TTGAGGATTC AGCCGAAACT GGAGAGGTCC TCTTTTAACT
601 TATTGAGTTC AACCTTTTAA TTTTAGCTTG AGTAGTTCTA GTTTCGCCAA
651 ACTTAAGTTT ATCGACTTCT AAAATGTATT TAAGCTTTCT GGGGCAGGCC
5 701 AGGCCTGACC TTGGCTTTGG 000AGGGAGG GGGCTAAGGT GAGGCAGGTG
751 GCGCCAGCCA GGTGCACACC CAATGCCCAT GAGCCCAGAC ACTGGACGCT
801 GAACCTCGCG GACAGTTAAG AACCAGGGG CCTCTGCGCC CTGGGCCCAG
851 CTCTGTCCCA CACCGCGGTC ACATGGCACC ACCTCTCTTG CAGCCTCCAC
901 CAAGGGCCCA TCGGTCTTCC CCCTGGCACC CTCCTCCAAG AGCACCTCTG
10 951 GGGGCACAGC GGCCCTGGGC TGCCTGGTCA AGGACTACTT CCCCGAACCG
1001 GTGACGGTGT CGTGGAATC AGGCGCCCTG ACCAGCGGCG TGCACACCTT
1051 CCCGGCTGTC CTACAGTCCT CAGGACTCTA CTCCCTCAGC AGCGTGGTGA
1101 CCGTGCCCTC CAGCAGCTTG GGCACCCAGA CCTACATCTG CAACGTGAAT
1151 CACAAGCCCA GCAACACCAA GGTGGACAAG AGAGTTGGTG AGAGGCCAGC
15 1201 ACAGGGAGGG AGGGTGTCTG CTGGAAGCCA GGCTCAGCGC TCCTGCCTGG
1251 ACGCATCCCG GCTATGCAGT CCCAGTCCAG GGCAGCAAGG CAGGCCCCGT
1301 CTGCCTCTTC ACCCGGAGGC CTCTGCCCCG CCCACTCATG CTCAGGGAGA
1351 GGGTCTTCTG GCTTTTTTCCC CAGGCTCTGG GCAGGCACAG GCTAGGTGCC
1401 CCTAACCAG GCCCTGCACA CAAAGGGGCA GGTGCTGGGC TCAGACCTGC
20 1451 CAAGAGCCAT ATCCGGGAGG ACCCTGCCCC TGACCTAAGC CCACCCCAA
1501 GGCCAAATC TCCACTCCCT CAGCTCGGAC ACCTTCTCTC CTCCCAGATT
1551 CCAGTAACTC CCAATCTTCT CTCTGCAGAG CCCAAATCTT GTGACAAAAC
1601 TCACACATGC CCACCGTGCC CAGGTAAGCC AGCCCAGGCC TCGCCCTCCA
1651 GCTCAAGGCG GGACAGGTGC CCTAGAGTAG CCTGCATCCA GGGACAGGCC
25 1701 CCAGCCGGGT GCTGACACGT CCACCTCCAT CTCTTCCTCA GCACCTGAAC

128
128

1751 TCCTGGGGGG ACCGTCAGTC TTCCTCTTCC CCCCAAACC CAAGGACACC
1801 CTCATGATCT CCCGGACCCC TGAGGTCACA TGC GTGGTGG TGGACGTGAG
1851 CCACGAAGAC CCTGAGGTCA AGTTCAACTG GTACGTGGAC GCGGTGGAGG
1901 TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG AGCAGTACAA CAGCACGTAC
5 1951 CGTGTGGTCA GCGTCCTCAC CGTCCTGCAC CAGGACTGGC TGAATGGCAA
2001 GGAGTACAAG TGCAAGGTCT CCAACAAAGC CCTCCCAGCC CCCATCGAGA
2051 AAACCATCTC CAAAGCCAAA GGTGGGACCC GTGGGGTGCG AGGGCCACAT
2101 GGACAGAGGC CGGCTCGGCC CACCCTCTGC CCTGAGAGTG ACCGCTGTAC
2151 CAACCTCTGT CCCTACAGGG CAGCCCCGAG AACCACAGGT GTACACCCTG
10 2201 CCCCCATCCC GGGAGGAGAT GACCAAGAAC CAGGTCAGCC TGACCTGCCT
2251 GGTCAAAGGC TTCTATCCCA GCGACATCGC CGTGGAGTGG GAGAGCAATG
2301 GGCAGCCGGA GAACAACTAC AAGACCACGC CTCCCGTGCT GGACTCCGAC
2351 GGCTCCTTCT TCCTCTATAG CAAGCTCACC GTGGACAAGA GCAGGTGGCA
2401 GCAGGGGAAC GTCTTCTCAT GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAACC
15 2451 ACTACACGCA GAAGAGCCTC TCCCTGTCCC CGGGTAAATG AGTGCGACGG
2501 CCGGCAAGCC CCCGCTCCCC GGGCTCTCGC GGTGCGACGA GGATGCTTGG
2551 CACGTACCCC GTCTACATAC TTCCCAGGCA CCCAGCATGG AAATAAAGCA
2601 CCCACCACTG CCCTGGGCCC CTGCGAGACT GTGATGGTTC TTTCCACGGG
2651 TCAGGCCGAG TCTGAGGCCT GAGTGGCATG AGGGAGGCAG AGCGGGTCCC
20 2701 ACTGTCCCCA CACTGGCCCA GGCTGTGCAG GTGTGCCTGG GCCGCCTAGG
2751 GTGGGGCTCA GCCAGGGGCT GCCCTCGGCA GGGTGGGGGA TTTGCCAGCG
2801 TGGCCCTCCC TCCAGCAGCA GCTGCCCTGG GCTGGGCCAC GAGAAGCCCT
2851 AGGAGCCCCT GGGGACAGAC ACACAGCCCC TGCCTCTGTA GGAGACTGTC
2901 CTGTCCTGTG AGCGCCCTGT CCTCCGACCC CGATGCCAC TCGGGGGCAT
25 2951 GCCTAGTCCA TGC GCGTAGG GACAGGCCCT CCCTCACCCA TCTACCCCCA

129
198

3001 CGGCACTAAC CCCTGGCAGC CCTGCCCAGC CTCGCACCCG CATGGGGACA
3051 CAACCGACTC CGGGGACATG CACTCTCGGG CCCTGTGGAG GGA CTGGTGC
3101 AGATGCCCAC ACACACACTC AGCCCAGACC CGTTCAACAA ACCCCGCACT
3151 GAGGTTGGTC GAGCGGGAGT GCGGCCAGAG CCTGCCTCGG CCGTCAGGGA
5 3201 GGA CTCCCGG GCTCACTCGA AGGAGGTGCC ACCATTTT CAG CTTTGGTAGC
3251 TTTTCTTCTT CTTTAAATT TTCTAAAGCT CATTAATTGT CTTTGATGTT
3301 TCTTTTGTGA TGACAATAAA ATATCCTTTT TAAGTCTTGT ACTTCGTGAT
3351 GGGAGCCGCC TTCCTGTGTC CACGCGCCTC CTGCCCCCGG TGGGAAGCAC
3401 GGT CAGGAGG AGGCTGGTCC AGCTGCACCT CGGGGGCTCC CTGCACTCGC
10 3451 CCCCCGCTC CTGCAGCCAC ACGCATTGCC CGAGCGACCC TCCCTGGCCC
3501 CTGTCACTAC ATGGACCCCT GGGGCTTCTC CTCTTTTCTA CATGGATGCA
3551 GTTTCTCCTC CTGCTGGGCA CGGTGCTGCC TGCCCTGGTC ACTCTGCGGG
3601 GGACAGGGCC TCCAGGGAAA GCTGGGTCTGA GGCTGGGAGC TGGCTCAGGC
3651 TGGCCAGGCA GAGCCACAGG GAGGGCCTTC CAGAACCAAC CATGGTCCGA
15 3701 AGCGAGAGGT GGGTGTCTAGA TCCAGACATG ATAAGATACA TTGATGAGTT
3751 TGGACAAACC ACAACTAGAA TGCAGTGAAA AAAATGCCTT ATTTGTGAAA
3801 TTTGTGATGC TATTGCTTTA TTTGTAACCA TTATAAGCTG CAATAAACAA
3851 GTTAACAACA ACAATTGCAT TCATTTTATG TTTCAGGTTC AGGGGGAGGT
3901 GTGGGAGGTT TTTTAAAGCA AGTAAACCT CTACAAATGT GGTATGGCTG
20 3951 ATTATGATCT CTAGTCAAGG CACTATACAT CAAATATTCC TTATTAACCC
4001 CTTTACAAAT TAAAAAGCTA AAGGTACACA ATTTTGTAGC ATAGTTATTA
4051 ATAGCAGACA CTCTATGCCT GTGTGGAGTA AGAAAAACA GTATGTTATG
4101 ATTATAACTG TTATGCCTAC TTATAAAGGT TACAGAATAT TTTTCCATAA
4151 TTTTCTTGTA TAGCAGTGCA GCTTTTTCCT TTGTGGTGTA AATAGCAAAG
25 4201 CAAGCAAGAG TTCTATTACT AAACACAGCA TGA CTCAAAA AACTTAGCAA

4251 TTCTGAAGGA AAGTCCTTGG GGTCTTCTAC CTTTCTCTTC TTTTTTGGAG
4301 GAGTAGAATG TTGAGAGTCA GCAGTAGCCT CATCATCACT AGATGGCATT
4351 TCTTCTGAGC AAAACAGGTT TTCCTCATT AAGGCATTCC ACCACTGCTC
4401 CCATTCATCA GTTCCATAGG TTGGAATCTA AAATACACAA ACAATTAGAA
5 4451 TCAGTAGTTT AACACATTAT ACACZTAAAA ATTTTATATT TACCTTAGAG
4501 CTTTAAATCT CTGTAGGTAG TTTGTCCAAT TATGTCACAC CACAGAAGTA
4551 AGGTTCTTTC ACAAAGATCC GGACCAAAGC GGCCATCGTG CCTCCCCACT
4601 CCTGCAGTTC GGGGGCATGG ATGCGCGGAT AGCCGCTGCT GGTTCCTGG
4651 ATGCCGACGG ATTTGCACTG CCGGTAGAAC TCCGCGAGGT CGTCCAGCCT
10 4701 CAGGCAGCAG CTGAACCAAC TCGCGAGGGG ATCGAGCCCG GGGTGGGCGA
4751 AGAACTCCAG CATGAGATCC CCGCGCTGGA GGATCATCCA GCCGGCGTCC
4801 CGGAAAACGA TTCCGAAGCC CAACCTTTCA TAGAAGGCGG CGGTGGAATC
4851 GAAATCTCGT GATGGCAGGT TGGGCGTCGC TTGGTCGGTC ATTTCGAACC
4901 CCAGAGTCCC GCTCAGAAGA ACTCGTCAAG AAGGCGATAG AAGGCGATGC
15 4951 GCTGCGAATC GGGAGCGGCG ATACCGTAAA GCACGAGGAA GCGGTCAGCC
5001 CATTCGCCGC CAAGCTCTTC AGCAATATCA CGGGTAGCCA ACGCTATGTC
5051 CTGATAGCGG TCCGCCACAC CCAGCCGGCC ACAGTCGATG AATCCAGAAA
5101 AGCGGCCATT TTCCACCATG ATATTGGCA AGCAGGCATC GCCATGGGTC
5151 ACGACGAGAT CCTCGCCGTC GGGCATGCGC GCCTTGAGCC TGGCGAACAG
20 5201 TTCGGCTGGC GCGAGCCCCT GATGCTCTTC GTCCAGATCA TCCTGATCGA
5251 CAAGACCGGC TTCCATCCGA GTACGTGCTC GCTCGATGCG ATGTTTCGCT
5301 TGGTGGTCGA ATGGGCAGGT AGCCGGATCA AGCGTATGCA GCCGCCGCAT
5351 TGCATCAGCC ATGATGGATA CTTTCTCGGC AGGAGCAAGG TGAGATGACA
5401 GGAGATCCTG CCCCGGCACT TCGCCCAATA GCAGCCAGTC CCTTCCCGCT
25 5451 TCAGTGACAA CGTCGAGCAC AGCTGCGCAA GGAACGCCCCG TCGTGGCCAG

✓81
180

5501 CCACGATAGC CGCGCTGCCT CGTCCTGCAG TTCATTCAGG GCACCGGACA
5551 GGTCGGTCTT GACAAAAAGA ACCGGGCGCC CCTGCGCTGA CAGCCGGAAC
5601 ACGGCGGCAT CAGAGCAGCC GATTGTCTGT TGTGCCCAGT CATAGCCGAA
5651 TAGCCTCTCC ACCCAAGCGG CCGGAGAACC TCGTGCAAT CCATCTTGTT
5 5701 CAATCATGCG AAACGATCCT CATCCTGTCT CTTGATCAGA TCTTGATCCC
5751 CTGCGCCATC AGATCCTTGG CGGCAAGAAA GCCATCCAGT TTACTTTGCA
5801 GGGCTTCCCA ACCTTACCAG AGGGCGCCCC AGCTGGCAAT TCCGGTTGCG
5851 TTGCTGTCCA TAAAACCGCC CAGTCTAGCT ATCGCCATGT AAGCCCACTG
5901 CAAGCTACCT GCTTCTCTT TCGCTTGCG TTTCCCTTG TCCAGATAGC
10 5951 CCAGTAGCTG ACATTCATCC GGGGTCAGCA CCGTTTCTGC GGACTGGCTT
6001 TCTACGTGTT CCGCTTCCTT TAGCAGCCCT TCGGCCCTGA GTGCTTGCGG
6051 CAGCGTGAAG CTTTTTGCAA AAGCCTAGGC CTCCAAAAAA GCCTCCTCAC
6101 TACTTCTGGA ATAGCTCAGA GGCCGAGGCG GCCTCGGCCT CTGCATAAAT
6151 AAAAAAATT AGTCAGCCAT GGGGCGGAGA ATGGGCGGAA CTGGGCGGAG
15 6201 TTAGGGGCGG GATGGGCGGA GTTAGGGGCG GGACTATGGT TGCTGACTAA
6251 TTGAGATGCA TGCTTTGCAT ACTTCTGCCT GCTGGGGAGC CTGGGGACTT
6301 TCCACACCTG GTTGCTGACT AATTGAGATG CATGCTTTGC AACTTCTGC
6351 CTGCTGGGGA GCCTGGGGAC TTTCCACACC CTAAGTACA CACATTCCAC
6401 AGCTGCCTCG CGCGTTTCGG TGATGACGGT GAAAACCTCT GACACATGCA
20 6451 GCTCCCGGAG ACGGTCACAG CTTGTCTGTA AGCGGATGCC GGGAGCAGAC
6501 AAGCCCGTCA GGGCGCGTCA GCGGGTGTTG GCGGGTGTCG GGGCGCAGCC
6551 ATGACCCAGT CACGTAGCGA TAGCGGAGTG TATACTGGCT TAACTATGCG
6601 GCATCAGAGC AGATTGTACT GAGAGTGAC CATATGCGGT GTGAAATACC
6651 GCACAGATGC GTAAGGAGAA AATACGCAT CAGGCGCTCT TCCGCTTCCT
25 6701 CGCTCACTGA CTCGCTGCGC TCGGTCGTTT GGCTGCGGCG AGCGGTATCA

