



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 749**

51 Int. Cl.:

C07K 16/10 (2006.01)

A61K 39/42 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 51/10 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06755161 .4**

96 Fecha de presentación : **11.05.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1879921**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.01.2008**

54

Título: **Moléculas de unión específicas de célula huésped capaces de neutralizar virus y usos de las mismas.**

30

Prioridad: **12.05.2005 PCT/EP2005/051260**
08.06.2005 PCT/EP2005/052648
23.06.2005 PCT/EP2005/052946
15.08.2005 PCT/EP2005/054002

73

Titular/es: **CRUCCELL HOLLAND B.V.**
Archimedesweg 4
2333 CN Leiden, NL

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.10.2011

72

Inventor/es: **Throsby, Mark y**
De Kruif, Cornelis, Adriaan

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.10.2011

74

Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 365 749 T3

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

DESCRIPCIÓN

Moléculas de unión específicas de célula huésped capaces de neutralizar virus y usos de las mismas.

CAMPO DE LA INVENCION

5 La invención se refiere a medicina. En particular, la invención se refiere al diagnóstico, la profilaxis y/o el tratamiento de infecciones virales.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Varios virus ensamblan sus proteínas núcleo y material genómico en el citoplasma de una célula huésped y salen de la célula mediante gemación de la membrana plasmática. Estudios de estos virus, por ejemplo virus VIH-1, han mostrado que además de proteínas codificadas por el virus, pueden encontrarse proteínas de la célula huésped en los virus. Aunque algunas de estas proteínas pueden tomarse en los virus simplemente debido a su proximidad a los sitios de ensamblaje y gemación virales, es probable que otras proteínas de la célula huésped se incluyan en los virus como resultado de su interacción con proteínas virales durante el ensamblaje y la liberación. Adicionalmente, pueden incorporarse algunas proteínas de la célula huésped para proporcionar una función para el virus durante el proceso de infección. Se han encontrado proteínas de la célula huésped en la superficie o el interior de los virus. A pesar de su detección sobre o en los virus, el papel y la función de las proteínas de la célula huésped en el proceso de ensamblaje viral se entiende mal y son todavía sumamente especulativos.

15 En la actualidad se usa una variedad de agentes para combatir la infección viral. Estos agentes incluyen compuestos antivirales, compuestos adecuados para la inmunización activa tales como vacunas y compuestos adecuados para la inmunización pasiva tales como inmunoglobulinas neutralizantes. Este último grupo se centra en inmunoglobulinas neutralizantes que actúan a través de unión específica a proteínas virales o receptores de superficie celular implicados en la entrada viral. Por tanto, se ha descrito la unión de inmunoglobulinas neutralizantes a la proteína (E) de la envuelta viral del virus del Nilo occidental (VNO) (Engle y Diamond, 2003; Oliphant *et al.*, 2005; y documento WO02/072036). Estas inmunoglobulinas pueden neutralizar específicamente VNO. Sin embargo, debido a su especificidad de unión, tales inmunoglobulinas son sólo adecuadas en la profilaxis y/o el tratamiento de enfermedades virales específicas y no pueden aplicarse ampliamente en el tratamiento de enfermedades virales.

20 Se ha descrito la neutralización de virus para inmunoglobulinas dirigidas contra proteínas derivadas de la célula huésped incorporadas al virus. Por ejemplo, se ha mostrado que VIH-1 incorpora la proteína molécula 1 de adhesión intercelular (ICAM-1) derivada de la célula huésped y se ha mostrado que un anticuerpo frente a ICAM-1 neutraliza viriones de VIH-1 que expresan ICAM-1 (véase Rizzuto y Sodroski, 1997). De manera desfavorable, ICAM-1 también se localiza en la superficie de células huésped no infectadas, de modo que la protección y/o el tratamiento de una infección viral con la inmunoglobulina contra ICAM-1, debido a la interacción de la inmunoglobulina con células huésped no infectadas, puede dar como resultado efectos secundarios graves y no deseados. Una desventaja adicional de la inmunoglobulina anti-ICAM-1 es que su actividad neutralizante es similar a las inmunoglobulinas específicas de receptor de superficie celular y específicas de proteínas virales, específicas de virus (VIH-1). Por consiguiente, existe una urgente necesidad de inmunoglobulinas que no tengan las desventajas descritas anteriormente.