482
181

6751 GCTCACTCAA AGGCGGTAAT ACGGTTATCC ACAGAATCAG GGGATAACGC
6801 AGGAAAGAAC ATGTGAGCAA AAGGCCAGCA AAAGGCCAGG AACCGTAAAA
6851 AGGCCGCGTT GCTGGCGTTT TTCCATAGGC TCCGCCCCC TGACGAGCAT
6901 CACAAAATC GACGCTCAAG TCAGAGGTGG CGAAACCCGA CAGGACTATA
5 6951 AAGATACCAG GCGTTTCCCC CTGGAAGCTC CCTCGTGCGC TCTCCTGTTC
7001 CGACCCTGCC GCTTACCGGA TACCTGTCCG CCTTTCTCCC TTCGGGAAGC
7051 GTGGCGCTTT CTCATAGCTC ACGCTGTAGG TATCTCAGTT CGGTGTAGGT
7101 CGTTCGCTCC AAGCTGGGCT GTGTGCACGA ACCCCCCGTT CAGCCCGACC
7151 GCTGCGCCTT ATCCGGTAAC TATCGTCTTG AGTCCAACCC GGTAAGACAC
10 7201 GACTTATCGC CACTGGCAGC AGCCACTGGT AACAGGATTA GCAGAGCGAG
7251 GTATGTAGGC GGTGCTACAG AGTTCTTGAA GTGGTGGCCT AACTACGGCT
7301 AACTAGAAG GACAGTATTT GGTATCTGCG CTCTGCTGAA GCCAGTTACC
7351 TTCGGAAAAA GAGTTGGTAG CTCTTGATCC GGCAAACAAA CCACCGCTGG
7401 TAGCGGTGGT TTTTTTGTTT GCAAGCAGCA GATTACGCGC AGAAAAAAG
15 7451 GATCTCAAGA AGATCCTTTG ATCTTTTCTA CGGGGTCTGA CGCTCAGTGG
7501 AACGAAACT CACGTTAAGG GATTTTGGTC ATGAGATTAT CAAAAGGAT
7551 CTTACCTAG ATCCTTTTAA ATTAAAAATG AAGTTTTTAA TCAATCTAAA
7601 GTATATATGA GTAAACTTGG TCTGACAGTT ACCAATGCTT AATCAGTGAG
7651 GCACCTATCT CAGCGATCTG TCTATTTCTG TCATCCATAG TTGCCTGACT
20 7701 CCCCCTCGTG TAGATAACTA CGATACGGGA GGGCTTACCA TCTGGCCCCA
7751 GTGCTGCAAT GATACCGCGA GACCCACGCT CACCGGCTCC AGATTTATCA
7801 GCAATAAACC AGCCAGCCGG AAGGGCCGAG CGCAGAAGTG GTCCTGCAAC
7851 TTTATCCGCC TCCATCCAGT CTATTAATTG TTGCCGGGAA GCTAGAGTAA
7901 GTAGTTCGCC AGTTAATAGT TTGCGCAACG TTGTTGCCAT TGCTGCAGGC
25 7951 ATCGTGGTGT CACGCTCGTC GTTTGGTATG GCTTCATTCA GCTCCGGTTC

8001 CCAACGATCA AGGCGAGTTA CATGATCCCC CATGTTGTGC AAAAAAGCGG
8051 TTAGCTCCTT CGGTCCTCCG ATCGTTGTCA GAAGTAAGTT GGCCGCAGTG
8101 TTATCACTCA TGGTTATGGC AGCACTGCAT AATTCTCTTA CTGTCATGCC
8151 ATCCGTAAGA TGCTTTTCTG TGA CTGGTGA GTACTCAACC AAGTCATTCT
5 8201 GAGAATAGTG TATGCGGCGA CCGAGTTGCT CTTGCCCGGC GTCAACACGG
8251 GATAATACCG CGCCACATAG CAGAACTTTA AAAGTGCTCA TCATTGGAAA
8301 ACGTTCTTCG GGGCGAAAAC TCTCAAGGAT CTTACCGCTG TTGAGATCCA
8351 GTTCGATGTA ACCCACTCGT GCACCCAAC TATCTTCAGC ATCTTTTACT
8401 TTCACCAGCG TTTCTGGGTG AGCAAAAACA GGAAGGCAAA ATGCCGCAAA
10 8451 AAAGGGAATA AGGGCGACAC GGAAATGTTG AATACTCATA CTCTTCCTTT
8501 TTCAATATTA TTGAAGCATT TATCAGGGTT ATTGTCTCAT GAGCGGATAC
8551 ATATTTGAAT GTA7TTAGAA AAATAAACAA ATAGGGGTTC CGCGCACATT
8601 TCCCCGAAAA GTGCCACCTG ACGTCTAAGA AACCATTATT ATCATGACAT
8651 TAACCTATAA AAATAGGCGT ATCACGAGGC CCTTTCGTCT TCAAGAATTC
15 8701 GAGCTCGGTA CCCATCAGCC AAAAAAGCATG CCTGCCACAC AACATCAATT
8751 TCTGGAAAAC GCTACACTTA ATTATTTCTA GTAGAACAGC TCTTTGGTTT
8801 GCCAAAAAGA ATCACCTATA GTGGCATCTA AGCACAAAAA GGAGAAAAAA
8851 ATCACAAAGA AATGATTGAG AGGCATAATA AAAATTATCA AAAAATTATG
8901 AGTTTTACGA TTTCATCTTT TTCCAAGTTG AAATCATAGG GTGGCTTTAA
20 8951 CACAGTGACA AGGAATGTGC ATGCTGCCAT TATGGTGCTC TGCCTAAAAT
9001 GGTGGAGCC TTGTCATGCT ACAGAGAAAC TGCATACAG CAGGGGGTGC
9051 CAAATTTCCA TATTTTTTTA TATCATTGAG CAGGTGCACA GAAGACCAGA
9101 AAGCACTTTC TATCAGGCTG GCCTTCCTCT TCCTTTCCAG TATGAAGCAA
9151 AAAGTGCCAA TGAACTAGC AATTGTTAAA TTCCTTTTTC AAACAGTATT
25 9201 TGTGCTATCA GAACATAGTG CATTCAAAAG TCTAGCCTGA GAGAACAACC

183
182

184
193

9251 CAGTTTTATT CATTCCTCCT ACTACCTCTC TCATTCCCAC TGTTTGTGTT
9301 CTCCCTCCCA TTTTAATTGT CTATCTAGTC CAAACTAAGC ACACGATCCA
9351 GTCCACATTA AACAAATGT TTCACTTTA AGTCAAATAC AAGACACCTT
9401 TAATATCAGC CCTTGTTTCAT AATCGTGCTT CTAGTGACTT AATGTACATG
5 9451 TCACACTGTA CTGTTGGGTT TTGTGTCTCA TCATGAACAA TGTTGTGAAG
9501 GTATTAAGTG GAGAGTAAGC AGAATTAGAT TCCTCTAATG ATGCACACCC
9551 AACTAAGAG CAGAAATAAT ATTAAAAATA GAAAAAAAAG TTTTACATGA
9601 GATTTCAAAT ACCCAGGTAT GAGCTGCAGT TTCTTCAAGT TAAAGCATCG
9651 AGGTTGTCAG TTACACTATT ACAGGAAACA TATGCAGAGT TTTTATTTTA
10 9701 GTATATTAGT TTTCACATAT GTGGAATTAC TATTAAACTA TTCTTTCTTT
9751 TCAAATGCTT ACCATTGTAA ATGAGTTTGT GACTTTGTGT AGGTGAGTGC
9801 ACATGACTCT GGATGCCTAA GAGGACTGAA GAAGTTGGAG TTATAGGTAG
9851 TTTTATTCTA CTTGACTGTT CAGTGCTAAA AATACAACTG AGGTCCTTTA
9901 AACTGCTGTT CATGAACTTC TTAATTGATA TATCTCATGA GATCTCTAAA
15 9951 CTATTTTTAT TATGACACGT TTCACCATT TCACTGTAAC GATTTTTATG
10001 TTTTATATTA ATGTAACAT ATGACACTTC CCAAATCCC CATATTCACA
10051 ATTGAACTGT TTCAAAGTTT TACCTTGACT TATGGGAAAT GAAAACCCAC
10101 ATTTTATAAT TTTAAAATGA AATGTTTATT TTATATTTCT GCAAATTTCA
10151 CAAGGAAAGA TTAGTCACTG GTGTGTGAGA GCAGAGGAGC ATAAGAGTTC
20 10201 AGGAATAGAA TCCATTATGA TTCTGGAGGC AAGGAAGAAC TGATGCCAAG
10251 GTTTCAGTAT AAGAGCAGTA TCCACTGGAA AGGATAAAGT CACTACATCT
10301 GAGCACAGAG CAGGACATCT ACATAATGAG TGGTCACTAA TGGGCCACTG
10351 TTACACTGTT ATATGTATAA GGCTCAAGAA TGAGCACTGA GGCTGTAAGG
10401 TGTATGGGTG AGGACATCAG GATGTAAACC CAGCTCAGGT AGAGGACTCA
25 10451 GAGGACAGCA CAGTCAGCAT GAACTAATAA ACATCAGATA AGATAAGGCA

185
184

10501 CAAGCTCAGC TATATAGGGT AAGGGATCTT TGTAATCTG ATTGTGCATC
10551 CAGTCTAGTT CAATGTGACT TAGGAAGCCC AGTCATATGC AAATCTAGAG
10601 AAGACTTTAG AGTAGAAATC TGAGGCTCAC CTCACATACC AGCAAGCGAG
10651 TGACCAGTTA GTCTTAAGGC ACCACTTCTT AGACATCATG GCTTGGGTGT
5 10701 GGACCTTGCC ATTCCTGATG GCAGCTGCCC AAAGTAAGAC ATCAGAAAAA
10751 AGAGTTCCAA GGGGAATTGA AGCAGTTCCA TGAATACTCA CCTTCCTGTG
10801 TTCTTTTTCAC AGGTGTCCAG GCACAGGTGC AGCTGGTGGA GTCAGGAGCC
10851 GAAGTGAAAA AGCCTGGGGC TTCAGTGAAG GTGTCCTGCA AGGCCTCTGG
10901 ATACACATTC ACTAATTATA TTATCCACTG GGTGAAGCAG GAGCCTGGTC
10 10951 AGGGCCTTGA ATGGATTGGA TATTTTAATC CTTACAATCA TGGTACTAAG
11001 TACAATGAGA AGTTCAAAGG CAGGGCCACA CTAAGTCAA ACAAATCCAT
11051 CAGCACAGCC TACATGGAGC TCAGCAGCCT GCGCTCTGAG GAACTGCGG
11101 TCTACTACTG TGCAAGATCA GGACCCTATG CCTGGTTTGA CACCTGGGGC
11151 CAAGGGACCA CGGTCACCGT CTCCTCAGGT AAGAATGGCC ACTCTAGGGC
15 11201 CTTTGTTTTT TGCTGCTGCC TGTGGGATTT CATGAGCATT GCAAAGTTGT
11251 CCTCGGGACA TGTTCCGAGG GGACCTGGGC GGACTGGCCA GGAGGGGACG
11301 GGCACCTGGG TGCCTTGAGG ATCTGGGAGC CTCTGTGGAT TTTCCGATGC
11351 CTTTGAAAAA TGGGACTGAG GTTGGGTGCG TCTGAGACAG TAACTCAGCC
11401 TGGGGGCTTG GTGAAGATCG CCGCACAGCA GCGAGTCCGT GAAATATCTT
20 11451 ATTTAGACTT GTGAGGTGCG CTGTGTGTCA ATTTACATCT TAAATCCTTT
11501 ATTGGCTGGA AAGAGAATTG TTGGAGTGGG TGAATCCAGC CAGGAGGGAC
11551 GCGGGGGGAT CCA

EJEMPLO 9**Eficacia *in vitro* de los anticuerpos humanizados de enlace
DC45R0/RB****5 VHE/humV1 y VHQ/humV1**

Para determinar la eficacia de los anticuerpos humanizados de
enlace CD45R0/RB humanizados VHE/humV1 y VHQ/humV1 en
comparación con el anticuerpo quimérico, se analizó la habilidad del
anticuerpo para inducir apoptosis en células T humanas y también la
10 habilidad para inhibir la proliferación de las células T humanas.

Células y reactivos

Se aislaron células mononucleares sanguíneas Periféricas
(PBMC) de muestras de leucoféresis de donadores humanos sanos
15 con tipo sanguíneo conocido, pero tipo HLA desconocido a través de
centrifugación en Ficoll-Hypaque (Pharmacia LKB). El PBMC se
utiliza como los estimuladores que se consumieron primero para
células T y NK utilizando perlas ferromagnéticas cubiertas con CD3
(Miltenyi). Las perlas y las células de contaminación se removieron a
20 través de un campo magnético. El PBMC consumido de las células T
se utilizó como células que responden después de la irradiación (50
Gy). Las células T CD4+ se utilizaron como células que responden en
MLR y se aislaron de PBMC con un equipo de selección negativo de
células T CD4 (Miltenyi). Las células obtenidas se analizaron a
25 través de FACScan o FACSCalibur (Becton Dickinson & Co., CA) y la

pureza de las células obtenidas es de >75%. Las células se suspendieron en medio RPM11640 suplementado con 10% de FCS inactivado con calor, penicilina, estreptomina y L-glutamina.

5 Ensayos de apoptosis

Se cultivó PBMC humano de tres donadores voluntarios sanos en medio de crecimiento (RPM11640+10% FCS) durante la noche (<16 horas) en presencia de mAB quimérico de enlace CD45R0/RB, anticuerpos humanizados (VHE/humV1 y VHQ/humV1) o mAb de control anti-LPS. Si se indicó, se incluyó un reactivo de entrelazamiento, un fragmento de IgG anti-humano de cabra F(ab')₂ (Cat. No. 109-006-098, JacksonLab) a una concentración µg/ml siendo dos veces más alta que la concentración de los anticuerpos anti-CD45 de la muestra. La concentración PBS en todas las cavidades introducida a través de los reactivos del anticuerpo se mantuvo constante entre todas las muestras, principalmente un 20% de las muestras (v/v) para muestras sin un entrelazador o un 40% (v/v) para muestras con entrelazador. Los experimentos anteriores demuestran que la cantidad de PBS no afecta la lectura.

Después del cultivo durante la noche en la presencia de los anticuerpos, las muestras se sometieron a análisis de citometría de flujo y se tiñeron con el marcador de apoptosis AnnexinV-FtTC (Cat. No. 556419, BD/Pharmingen) y el marcador de célula T CD2-PE (Cat. No. 556609, BD/Pharmingen). Las muestras se corrieron en un instrumento FACSCalibur de Becton Dickinson y los datos se

148
187

analizaron utilizando el software CellQuest Pro.

Para los datos recolectados, las curvas se ajustaron utilizando el software Origin v7.0300. La ecuación utilizada para el ajuste es

$$5 \quad Y = \frac{A_1 - A_2}{1 + (x / x_0)^p} + A_2 \text{ ("Logística Sigmoid")}$$

A_1 : valor final (para ajustar las sesiones establecidas para "compartido" y "flotado")

10

A_2 : valor inicial (para ajustar las sesiones establecidas para "compartido" y "flotado")

p : energía

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

15

En ausencia del entrelazador, VHE/humV1 es más efectivo, con un valor ED_{50} de 148 ± 71 nM, seguido por VHQ/humV1 con 377 ± 219 nM. El anticuerpo quimérico de enlace CD45RB/RO es menos efectivo con un valor ED_{50} de 2440 ± 1205 nM.

20

En presencia de un antisuero entrelazador, los valores ED_{50} son intercambian dramáticamente hacia una eficiencia más alta a través de por lo menos dos órdenes de magnitud. Además, la presencia del entrelazador permitió niveles más altos de una apoptosis a concentraciones de anticuerpo muy altas, ahora alcanzando hasta 80%, mientras la ausencia del entrelazador solamente permitió hasta 50% de apoptosis. En presencia del

25

entrelazador, las curvas (concentración de anticuerpo/% de apoptosis) son bi-modales con dos niveles: el primer nivel se alcanzó

a concentraciones de anticuerpo bajas (~ 5 nM), en donde el nivel de apoptosis corresponde al nivel máximo obtenido en la ausencia del entrelazador. El segundo nivel se alcanzó a concentraciones de anticuerpo muy altas (aproximadamente 500 nM) y la apoptosis se observó dentro del 70-80% de la población de las células T.

Ambos mAb humanizados de enlace CD45R0/RB son igualmente efectivos y mejores o iguales comparados con el mAb quimérico de enlace CD45R0/RB con respecto a su habilidad para inducir apoptosis en células T humanas primarias.

10

Ensayos de Reacción de Linfocitos Mezclados

Se mezclaron 1×10^5 PBMC o 5×10^4 de células CD4+ con PBMC consumido por irradiación 1×10^5 o 5×10^4 células T (50 Gy) en cada cavidad de placas de cultivo de 96 cavidades en la presencia o ausencia de diferentes concentraciones de mAb.

15

Las células mezcladas se cultivaron durante 5 días y la proliferación se determinó pulsando las células con 3H-timidina durante las últimas 16-20 horas del cultivo. La inhibición MLR en cada concentración del anticuerpo se expresó como porcentaje de inhibición como se describe en el Ejemplo 2.

20

El efecto de concentraciones en aumento de VHE/humV1 y VHQ/humV1 en MLR se evaluó en tres respondedores: combinaciones de estimulador. Todos los anticuerpos inhibieron el MLR en una forma dependiente de la dosis. Los valores IC_{50} (ver más adelante) son similares para VHE/humV1 (7 ± 7 nM) y VHQ/humV1 (39 ± 54 nM)

25

de Ab humanizado. Ambos anticuerpos humanizados son más potentes en la inhibición de MLR que el anticuerpo quimérico padre (IC_{50} de 347 ± 434 nM). Como se ve usualmente con los experimentos MLR, la variabilidad del donador es alta en estos experimentos.

5

VHE-N73D/humV1

Para dirigir el efecto biológico de VHE-N73D/humV1 que induce apoptosis en células mononucleares de sangre periférica (PBMC), el PBMC objetivo se incubó durante la noche en presencia de varias

10 concentraciones de VHE-N73D/humV1 y se analizaron substancialmente para el enlace del marcador de apoptosis AnnexinV mediante el análisis de citometría de flujo: el PBMC humano se incubó durante la noche en 1 ml de medio de cultivo de tejido conteniendo varias concentraciones de ya sea VHE- N73D/humV1, u

15 otra variante de la molécula humanizada de enlace CD45RO/RB , VHE/humV1, o mAb anti-CD45RO/RB quimérico, o un mAb de control IgG1 de isótopo. Además, se agregaron los fragmentos F(ab')₂ de entrelazamiento de Ig Fc de anti-humanos de cabra a 2x la concentración de la masa de cada mAb, imitando el entrelazamiento

20 de las moléculas de enlace CD45RO/RB a través de receptores Fc, lo que puede ocurrir *in vivo*. Al día siguiente, las células se lavaron a través de centrifugación durante 10 minutos a 400 veces la fuerza de gravedad estándar (g) y el medio se removió. Las células se volvieron a suspender en regulador de pH FACS (PBS conteniendo

25 1% v/v de FBS, 0. 1% p/v de EDTA y 0.1% p/v azida de sodio) y se

sembraron en placas de microtitulación de fondo en V de 96 cavidades a una densidad de célula de 1×10^5 células por cavidad. Cada muestra de células se incubó durante 30 minutos a 4°C en 50 μl de regulador de pH FACS conteniendo 100 $\mu\text{g/ml}$ de suero de ratón normal para bloquear los sitios de enlace no específicos en las células y con CD2 conjugado con ficoeritrina (PE) para identificar las células humanas. Después de lavar dos veces a través de centrifugación, las células se volvieron a suspender en 100 μl de regulador de pH de tinción AnnexinV competente de calcio (Vendedor BD/Pharmingen equipo 558419) conteniendo 1:100 v/v de AnnexinV marcado con FITC. Después de la incubación durante 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad, se agregó, 7-amino actinomicina D (7-AAD) a una concentración final de 1 $\mu\text{g/ml}$ y se analizó utilizando un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson). Los valores ED_{50} para la eficacia del anticuerpo para inducir apoptosis se pueden calcular de un análisis de la cantidad de apoptosis (= intensidad de fluorescencia FITC de AnnexinV) inducida como una función de la concentración del anticuerpo utilizando el software Origin 7.5 con la ecuación de ajuste de curva Sigmoidal/Logística.

Después de dichos análisis, se observó un efecto de dos fases de todas las moléculas de enlace CD45RO/RB probadas: a concentraciones muy bajas del anticuerpo, se encontró un nivel bajo de menos de 30% de apoptosis de célula T. El valor ED_{50} para alcanzar este nivel de apoptosis se calculó como 0.31 ± 0.13 nM para

142
[a]

VHE-N73D/humV1. A concentraciones más altas de anticuerpo, la apoptosis se puede inducir en hasta un 70% de las células T. El valor ED_{50} para alcanzar este nivel más alto de apoptosis se calculó como 352 ± 83 nM para VHE-N73D/humV1. En resumen, se encontró
5 que VHE-N73D/humV1 también induce apoptosis en células T humanas, la cual puede mejorarse a través de entrelazamiento.

EJEMPLO 10

Especificidad de la molécula de enlace CD45RB/RO

10

Molécula de enlace CD45RB/RO quimérica

La molécula CD45 se expresó en todos los leucocitos. Sin embargo, se expresaron diferentes isoformas CD45 a través de los varios subgrupos de leucocitos. Con el fin de determinar la
15 reactividad del subgrupo de leucocitos de la molécula del anticuerpo quimérico de enlace CD45RB/RO inmunofluorescentemente marcada de leucocitos humanos con marcadores específicos del subgrupo y se llevó a cabo la marcación inmunofluorescente subsiguiente con un conjugado de anticuerpo quimérico de enlace CD45RB/RO con
20 colorante, seguido por análisis de citometría de flujo.

Brevemente, se identificaron los subgrupos específicos de una preparación nuevamente aislada de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC), plaquetas humanas, neutrófilos de sangre periférica humana o células de tallo hematopoyéticas derivadas de
25 médula espinal a través de incubación con anticuerpos acoplados a

193
192

ficoeritrina contra CD2 (linfocitos T), CD14 (monocitos), CD19 (linfocitos B), CD34 (células de tallo), CD42a (plaquetas), CD56 (células aniquiladoras naturales) o CD66b (granulocitos). El enlace simultáneo de una molécula de enlace CD45RB/RO quimérica
5 marcada FITC se detectó en linfocitos T, monocitos, células de tallo, células aniquiladoras naturales y granulocitos, pero no en plaquetas o linfocitos B.

VHE-N73D/humV1

10 Con el fin de determinar la reactividad del subgrupo de leucocitos VHE-N73D/humV1 inmunofluorescentemente marcados de leucocitos humanos con marcadores específicos del subgrupo y la simultánea inmunofluorescente marcación con un VHE-N73D/humV1 conjugado con colorante se llevó a cabo, seguida por el análisis de
15 citometría de flujo.

Brevemente, los subgrupos específicos de una preparación nuevamente aislada de células mononucleares de sangre periférica humanas (PBMC) o neutrófilos de sangre periférica humana se identificaron dependiendo de la incubación con anticuerpos
20 acoplados a ficoeritrina contra CD3, CD4, CD8 (linfocitos T), CD14 (monocitos), CD16 (células aniquiladoras naturales y monocitos), CD19 (linfocitos B), o CD66b (granulocitos). El enlace simultáneo de VHE-N73D/humV1 marcado con FITC se detectó en linfocitos T, monocitos, células aniquiladoras naturales y granulocitos, pero no en
25 linfocitos B. De esta forma, las moléculas VHE-N73D/humV1 no

reaccionan con linfocitos B humanos.

EJEMPLO 11

Inducción *in vitro* de células T supresoras (células T reguladoras) y de células T funcionalmente paralizadas

Para demostrar la habilidad de un anticuerpo quimérico de enlace CD45RO/RB para inducir células T supresoras, el anticuerpo se incluye a varias concentraciones durante la generación de líneas de células T CD8+ reactivas con la proteína 1 de matriz de antígeno (MP1) de influenza hemofíllica. Estas líneas se generan a través del co-cultivo repetido de linfocitos humanos CD8+ con monocitos humanos CD14+ pulsados con el antígeno. Después, en monocitos CD14+ se pueden reemplazar con una línea de células positivas de antígeno-2 de leucocito como el antígeno MP1 que presenta una célula (APC). Si dichas células T CD8+ específicas de MP1 de un cultivo que incluye el anticuerpo quimérico de enlace CD45RO/RB se mezcla con células T CD8+ humanas nuevamente aisladas y esta mezcla de células se estimula con el antígeno MP1 en APC, la adición de células T CD8+ del cultivo en la presencia de la molécula de enlace CD45RO/RB es capaz de reducir la producción de IFN- γ en una forma dependiente de dosis de anticuerpo. Ningún anticuerpo quimérico de enlace CD45RO/RB está presente durante este cultivo de ensayo IFN- γ , indicando que el pretratamiento con el mAb CD45RO/RB mAb ha inducido células T CD8+ capaces de suprimir la

activación de células T nuevamente aisladas. Debido a esta inducción de células reguladoras T supresoras a través del anticuerpo quimérico de enlace CD45RO/RB, el anticuerpo puede ser útil en enfermedades en donde se cree que una población de células T no reguladas y/o activadas contribuye a la patología. Ejemplos de dichas enfermedades incluyen enfermedades autoinmunes, rechazo al trasplante, psoriasis, dermatitis, enfermedad de los intestinos inflamatoria y alergias.

Para demostrar la habilidad de una molécula quimérica de enlace CD45RO/RB para convertir las células T hiporesponsivas (anérgicas) a estimulación adicional, es decir en células T funcionalmente paralizadas, el anticuerpo se incluye durante la generación de líneas de células T CD8+ reactivas con la proteína 1 de matriz del antígeno (MP1) de influenza hemofílica como se mencionó anteriormente. La parálisis se evalúa activando las células T (expuestas antes al anticuerpo quimérico de enlace CD45RO/RB) con el antígeno MP1 presentado a través de APC. Ninguna molécula de enlace CD45RO/RB está presente en este cultivo. Las células T CD8+ T no expuestas al anticuerpo quimérico de enlace CD45RO/RB previamente producen IFN- γ dependiendo del estímulo mencionado. En contraste, las células T CD8+ pretratadas con el anticuerpo quimérico de enlace CD45RO/RB muestran marcadamente reducidos en la producción inexistente de esta citocina en respuesta al estímulo del antígeno, demostrando la habilidad del anticuerpo quimérico de enlace CD45RO/RB para funcionalmente paralizar las

186
195

células T humanas. Debido a esta inducción de la hiporesponsividad de célula T funcional a través de la molécula de enlace CD45RO/RB, el anticuerpo se puede utilizar en enfermedades, tales como enfermedades autoinmunes, rechazo al trasplante, psoriasis, dermatitis, enfermedad del intestino inflamatoria o alergias, en donde una población de células T activada se cree que contribuye a la patología.

EJEMPLO 12

10 Estudios *in vivo* en piel de ratones SCID-hu

El beneficio terapéutico del anticuerpo quimérico de enlace CD45RB/RO en la inflamación de la piel se probó utilizando ratones SCID. La piel humana de individuos normales se trasplantó en ratones SCID (Piel SCID-hu) y el proceso inflamatorio se imitó a través de la transferencia adoptiva de leucocitos mononucleares aislados de individuos humanos no relacionados con el donador de la piel humana.

20 *Trasplante de piel de adulto humano en ratones SCID (Piel de ratones SCID-hu)*

Dos pequeñas piezas de piel de adulto humano (1 cm²) (obtenidas del Banco de Tejido Regional del Este de Hungría; WHRTB, Gyor) consistiendo de epidermis completa, la dermis papilar y parte de la dermis reticular, se trasplantaron en los lados traseros

superior derecho e izquierdo de ratones SCIDC C.B 17/ratones GbmsTac-Prkdc^{scid} Lyst^{bs} (Taconic, Germantown, NY) en reemplazo de piel de ratón. La calidad de los injertos se monitoreó durante 5-6 semanas después del trasplante y los ratones exitosamente trasplantados (piel de ratones SCID-hu, generalmente >85%) se seleccionaron para pruebas *in vivo* del anticuerpo quimérico de enlace CD45RB/RO.