25 La presente invención proporciona tales inmunoglobulinas. Las inmunoglobulinas encontradas pueden unirse a una proteína de la célula huésped intracelular que se incorpora en virus o se expresa en la superficie celular. Debido a la ubicación intracelular de la proteína en células huésped no infectadas, no se producen efectos secundarios no deseados durante la administración de las inmunoglobulinas. Una ventaja adicional de las inmunoglobulinas es que no dependen de la identificación viral específica y que interaccionan con una proteína de la célula huésped que está implicada comúnmente en el proceso de gemación y ensamblaje virales y en consecuencia puede neutralizar varios virus distintos.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

30 La figura 1 muestra la titulación del anticuerpo monoclonal anti-VNO CR4354L4328 en un modelo murino de exposición a VNO. Desde la parte superior hasta la inferior, se muestran la titulación del anticuerpo monoclonal anti-VNO CR4354L4328 usando dosis de 0,03, 0,01, 0,003, y 0,001 mg/kg y la titulación con un anticuerpo control a una concentración de 10 mg/kg. En el eje X se muestran los días y en el eje Y se representa la probabilidad de supervivencia (%).

35 La figura 2 muestra la titulación del anticuerpo monoclonal anti-VNO CR4348 en un modelo murino de exposición a VNO. Desde la parte superior hasta la inferior, se muestran la titulación del anticuerpo monoclonal anti-VNO CR4348 usando dosis de 0,1, 0,03, 0,01, 0,003 y 0,001 mg/kg y la titulación con un anticuerpo control a una concentración de 10 mg/kg. En el eje X se muestran los días y en el eje Y se representa la probabilidad de supervivencia (%).

40 La figura 3 muestra la unión en ELISA de diluciones de los anticuerpos optimizados CR4354L4261, CR4354L4267, CR4354L4328, CR4354L4335, CR4354L4383 y el anticuerpo original CR4354 a VNO. En el eje Y se muestra la absorbancia (DO) a 492 nm y en el eje X se muestra la cantidad de anticuerpo en µg/ml.

La figura 4 muestra datos de neutralización de CR4348 (círculos negros) y CR4354L4328 (círculos blancos) de los flavivirus virus de la fiebre amarilla, virus de la encefalitis japonesa, virus de la encefalitis de San Luis y virus del Dengue 2 en un ensayo de reducción de placas.

5 La figura 5 muestra una inmunotransferencia con, desde la izquierda hasta la derecha, lisado de células mycNDUFV-1 y lisado inmunoprecipitado con CR4348, CR4361, CR4374 o CR4354L4328.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

A continuación siguen en el presente documento definiciones de términos tal como se usan en la invención.

DEFINICIONES

Secuencia de aminoácidos

10 La expresión "secuencia de aminoácidos" tal como se usa en el presente documento se refiere a moléculas sintéticas o que se producen de manera natural y a una secuencia de péptido, oligopéptido, polipéptido o proteína.

Molécula de unión

15 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "molécula de unión" se refiere a una inmunoglobulina intacta incluyendo anticuerpos monoclonales, tales anticuerpos monoclonales quiméricos, humanizado o humanos, o a un dominio de unión a antígeno y/o variable que comprende un fragmento de una inmunoglobulina que compite con la inmunoglobulina intacta por la unión específica a la pareja de unión de la inmunoglobulina, por ejemplo una proteína de la célula huésped. Independientemente de la estructura, el fragmento de unión a antígeno se une con el mismo antígeno que reconoce la inmunoglobulina intacta. Un fragmento de unión a antígeno puede comprender