Injerto de células mononucleares en ratones SCID

10 Los leucocitos mononucleares (Spl) se aislaron de biopsias de bazo de adultos humanos (WHRTB, Gyor) después de la suspensión de la célula (utilizando un tamiz molecular de disociación de célula equipado con una malla de tamaño 50) y procedimientos de gradiente de densidad estándar. Las alícuotas de 5×10^6 Spl se volvieron a
15 suspender en 1.5 ml de RPMI-10% FCS y se inyectaron peritonealmente (i.p.), en el día 0 del experimento, dentro de la piel de los ratones SCID-hu. Estos números de Spl se han encontrado en experimentos previos como siendo suficientes para inducer un xeno-GvHD letal en >90% de los ratones dentro de las 4-6 semanas
20 después de la transferencia de célula.

Tratamiento de anticuerpo de piel de ratones SCID-hu

La piel de ratones SCID-hu, reconstituida con Spl humano, se trató con el anticuerpo quimérico de enlace CD45RB/RO o mAb de
25 control anti-LPS en el día 0, inmediatamente después de la inyección

198
197

de la célula mononuclear, en los días 3 y 7 e intervalos semanales de ahí en adelante. Los anticuerpos se distribuyeron subcutáneamente (s.c.) en 100 μ l de PBS a una concentración final de 1 mg/kg del peso del cuerpo (p.c.).

5

Evaluación del tratamiento anti-CD45

La eficacia del anticuerpo quimérico de enlace CD45RB/RO se evalúa a través de la supervivencia de los ratones trasplantados y mediante el monitoreo del rechazo de injertos de piel. La importancia de los resultados se evalúa a través del método estadístico de análisis de supervivencia utilizando la prueba Log-rank (método Mantel) con la ayuda del software Systat v10. Al final de experimento las biopsias de los injertos de piel humana y de hígado, pulmón, riñón y bazo de ratón se obtuvieron de ratones sacrificados para propósitos histológicos. Todos los ratones se pesaron al inicio (antes de la transferencia de la célula) y a lo largo del experimento (cada dos días) como una estimación indirecta de su estado de salud. Las líneas de regresión lineal se generaron utilizando el peso del cuerpo contra los valores de los días después de la transferencia PBMC obtenidos de cada ratón y subsecuentemente, sus inclinaciones (control contra ratones tratados con anti-CD45) se compararon utilizando la prueba Mann-Whitney no paramétrica.

10

15

20

Resultados

25

Los injertos de piel humana son muy bien tolerados a través de

ratones SCID. Inicialmente, los injertos experimentaron un período de hiperproliferación de queratinocito dando como resultado la formación de costras hiperqueratóticas. Alrededor de 5 semanas después del trasplante, las costras se cayeron de los injerto y
5 revelaron un tejido conteniendo todas las estructuras características observadas en piel humana normal. Durante este proceso, los injertos de piel humana se fusionaron con la piel adyacente del ratón y generaron una red de vasos humanos nuevamente creados que conectan los injertos con el tejido del ratón subyacente. El Spl
10 humano en circulación dentro de la piel del ratón SCID-hu (en el día experimental 0, aproximadamente 6 semanas después del trasplante de piel) si infiltró en los injertos de piel y después del reconocimiento las moléculas de aloantígeno expresadas en la piel humana montaron una respuesta inflamatoria, que tiene semejanza
15 con el proceso inflamatorio de la piel que ocurre en piel psoriática, y esta en algunos casos completamente destruye el injerto.

El tratamiento de estos ratones con el anticuerpo quimérico de enlace CD45RB/RO suprime el proceso inflamatorio y previene el rechazo de los injertos de piel humana. En constaste, la muestra
20 obtenida del ratón tratado con control muestra una infiltración masiva con múltiples señas de necrosis y una destrucción dramática de la epidermis. Este proceso es fácilmente monitoreado a simple vista y documentado mediante una fotografía simple de los ratones.

La piel de seis de los seis ratones SCID-hu transferida con Spl
25 alogénica y tratada con mAb anti-LPS de control muestra una fuerte

respuesta inflamatorio a claramente visible a simple vista 23 días después de la transferencia de célula mononuclear. Todos los ratones muestran lesiones considerables, que incluyen eritema, y pústulas de escalamiento y pronunciadas. En contraste los injertos

5 de piel de todos los ratones tratados con el anticuerpo quimérico de enlace CD45RB/RO tienen una apariencia normal. Las diferencias dramáticas entre los dos grupos de ratones específicamente se deben al tratamiento del anticuerpo ya que la piel humana de todos los ratones tiene un aspecto idéntico al inicio del experimento. Este

10 aspecto no cambia hasta la segunda semana después de la transferencia de la célula, el momento en el cual el grupo de control inició el desarrollo de lesiones en la piel. El experimento se terminó en el día 34 después de la transferencia de célula mononuclear. En este momento, uno de los ratones de control ya está muerto (día 30)

15 y cuatro otros fueron sacrificados (días 27, 27, 27 y 30) debido a un xeno-GvHD fuerte. Las reacciones patológicas observadas en los ratones tratados con el control del anticuerpo también se correlacionan con una pérdida de peso del cuerpo en estos animales.

En contraste, el grupo tratado con el anticuerpo quimérico de

20 enlace CD45RB/RO exhibe un estado sano durante el tiempo del experimento completo.

EJEMPLO 13**Actividades *in vivo* de un anticuerpo quimérico de enlace
CD45Rb/RO en un modelo de trasplante de célula de isleta
humana**

5

Ratones

Se mantuvieron bajo un patógeno específico ratones hembra NOD/SCID (Charles River Laboratories, Calco, Italia) libre de condiciones. El nivel de glucosa en la sangre de la cola venosa se
10 cuantificó utilizando el sistema Glucometer Elite (Bayer, Alemania). La diabetes se indujo en ratones NOD/SCID a través de inyección intravenosa de 180 mg/kg de estreptozotocina (Sigma, St. Luis, MO). Se hace un diagnóstico de diabetes después de dos mediciones de glucosa consecutivas más altas que 250 mg/dl.

15

Preparaciones y trasplante de isleta

La pancreata se obtiene de donadores multiórgano cadavéricos desafiando el calor. Las isletas se aislaron de acuerdo con el método descrito en Bertuzzi y otros., Diabetes, 1999, 48:1971-8. Las isletas
20 purificadas se cultivaron en matraces estériles conteniendo 25 ml de medio M199 (Seromed Biochrom, Berlin, Alemania) suplementado con 10% de FCS, 1% de L-glutamina, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina (medio completo). Las isletas se incubaron a 30° en 5% CO₂ y aire humidificado al 95%. Los ratones
25 se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de avertina y

allicuotas de 1500 IE de isletas humanas se trasplantaron bajo la cápsula del riñón de los ratones NOD/SCID diabéticos receptores como se describe en Davalli A. M. y otros., Diabetes, 1996, 45: 1161-7. Después del trasplante, se inyectaron 50×10^6 de PBMC nuevamente aislado intraperitonealmente a los ratones NOD/SCID.

Tratamiento de ratones trasplantados

Los ratones Hu-PBL-NOD/SCID trasplantados se trataron a.c. en el día 0, +3 y +5 con 1 mg/kg de un anticuerpo quimérico de enlace CD45RB/RO. Los ratones de control se trataron ya sea con solución salina o con mAb purificado de IgG (Vinci. Biochem, Italia).

Análisis Histológico

Los polos del riñón conteniendo injerto de isleta humana se congelados en Tejido Tek (Miles Lab., IN) y se almacenaron a -70° . Se tiñeron secciones congeladas de $5 \mu\text{m}$ de grosor con mAb biotestado contra insulina humana o CD3 humano seguido por conjugado de peroxidasa de estreptavidina. Se utilizó diaminonbencidina (DAKO, Carpinteria, CA) como cromógeno y hematoziliina como contra colorante. La infiltración de linfocito de los injertos se evaluó en las secciones congeladas teñidas con hematoxilina y eosina.

Resultados

Los ratones NOD/SCID normales trasplantados con isletas

humanas permanecieron normoglicémicos hasta los 100 días después del trasplante, mientras que el tiempo de rechazo medio de los ratones hu-PBL-NOD/SCID trasplantados con isletas humanas es de 3513 días. El tratamiento corto de ratones hu-PBL-NOD/SCID trasplantados con isletas humanas con un mAb de la presente invención significativamente prolonga la supervivencia de las isletas humanas con una tasa de supervivencia de >70% en el día 60 y 50% en el día 100 después del trasplante.

El análisis histológico de injertos de isleta humana llevado a cabo en el día 100 después del trasplante en ratones hu-PBL-NOD/SCID muestra una infiltración masiva de células T positivas CD3+, CD4+ y CD8+ en el ratón receptor de control. En contraste, en los ratones receptores tratados con un anticuerpo quimérico de enlace CD45RB/RO se observó una infiltración más baja de células humanas. La tinción positiva para insulina demuestra que la función del injerto en los ratones receptores hu-PBL-NOD/SCID tratados con el anticuerpo quimérico de enlace CD45RB/RO comparado con los ratones receptores de control. En ratones hu-PBL-NOD/SCID tratados con un anticuerpo quimérico de enlace CD45RB/RO y con trasplante de isleta se detectaron cantidades más bajas de IFN- γ humano en el suero comparado con los ratones receptores de control.

Estos datos indican que el tratamiento a corto plazo con un anticuerpo quimérico de enlace CD45RB/RO conduce a una supervivencia de aloinjerto de isleta humano prolongada a través de

204
203

la prevención de infiltración de injerto e inhibiendo la reacción de rechazo al injerto mediada por leucocito *in vivo*.

5

10

15

20

25

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de enlace que comprende por lo menos un sitio de enlace de antígeno, que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR1, CDR2 y CDR3, dicha CDR1 tiene la secuencia de aminoácido Asn-Tyr-Ile-Ile-His (NYIIH), dicha CDR2 tiene la secuencia de aminoácido Tyr-Phe-Asn-Pro-Tyr-Asn-His-Gly-Thr-Lys-Tyr-Asn-Glu-Lys-Phe-Lys-Gly (YFNPYNHGTKYNEKFKG) y dicha CDR3 tiene la secuencia de aminoácido Ser-Gly-Pro-Tyr-Ala-Trp-Phe-Asp-Thr (SGPYAWFDT).

2. Una molécula de enlace de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende:

a) un primer dominio que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR1, CDR2 y CDR3, dicha CDR1 tiene la secuencia de aminoácido Asn-Tyr-Ile-Ile-His (NYIIH), dicha CDR2 tiene la secuencia de aminoácido Tyr-Phe-Asn-Pro-Tyr-Asn-His-Gly-Thr-Lys-Tyr-Asn-Glu-Lys-Phe-Lys-Gly (YFNPYNHGTKYNEKFKG) y dicha CDR3 tiene la secuencia de aminoácido Ser-Gly-Pro-Tyr-Ala-Trp-Phe-Asp-Thr (SGPYAWFDT); y

b) un segundo dominio que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR1', CDR2' y CDR3', CDR1' tiene la secuencia de aminoácido Arg-Ala-Ser-Gln-Asn-Ile-Gly-Thr-Ser-Ile-Gln (RASQNIGTSLIQ), CDR2' tiene la secuencia de aminoácido Ser-Ser-Ser-Glu-Ser-Ile-Ser (SSSESIS) y CDR3' tiene la secuencia de aminoácido Gln-Gln-Ser-Asn-Thr-Trp-Pro-Phe-Thr (QQSNTWPFT).

296
295

3. Una molécula de enlace de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, que es una molécula quimérica o humanizada de enlace.

5 4. Una molécula de enlace de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la molécula quimérica o humanizada de enlace es un anticuerpo monoclonal quimérico o humanizado.

5. Una molécula de enlace de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende no más de un sitio de glicosilación.

10 6. Una molécula de enlace de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el sitio de glicosilación es un sitio de N-glicosilación.

7. Una molécula de enlace de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde ningún sitio de glicosilación está presente en la región variable.

15 8. Una molécula de enlace de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende un polipéptido de SEC ID NO: 1 y/o un polipéptido de SEC ID NO: 2.

9. Una molécula de enlace de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende un polipéptido de SEC ID NO: 20 3 y/o un polipéptido de SEC ID NO: 4.

10. Una molécula de enlace de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9 que es un anticuerpo monoclonal quimérico.

11. Una molécula de enlace que es un anticuerpo humanizado que comprende un polipéptido de SEC ID NO: 9 o de SEC ID NO: 10 25 y/o un polipéptido de SEC ID NO: 7 o de SEC ID NO: 8.

12. Una molécula de enlace que es un anticuerpo humanizado que comprende un polipéptido de SEC ID NO: 31 o de SEC ID NO: 32 y/o un polipéptido de SEC ID NO: 7 o de SEC ID NO: 8.

13. Una molécula de enlace que es un anticuerpo humanizado
5 que comprende:

- un polipéptido de SEC ID NO: 9 y un polipéptido de SEC ID NO: 7,

- un polipéptido de SEC ID NO: 9 y un polipéptido de SEC ID NO: 8,

10 - un polipéptido de SEC ID NO: 10 y un polipéptido de SEC ID NO: 7,

- un polipéptido de SEC ID NO: 10 y un polipéptido de SEC ID NO: 8,

15 - un polipéptido de SEC ID NO: 31 y un polipéptido de SEC ID NO: 7,

- un polipéptido de SEC ID NO: 31 y un polipéptido de SEC ID NO: 8,

- un polipéptido de SEC ID NO: 32 y un polipéptido de SEC ID NO: 7, o

20 - un polipéptido de SEC ID NO: 32 y un polipéptido de SEC ID NO: 8.

14. Los polinucleótidos aislados que comprenden polinucleótidos que codifican una molécula de enlace de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.

25 15. Los polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 14,

que codifica la secuencia de aminoácido de CDR1, CDR2 y CDR3 de acuerdo con la reivindicación 2 y/o polinucleótidos que codifican la secuencia de aminoácido de CDR1', CDR2' y CDR3' de acuerdo con la reivindicación 2.

5 16. Los polinucleótidos que codifican la secuencia de aminoácido de CDR1', CDR2' y CDR3', de acuerdo con dicha CDR1' tienen la secuencia de aminoácido Arg-Ala-Ser-Gln-Asn-Ile-Gly-Thr-Ser-Ile-Gln (RASQNIGTSIQ), CDR2' tiene la secuencia de aminoácido Ser-Ser-Ser-Glu-Ser-Ile-Ser (SSSESIS) y CDR3' tiene la secuencia
10 de aminoácido Gln-Gln-Ser-Asn-Thr-Trp-Pro-Phe-Thr (QQSNTWPFT).

17. Los polinucleótidos que comprenden un polinucleótido de SEC ID NO: 5 y/o un polinucleótido de SEC ID NO: 6.

18. Los polinucleótidos que comprenden polinucleótidos que codifican un polipéptido de SEC ID NO: 7 o SEC ID NO: 8 y/o un
15 polipéptido de SEC ID NO: 9 o SEC ID NO: 10.

19. Los polinucleótidos que comprenden un polinucleótido de SEC ID NO: 11 o de SEC ID NO: 12 y/o un polinucleótido de SEC ID NO: 13 o SEC ID NO: 14.

20. Los polinucleótidos que comprenden polinucleótidos que
20 codifican un polipéptido de SEC ID NO: 7 o SEC ID NO: 8 y/o un polipéptido de SEC ID NO: 31 o SEC ID NO: 32.

21. Los polinucleótidos que comprenden un polinucleótido de SEC ID NO: 34 o de SEC ID NO: 35 y/o un polinucleótido de SEC ID NO: 33; SEC ID NO: 14 o SEC ID NO: 13.

25 22. Un vector de expresión que comprende polinucleótidos de

309
208

acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 21.

23. Un sistema de expresión que comprende un polinucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 21, en donde dicho sistema de expresión o parte del mismo es capaz de producir
5 un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, cuando dicho sistema de expresión o parte del mismo está presente en una célula huésped compatible.

24. Un sistema de expresión que comprende un polinucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 21, en donde
10 dicho sistema de expresión o parte del mismo es capaz de producir una molécula de enlace que comprende por lo menos un sitio de enlace de antígeno, que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR1, CDR2 y CDR3, dicha CDR1 tiene la secuencia de aminoácido Asn-Tyr-Ile-Ile-His (NYIIH), dicha CDR2 tiene la
15 secuencia de aminoácido Tyr-Phe-Asn-Pro-Tyr-Asn-His-Gly-Thr-Lys-Tyr-Asn-Glu-Lys-Phe-Lys-Gly (YFNPYNHGTKYNEKFKG) y dicha CDR3 tiene la secuencia de aminoácido Ser-Gly-Pro-Tyr-Ala-Trp-Phe-Asp-Thr (SGPYAWFDT), cuando dicho sistema de expresión o parte del mismo está presente en una célula huésped compatible.

20 25. Una célula huésped aislada que comprende un sistema de expresión de acuerdo con la reivindicación 23 o 24.

26. El uso de una molécula de enlace o de un anticuerpo humanizado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 como un fármaco.

25 27. El uso de acuerdo con la reivindicación 26 en el tratamiento

240
209

y/o profilaxis de enfermedades autoinmunes, rechazo al trasplante, psoriasis, dermatitis, enfermedad del intestino inflamatoria y/o alergias.

28. El uso de acuerdo con la reivindicación 27 en el tratamiento
5 y/o profilaxis de la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD).

29. El uso de una molécula de enlace o de un anticuerpo humanizado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de rechazo al trasplante de célula de isleta pancreática.

10 30. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 26 a 29, en donde la molécula de enlace o un anticuerpo humanizado comprende un polipéptido de SEC ID NO: 31 o de SEC ID NO: 32 y/o un polipéptido de SEC ID NO: 7 o de SEC ID NO: 8.

15 31. Una composición farmacéutica que comprende una molécula o un anticuerpo humanizado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 en asociación con por lo menos un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

20 32. Un método para el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades asociadas con enfermedades autoinmunes, rechazo al trasplante, psoriasis, dermatitis, enfermedad del intestino inflamatoria y/o alergias, que comprende administrar a un sujeto en la necesidad de dicho tratamiento y/o profilaxis una cantidad efectiva de una molécula o un anticuerpo humanizado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.

25 33. Un método para el tratamiento y/o profilaxis de psoriasis

211
210

que comprende administrar a un sujeto en la necesidad de dicho tratamiento y/o profilaxis una cantidad efectiva de una molécula de enlace o un anticuerpo humanizado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.

5 34. Un método para el tratamiento y/o profilaxis de enfermedad de injerto contra huésped (GVHD) que comprende administrar a un sujeto en la necesidad de dicho tratamiento y/o profilaxis una cantidad efectiva de una molécula o un anticuerpo humanizado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.

10 35. Un método para el tratamiento y/o profilaxis de una enfermedad asociada con rechazo al trasplante de célula de isleta pancreática que comprende administrar a un sujeto en la necesidad de dicho tratamiento y/o profilaxis una cantidad efectiva de una molécula de enlace o un anticuerpo humanizado de acuerdo con
15 cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.

 36. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 32 a 35, en donde la molécula de enlace o el anticuerpo humanizado comprende un polipéptido de SEC ID NO: 31 o de SEC ID NO: 32 y/o un polipéptido de SEC ID NO: 7 o de SEC ID
20 NO: 8.

 37. El uso de una molécula de enlace que tiene una especificidad de enlace para ambos CD45RO y CD45RB en medicina.

 38. El uso de acuerdo con la reivindicación 37, en donde la molécula de enlace es un anticuerpo monoclonal quimérico,
25 humanizado o completamente humano.

39. El uso de acuerdo con la reivindicación 37 o 38, en donde la molécula de enlace se enlaza a una isoforma CD45RO con una constante de disociación (Kd) de <15nM.

40. El uso de acuerdo con cualquiera de la reivindicaciones 37 a 38, en donde la molécula de enlace se enlaza a una isoforma CD45RB con una constante de disociación (Kd) <15nM.

41. El uso de acuerdo con cualquiera de la reivindicaciones 37 a 40, en donde la molécula de enlace se enlaza a las isoformas CD45 las cuales

10 - incluyen los epítopos A y B, pero no el epítipo C de la molécula CD45; y/o

- incluye el epítipo B, pero no el A y no el epítipo C de la molécula CD45; y/o

15 - no incluye ninguno de los epítopos A, B o C de la molécula CD45.

42. El uso de acuerdo con cualquiera de la reivindicaciones 37 a 41, en donde la molécula de enlace no se enlaza con las isoformas CD45 las cuales

20 - incluyen todos los epítopos A, B, y C de la molécula CD45; y/o

- Incluye ambos epítopos B y C, pero no el epítipo A de la molécula CD45.

43. El uso de acuerdo con cualquiera de la reivindicaciones 37 a 42, en donde la molécula de enlace se enlaza a su epítipo objetivo en células PEER, y en donde dicho enlace es con un Kd<15nM.

25

213
212

1/14

Figura 1

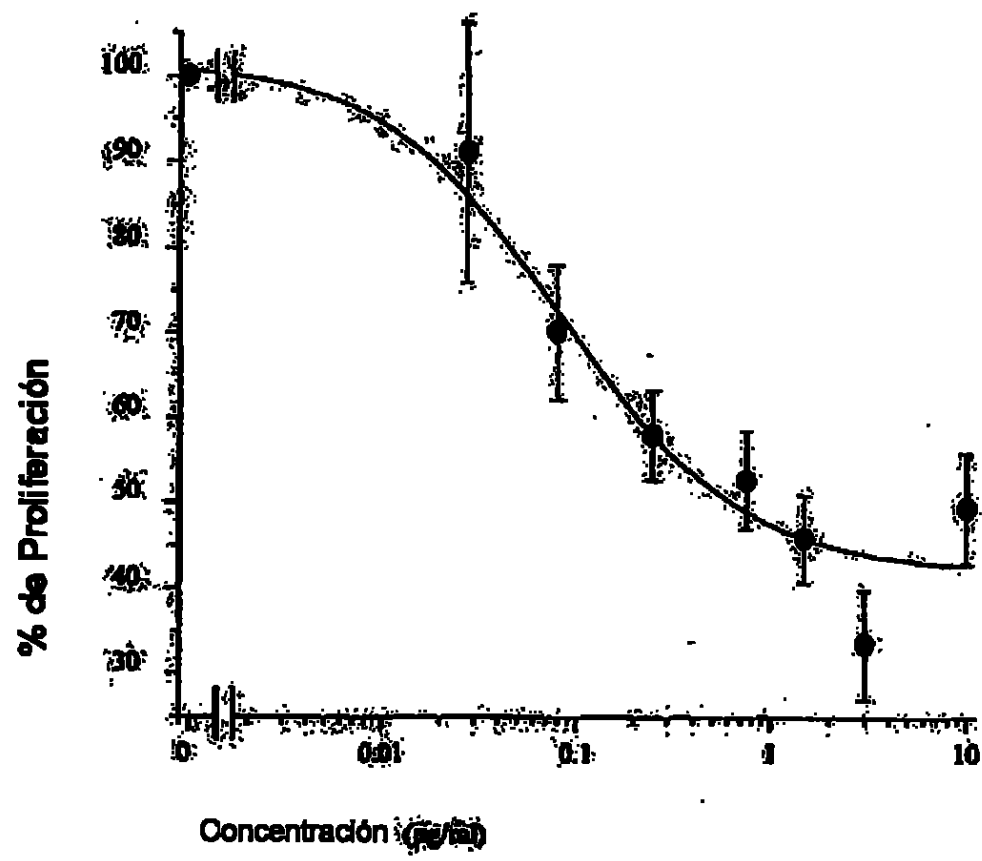


Figura 3

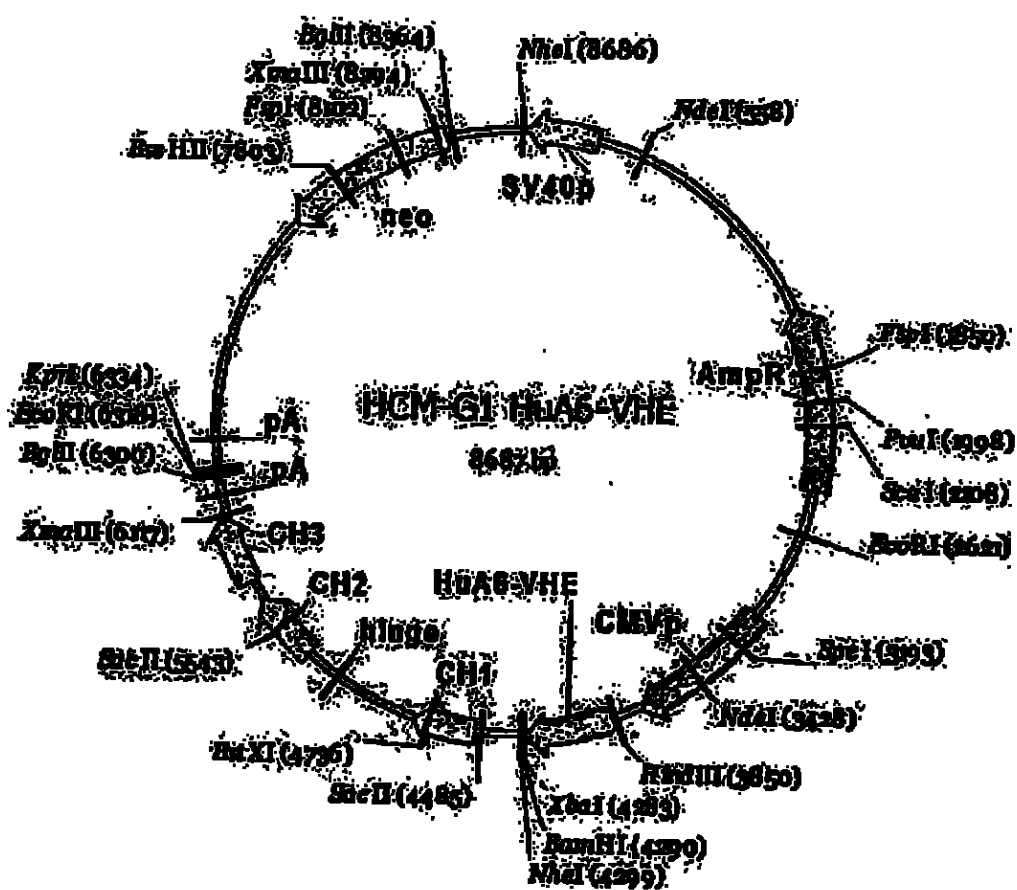


Figura 4

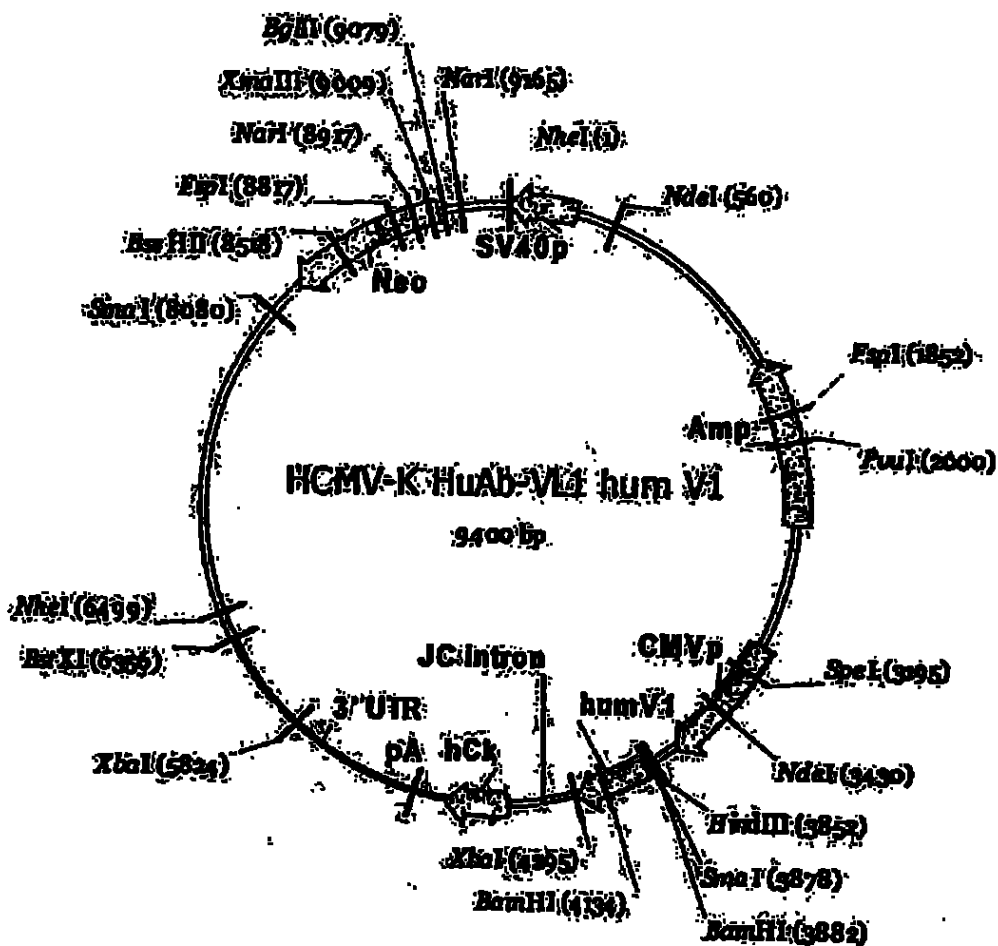


Figura 5

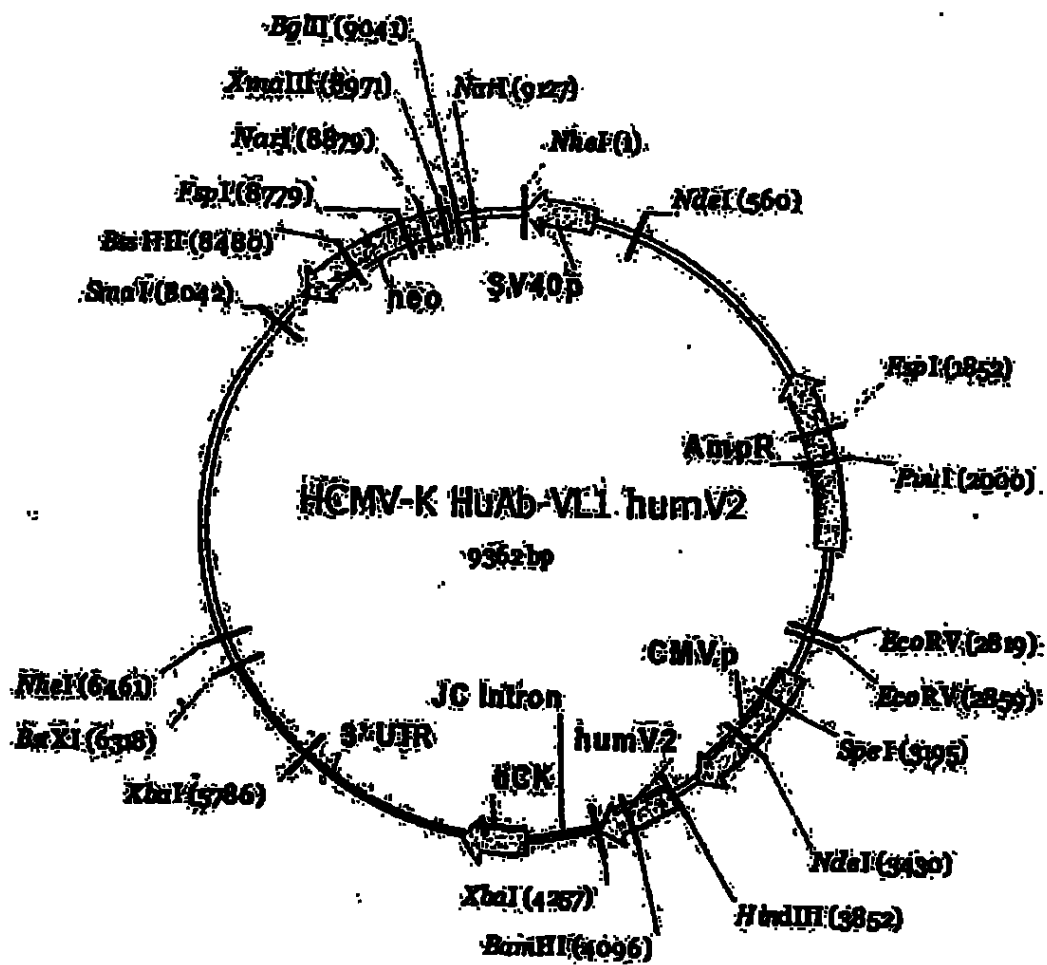
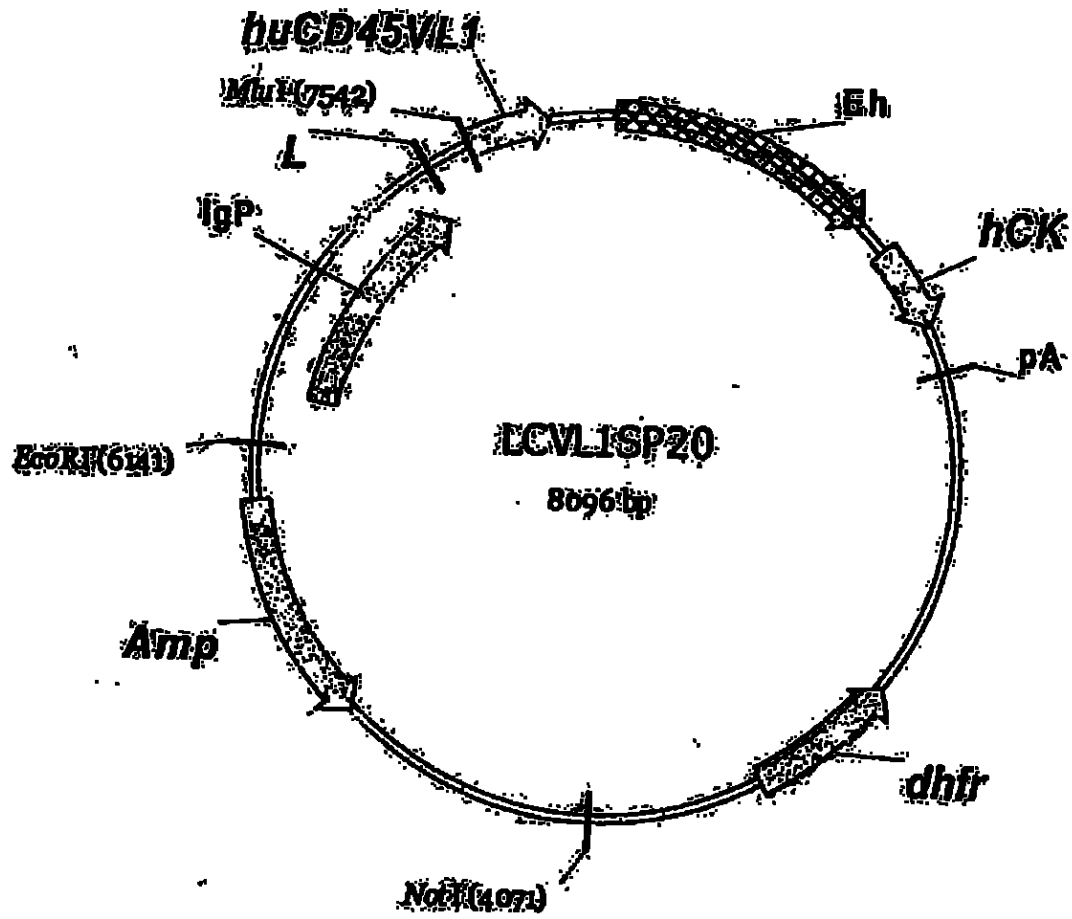


Figura 6



220
219

Figura 8

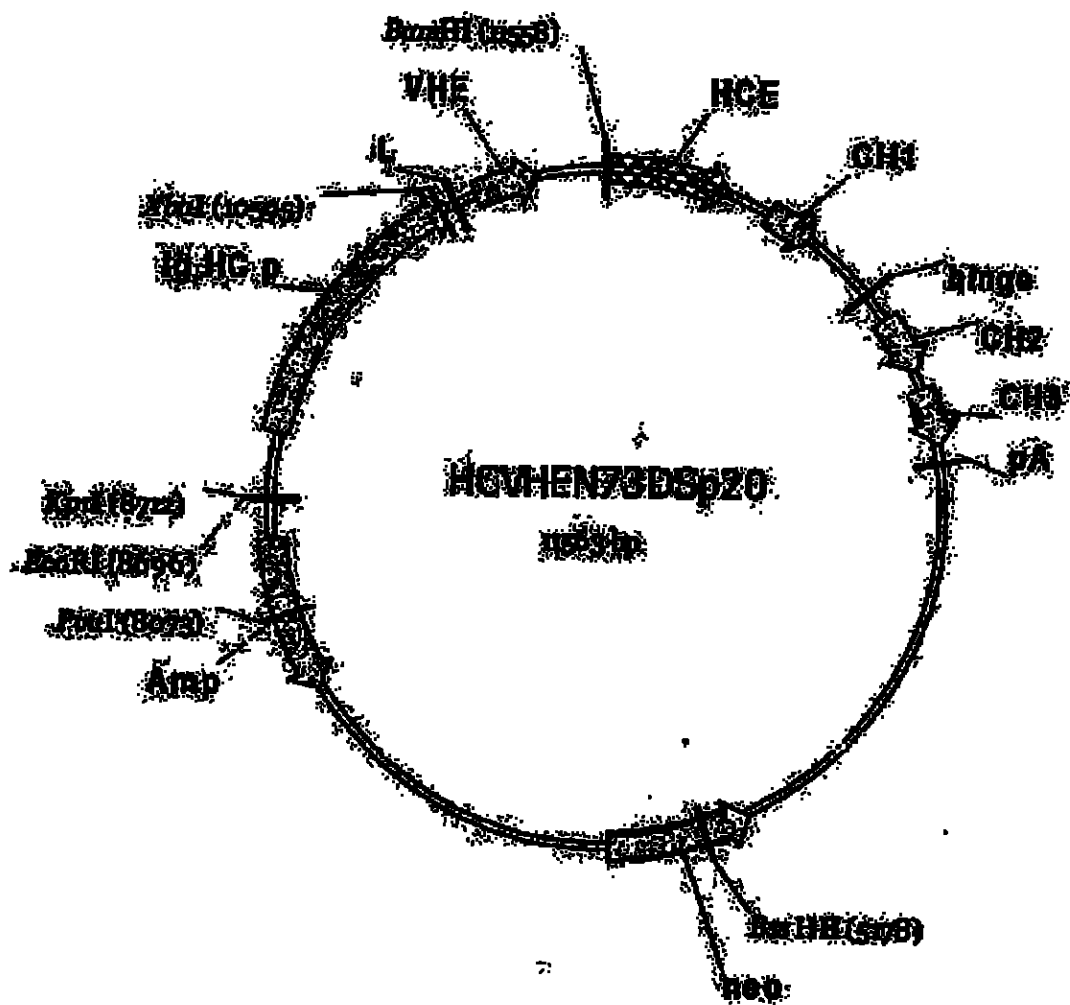


Figura 9

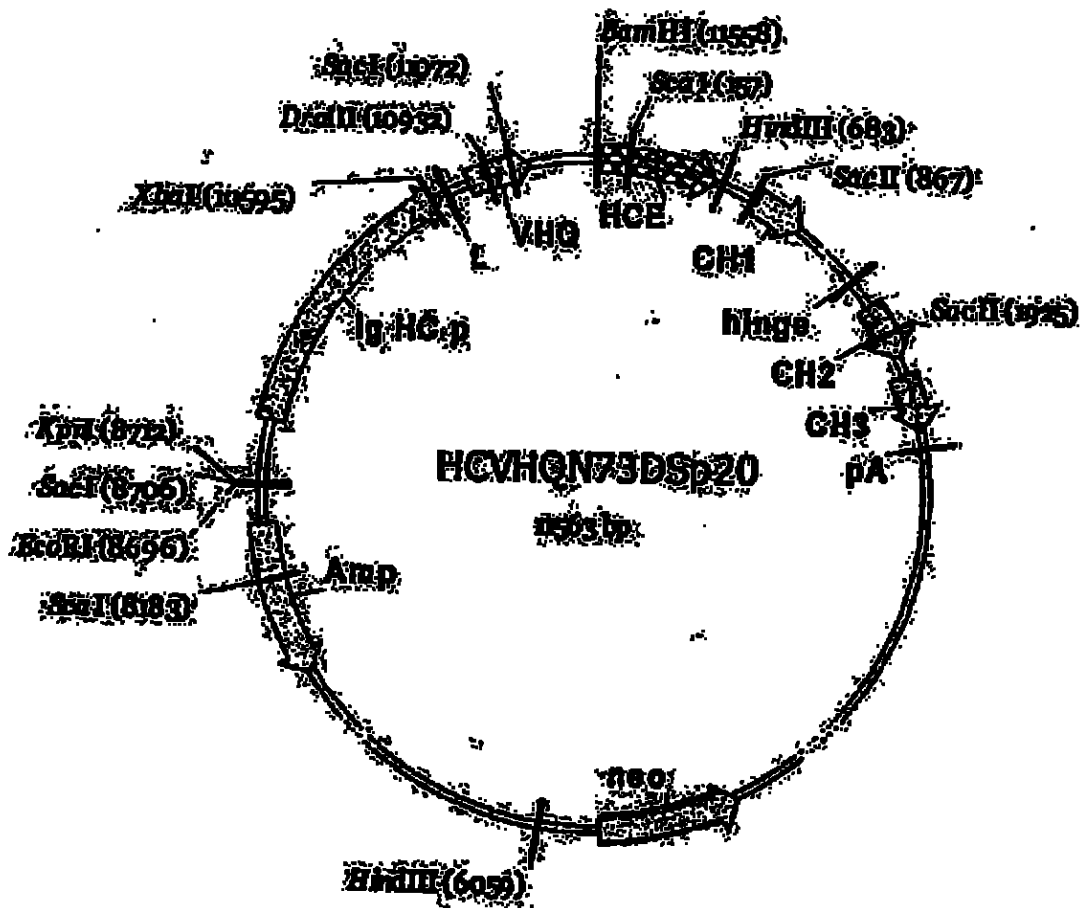


Figura 10

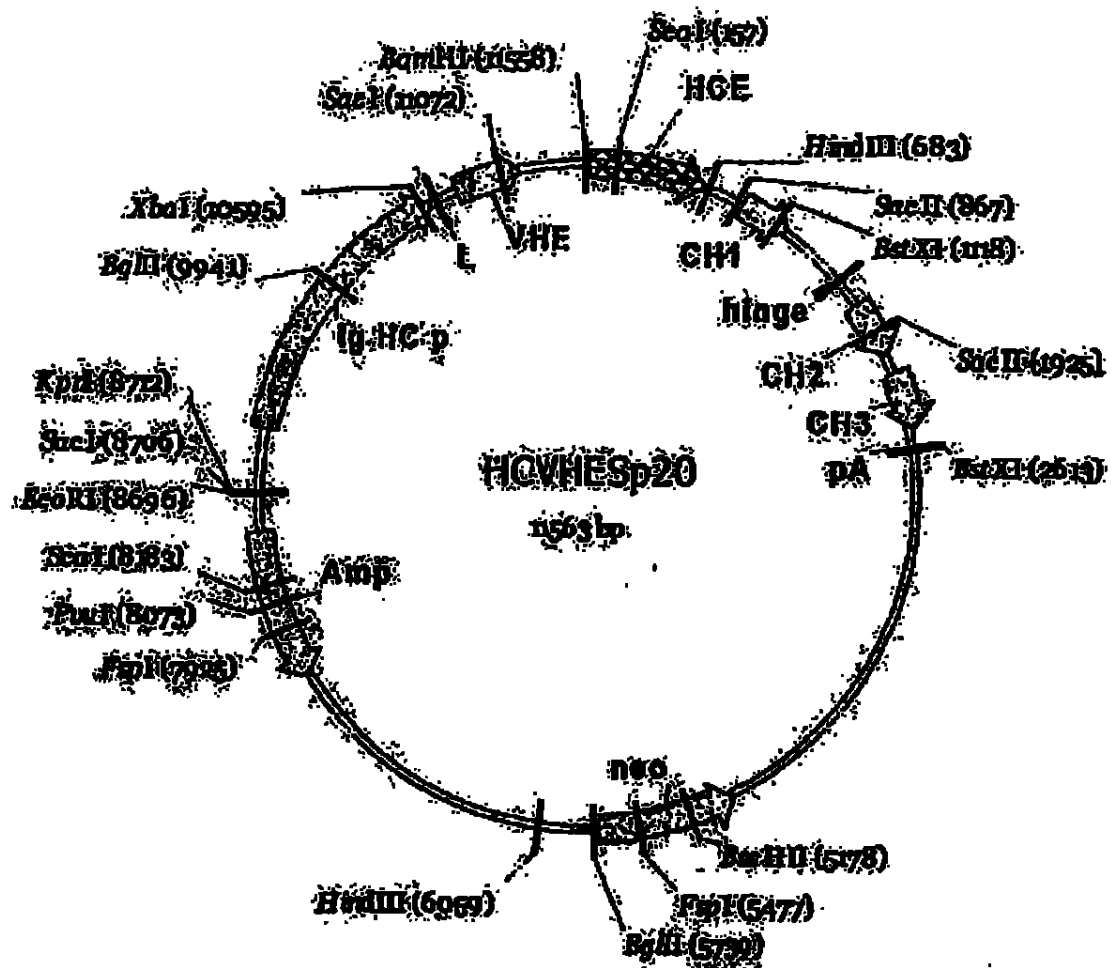
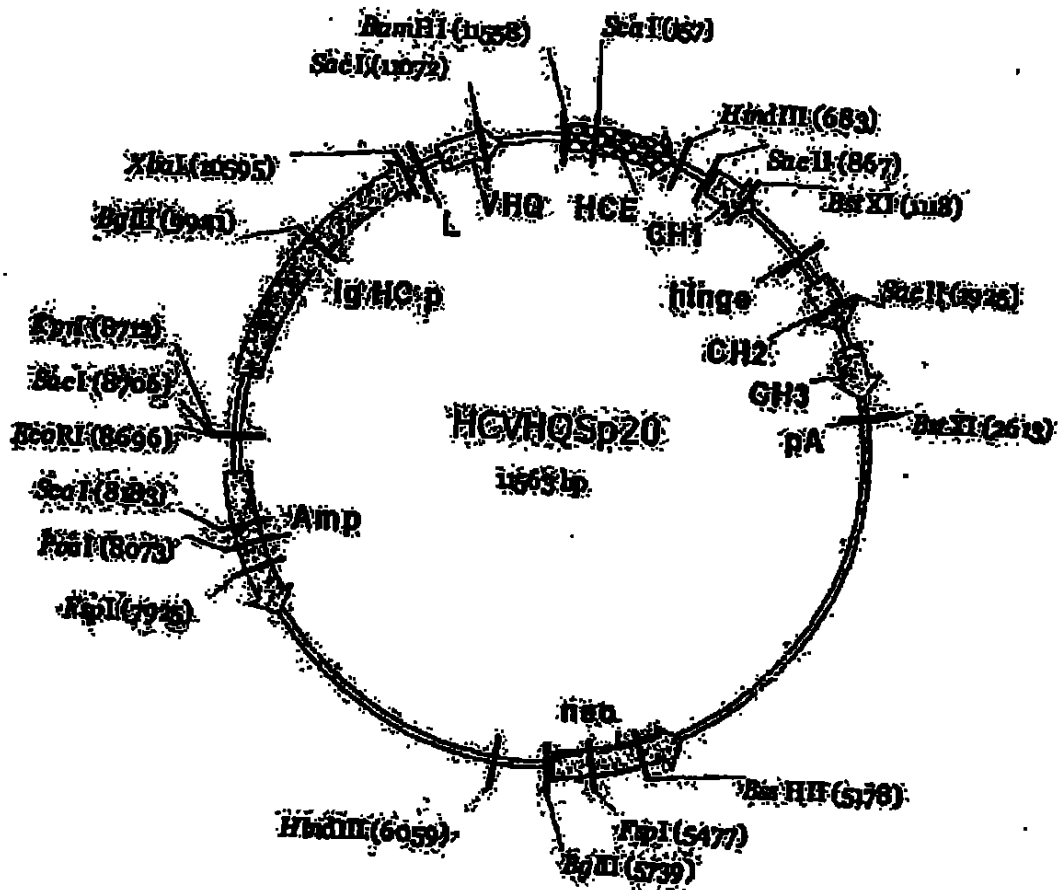
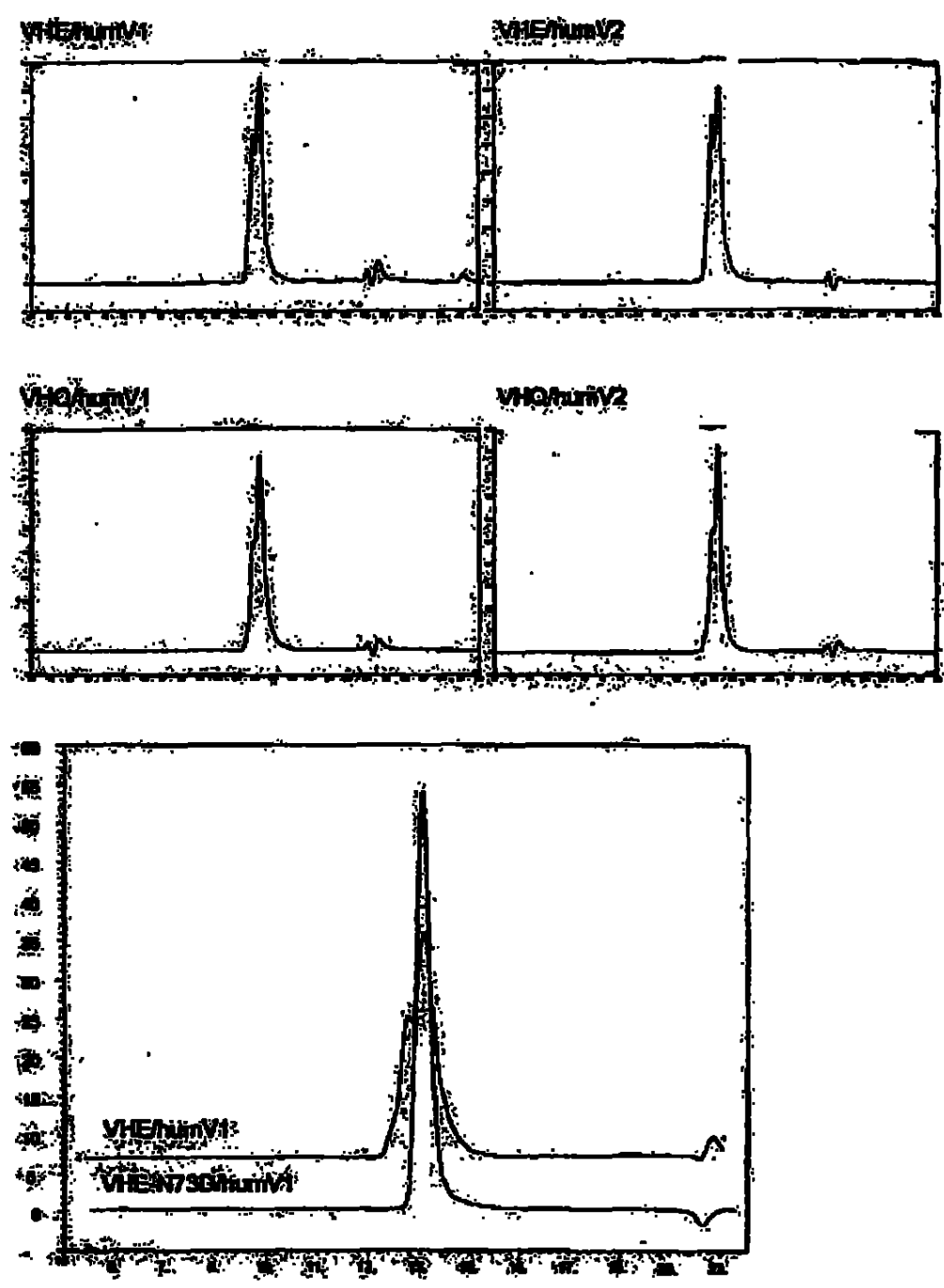


Figura 11



224
223

Figura 12



275
224

AM

Figura 13

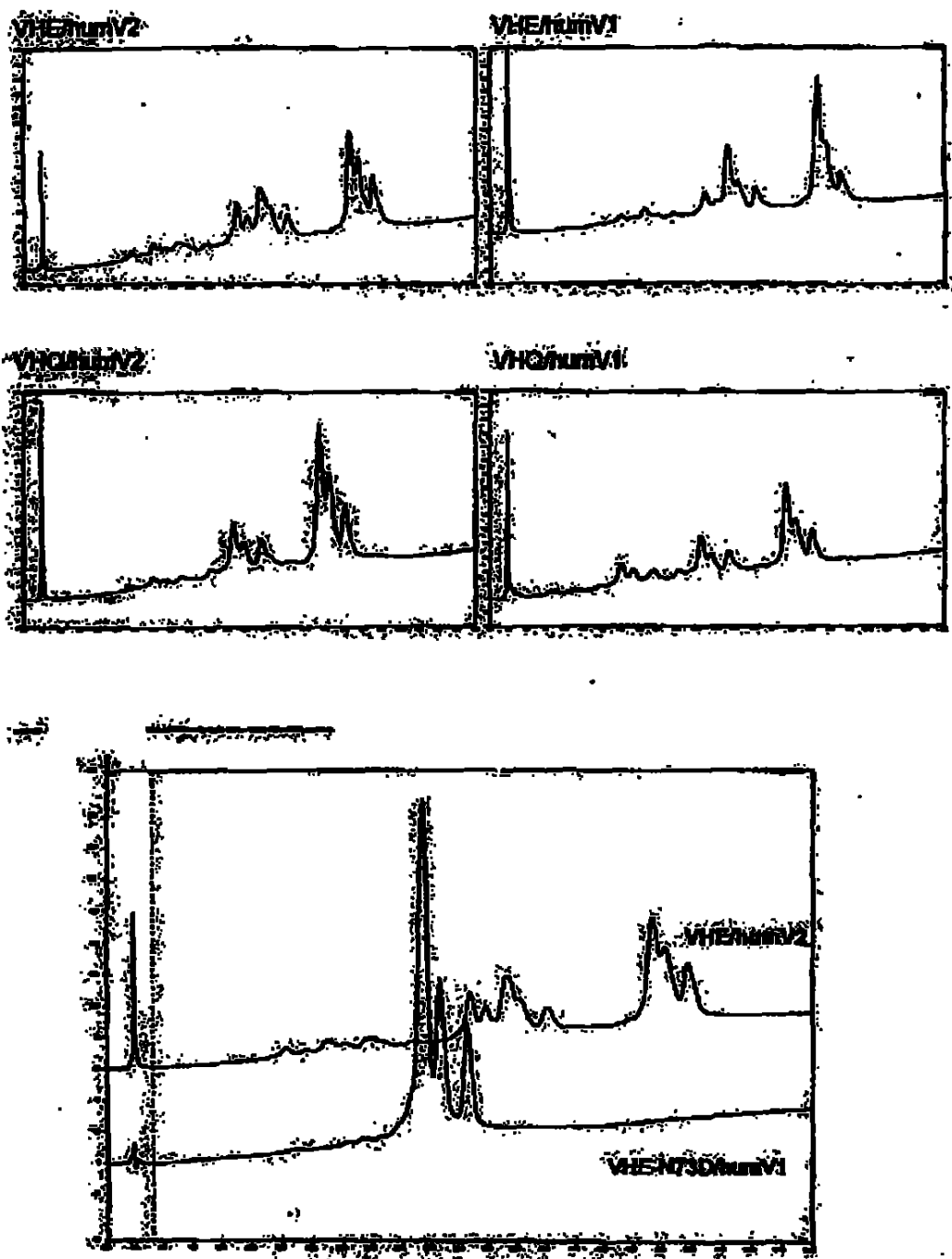
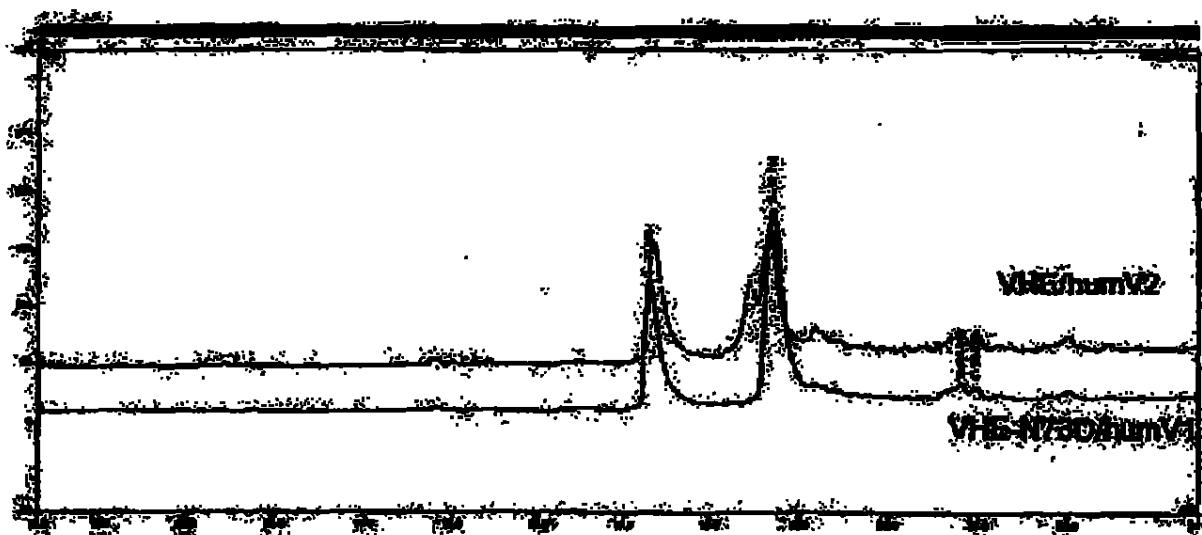


Figura 14



(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
24 March 2005 (24.03.2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/026210 A2

(51) International Patent Classification: C07K 16/28,
C12N 15/13, 15/62, 15/79, 5/10, A61K 39/395, A61P
37/00

[IT/IT]: Via Fratelli Cervi, Residenza Andromeda i. 131,
I-20090 Segrate (IT). LOUX, Véronique [FR/FR]: 24, rue
du 19 Novembre, F-68870 Bartenheim (FR). AVERSA,
Gregorio [IT/CA]: 4525 West Sixth Ave., Vancouver, BC
V6R 1V4 (CA). JESCHKE, Margit [DE/CH]: Grenzacher
Str. 10, CH-4058 Basel (CH).

(21) International Application Number:
PCT/EP2004/010471

(22) International Filing Date:
17 September 2004 (17.09.2004)

(74) Agent: GRUBB, Philip; Novartis AG, Corporate Intellectual
Property, CH-4002 Basel (CH).

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
10/666,332 18 September 2003 (18.09.2003) US
0414309.5 25 June 2004 (25.06.2004) GB

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, BG, ES, FI,
GB, GD, GE, GM, GR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW.

(71) Applicant (for all designated States except AT, US): NO-
VARTIS AG [CH/CH]; Lichtstrasse 35, CH-4056 Basel
(CH).

(71) Applicant (for AT only): NOVARTIS PHARMA GMBH
[AT/AT]; Brunner Strasse 59, A-1230 Vienna (AT).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): KOLBINGER,
Frank [DE/DE]; Thuner Ring 4, 79395 Neuenburg
(DE). CARBALLIDO HERRERA, José, M. [ES/AT];
Bernhard Weissgasse 6/3, A-2380 Perchtoldsdorf (AT).
ASZÓDI, András [HU/AT]; Bojattigasse 15B/19, A-1140
Vienna (AT). SALDANHA, José, W. [GB/GB]; 21 Fille-
brook Avenue, Enfield, London EN1 3BD (GB). HALL,
Bruce, M. [AU/AU]; 14 Vernon Street, Strathfield, NSW
2135 (AU). GREGORI, Silvia [IT/IT]; Via Romagna, 19,
I-20090 Boccinasco (IT). RONCAROLO, Maria, Grazia

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI,
SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— without international search report and to be republished
upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: THERAPEUTIC BINDING MOLECULES

(57) Abstract: A molecule comprising at least one antigen binding site, comprising in sequence the hypervariable regions CDR1, CDR2 and CDR3, said CDR1 having the amino acid sequence Asn-Tyr-Ile-Ile-His (NYIHH), said CDR2 having the amino acid sequence Tyr-Phe-Asn-ProTyr-Asn-His-Gly-Thr-Lys-Tyr-Asn-Glu-Lys-Phe-Lys-Gly (YFNPYNHGTYNEKFKG) and said CDR3 having the amino acid sequence Ser-Gly-Pro-Tyr-Ala-Trp-Phe-Asp-Thr (SGPYAWFDT); e.g. further comprising in sequence the hypervariable regions CDR1', CDR2' and CDR3', CDR1' having the amino acid sequence Arg-Ala-Ser-Gln-Asn-Ile-Gly-Thr-Ser-Ile-Gln (RASQNIQTSIQ), CDR2' having the amino acid sequence Ser-Ser-Ser-Glu-Ser-Ile-Ser (SSSESIS) and CDR3' having the amino acid sequence Gln-Gln-Ser-Asn-Thr-Trp-Pro-Phe-Thr (QQSNTWPFT), e.g. a chimeric or humanised antibody, useful as a pharmaceutical.

WO 2005/026210 A2

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference PD/4-33370A/NFI	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/EP2004/010471	International filing date (day/month/year) 17/09/2004	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 18/09/2003
Applicant NOVARTIS AG		

This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International Search Report consists of a total of 6 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

- a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

☐ The international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

- b. ☒ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box II).

3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box III).

4. With regard to the title,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established, according to Rule 35.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the drawings,

- a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____

☐ as suggested by the applicant.

☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.

☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.

- b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

international application No.

PCT/EP2004/010471

22A

228

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
 - a. type of material
 - ☒ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material
 - ☒ in written format
 - ☒ in computer readable form
 - c. time of filing/furnishing
 - ☐ contained in the international application as filed
 - ☒ filed together with the international application in computer readable form
 - ☒ furnished subsequently to this Authority for the purpose of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/010471

229

230

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K16/28 C12N15/13 C12N15/62 C12N15/79 C12N5/10
A61K39/395 A61P37/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/072832 A (NOVARTIS AG) 19 September 2002 (2002-09-19) the whole document	1-4, 8-28, 30-34, 36-43
Y		5-7, 29, 35
X	G. AVERSA ET AL.: "A monoclonal antibody (A6) recognizing a unique epitope restricted to CD45RO and -RB isoforms of the leukocyte common antigen family identifies functional T cell subsets." CELLULAR IMMUNOLOGY, vol. 158, no. 2, 15 October 1994 (1994-10-15), pages 314-328, XP002228858 the whole document	37
	-/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 May 2005

Date of mailing of the international search report

19/05/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.O. Box 5818 Patentplan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Nooij, F

C-(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	G. AVERSA ET AL.: "Use of monoclonal antibodies to study in vivo and in vitro activated lymphocytes." TRANSPLANTATION PROCEEDINGS, vol. 21, no. 1(1), February 1989 (1989-02), pages 349-350, XP008017039 NEW YORK, NY, USA the whole document	37
X	S. GREGORI ET AL.: "Anti-CD45RO/RB mAb a new tool for tolerance induction." THE FASEB JOURNAL, vol. 17, no. 7, 14 April 2003 (2003-04-14), page C63, XP008046594 BETHESDA, MD, USA abstract 37.23	37
Y	D. DUNN-WALTERS ET AL.: "Effect of somatic hypermutation on potential N-glycosylation sites in human immunoglobulin heavy chain variable regions." MOLECULAR IMMUNOLOGY, vol. 37, February 2000 (2000-02), pages 107-113, XP002258153 the whole document	5,6
Y	P. FRIEND ET AL.: "Phase I study of an engineered aglycosylated humanized CD3 antibody in renal transplant rejection." TRANSPLANTATION, vol. 68, no. 11, 15 December 1999 (1999-12-15), pages 1632-1637, XP009011271 abstract	7
Y	WO 98/11918 A (RESEARCH CORPORATION TECHNOLOGIES INC.) 26 March 1998 (1998-03-26) claims examples 2,13 page 6, line 14 - line 17	29,35
A	F. KOLBINGER ET AL.: "Humanization of a mouse anti-human IgE antibody: a potential therapeutic for IgE-mediated allergies." PROTEIN ENGINEERING, vol. 6, no. 8, November 1993 (1993-11), pages 971-980, XP000983997 OXFORD, GB abstract material and methods	3,4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2004/010471

232
231

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 26-28, 30, 32-43 (all partially)
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 26-28 (completely), 30 (partially), 32-43 (completely) are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependant claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International Application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/010471

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 02072832	A	19-09-2002	BR 0207151 A	05-10-2004
			CA 2437963 A1	19-09-2002
			CN 1551919 A	01-12-2004
			CZ 20032129 A3	12-11-2003
			WO 02072832 A2	19-09-2002
			EP 1421191 A2	26-05-2004
			HU 0401560 A2	29-11-2004
			JP 2004533816 T	11-11-2004
			MX PA03007197 A	04-12-2003
			NO 20033549 A	10-10-2003
			SK 10082003 A3	02-03-2004
			US 2004096901 A1	20-05-2004
			ZA 200305911 A	28-06-2004
WO 9811918	A	26-03-1998	US 6106834 A	22-08-2000
			CA 2266684 A1	26-03-1998
			EP 0939652 A1	08-09-1999
			JP 2001501607 T	06-02-2001
			WO 9811918 A1	26-03-1998
			US 2002168362 A1	14-11-2002
			US 6379668 B1	30-04-2002

PATENT COOPERATION TREATY

234
233

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:

see form PCT/ISA/220

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY
(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/EP2004/010471

International filing date (day/month/year)
17.09.2004

Priority date (day/month/year)
18.09.2003

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
C07K16/28, C12N15/13, C12N15/62, C12N15/79, C12N5/10, A61K39/395, A61P37/00

Applicant
NOVARTIS AG

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. **FURTHER ACTION**

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA"). However, this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of three months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office - P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas
Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl
Fax: +31 70 340 - 3016

Authorized Officer

Nooij, F

Telephone No. +31 70 340-3267



**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No. **235**
PCT/EP2004/010471 **734**

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the language, this opinion has been established on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.
 - ☐ This opinion has been established on the basis of a translation from the original language into the following language , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rules 12.3 and 23.1(b)).
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - ☒ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - ☒ in written format
 - ☒ in computer readable form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☒ contained in the international application as filed.
 - ☒ filed together with the international application in computer readable form.
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
3. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
4. Additional comments:

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No. **236**
PCT/EP2004/010471 **7h**

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application,
☒ claims Nos. 26-28 (completely), 30 (partially), 32-43 (completely)

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 26-28 (completely), 30 (partially), 32-43 (completely), for reasons of industrial applicability relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (specify):

see separate sheet

- ☐ the description, claims or drawings (indicate particular elements below) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (specify):
- ☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.
- ☒ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos. 37-43 (all partially)
- ☐ the nucleotide and/or amino acid sequence listing does not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions in that:
- | | |
|----------------------------|--|
| the written form | ☐ has not been furnished |
| | ☐ does not comply with the standard |
| the computer readable form | ☐ has not been furnished |
| | ☐ does not comply with the standard |
- ☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in computer readable form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.
- ☐ See separate sheet for further details

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No. **PCT/EP2004/010471**

237
736

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	5-7, 29, 35
	No: Claims	1-4, 8-28, 30-34, 36-43
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	1-43
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	1-25, 29-31
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

Re Item III

Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

Present claims 26-28 (completely), 30 (partially) and 32-43 (completely) relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(I) PCT).

Present claims 37-43 relate to a compound defined by reference to a desirable characteristic or property, namely that the compound has binding properties. The claims cover all compounds having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such compounds. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the compound by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to antibodies having a binding specificity for both CD45RO and CD45RB, as described in the examples of underlying application.

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

Reference is made to the following documents:

D1: WO 02/072832 A (NOVARTIS AG) 19 September 2002 (2002-09-19)

D2: D. DUNN-WALTERS ET AL.: "Effect of somatic hypermutation on potential N-glycosylation sites in human immunoglobulin heavy chain variable regions."

MOLECULAR IMMUNOLOGY, vol. 37, February 2000 (2000-02), pages 107-113,
XP002258153

- D3:** P. FRIEND ET AL.: "Phase I study of an engineered aglycosylated humanized CD3 antibody in renal transplant rejection." TRANSPLANTATION, vol. 68, no. 11, 15 December 1999 (1999-12-15), pages 1632-1637, XP009011271
- D4:** WO 98/11918 A (RESEARCH CORPORATION TECHNOLOGIES INC.) 26 March 1998 (1998-03-26)

1. NOVELTY (Article 33(2) PCT)

- 1.1** *D1* discloses monoclonal antibodies (mAbs) which are specific for an epitope on both CD45RB and CD45RO. It also discloses chimeric and humanized versions, V_H -, V_L - and CDR-sequences identical or highly homologous to the claimed sequences, dissociation constants and therapeutic uses against e.g. autoimmune diseases and graft rejections. This document is partially identical to the underlying application.
- 1.2** The present application does not satisfy the criterion set forth in Article 33(2) PCT, because the subject matter of present claims 1-4, 8-28, 30-34 and 36-43 is not new in respect of the above-cited prior art as defined in the regulations (Rule 64(1)-(3) PCT).

2. INVENTIVE STEP (Article 33(3) PCT)

- 2.1** Present dependent claims 5-7 do not appear to contain any additional features which, in combination with the features to which they refer, involve an inventive step for the following reason:

N-glycosylation sites in antibodies are known in the art (see *D2*). Also aglycosylated antibodies are known in the art (see *D3*).

- 2.2** The document *D4* is regarded as being the most relevant prior art to the subject-matter of present claims 29 and 35 and discloses a method for treating or preventing a.o. cell transplant rejection by an antibody that binds to CD45RB, an antibody that

240
239

binds to CD45RO, or a mixture thereof (see claim 1). Said antibody may be chimeric (see example 2), and the transplanted cells may be **pancreatic islet cells** (see example 13).

The subject-matter of claims 29 and 35 therefore differs from this known *D4* in that these claims refer to the prophylactic and/or therapeutic use of the **single** binding molecule of claims 1-13, which is specific for a common epitope on CD45RB and CD45RO, against (diseases associated with) pancreatic islet cell transplant rejection.

The problem to be solved by the present invention may therefore be regarded as providing the use of alternative CD45RB- and CD45RO-binding molecules for treatment and/or prevention of (diseases associated with) pancreatic islet cell transplant rejection.

The solution to this problem is provided by the present application, but cannot be considered as involving an inventive step (Article 33(3) PCT) for the following reasons:

D1 discloses a (single) binding molecule, more specifically a (humanized) mAb, specific for an epitope on both CD45RB and CD45RO, and its use for preventing and/or treating transplant rejection. It would therefore be obvious to the skilled person to use the antibody specific for the common epitope on CD45RB and CD45RO for treating and/or preventing **pancreatic islet** transplant rejection.

2.3 In summary, the present application does not satisfy the criterion set forth in Article 33(3) PCT and the subject matter of present claims 5-7, 29 and 35 does not involve an inventive step (Rule 65(1)(2) PCT).

3. INDUSTRIAL APPLICABILITY (Article 33(4) PCT)

3.1 For the assessment of the present claims 26-28 (completely), 30 (partially) and 32-43 (completely) on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as

industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

Re Item VIII

Certain observations on the International application

It is clear from the description on page 4, lines 14-16, and page 6, lines 7-8, that the following feature is essential to the definition of the invention: The binding molecule of the invention **binds to both CD45RB and CD45RO**.

Since independent claims 1, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 29, 31, 32, 33, 34 and 35 does not contain this feature, it does not meet the requirement following from Article 6 PCT taken in combination with Rule 6.3(b) PCT that any independent claim must contain all the technical features essential to the definition of the invention.



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación : 06030435- 00000000

Folios: 243

Fecha (MM) 2006-03-28 13:49:33

Trámite : 011 PCT-PATENT 378 FASE INCI 411 PRESENTAC

Dependencia 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

244
241

Delegatura de Propiedad Industrial División de Nuevas Creaciones

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACIÓN Y AGILIZACIÓN DEL TRAMITE

PCT

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION (x) MODELO DE UTILIDAD ()	()	()
Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	()	(x)
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud	()	(x)
Descripción de la invención	()	(x)
-Dibujos de ser estos pertinentes.	()	(x)
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas	()	(x)
COMPLETA () INCOMPLETA ()	()	()

DISEÑO INDUSTRIAL ()

-Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.	()	()
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud	()	()
-Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño.	()	()
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA () INCOMPLETA ()	()	()

ESQUEMA DE TRAZADO ()

Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud	()	()
Representación gráfica del Esquema Trazado	()	()
Comprobante de Pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA () INCOMPLETA ()	()	()

Firma Responsable

Fecha