20 péptido o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 2 residuos de aminoácido contiguos, al menos 5 residuos de aminoácido contiguos, al menos 10 residuos de aminoácido contiguos, al menos 15 residuos de aminoácido contiguos, al menos 20 residuos de aminoácido contiguos, al menos 25 residuos de aminoácido contiguos, al menos 30 residuos de aminoácido contiguos, al menos 35 residuos de aminoácido contiguos, al menos 40 residuos de aminoácido contiguos, al menos 50 residuos de aminoácido contiguos, al menos 60 residuos de aminoácido contiguos, al menos 70 residuos de aminoácido contiguos, al menos 80 residuos de aminoácido contiguos, al menos 90 residuos de aminoácido contiguos, al menos 100 residuos de aminoácido contiguos, al menos 125 residuos de aminoácido contiguos, al menos 150 residuos de aminoácido contiguos, al menos 175 residuos de aminoácido contiguos, al menos 200 residuos de aminoácido contiguos o al menos 250 residuos de aminoácido contiguos de la secuencia de aminoácidos de la molécula de unión.

25 La expresión "molécula de unión", tal como se usa en el presente documento, incluye todas las clases y subclases de inmunoglobulinas conocidas en la técnica. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las moléculas de unión pueden dividirse en cinco clases principales de anticuerpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas pueden subdividirse en subclases (isotipos), por ejemplo, IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

30 Los fragmentos de unión a antígeno incluyen, entre otros, Fab, F(ab'), F(ab')₂, Fv, dAb, Fd, fragmentos de región determinante de complementariedad (CDR), anticuerpos de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de cadena sencilla bivalentes, anticuerpos en fagos de cadena sencilla, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, (poli)péptidos que contienen al menos un fragmento de una inmunoglobulina que es suficiente para conferir unión a antígeno específico al (poli)péptido, etc. Los fragmentos anteriores pueden producirse de manera sintética y mediante escisión enzimática o química de inmunoglobulinas intactas o pueden diseñarse por ingeniería genética mediante técnicas de ADN recombinante. Los métodos de producción se conocen bien en la técnica y se describen, por ejemplo, en Antibodies: A Laboratory Manual, editado por: E. Harlow y D. Lane (1988), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York. Una molécula de unión o fragmento de unión a antígeno de la misma puede tener uno o más sitios de unión. Si hay más de un sitio de unión, los sitios de unión pueden ser idénticos entre sí o pueden ser diferentes.

35 La molécula de unión puede ser una molécula de unión desnuda o no conjugada que también puede ser parte de un inmunocombinado. Una molécula de unión desnuda o no conjugada pretende referirse a una molécula de unión que no está conjugada, operativamente unida ni asociada física o funcionalmente de otra forma con una etiqueta o resto efector, tal como entre otros una sustancia tóxica, una sustancia radiactiva, un liposoma, una enzima. Se entenderá que moléculas de unión desnudas o no conjugadas no excluyen moléculas de unión que se han estabilizado, multimerizado, humanizado o manipulado de cualquier otra forma, distinta de mediante la unión de una etiqueta o resto efector. Por consiguiente, todas las moléculas de unión desnudas o no conjugadas modificadas postraduccionalmente se incluyen con el presente documento, incluyendo cuando las modificaciones se realizan en el entorno de la célula que produce la molécula de unión natural, mediante una célula que produce la molécula de unión recombinante, y se introducen mediante la mano del hombre tras la preparación de la molécula de unión inicial. Por supuesto, la expresión molécula de unión desnuda o no conjugada no excluye la capacidad de la molécula de unión para formar asociaciones funcionales con moléculas y/o células efectoras tras su administración al organismo, ya que algunas de tales interacciones son necesarias con el fin de ejercer un efecto biológico. La falta

de etiqueta o grupo efector asociado se aplica por tanto en la definición a la molécula de unión desnuda o no conjugada *in vitro*, no *in vivo*.

Muestra biológica

5 Tal como se usa en el presente documento, la expresión “muestra biológica” abarca una variedad de tipos de muestras, incluyendo sangre y otras muestras líquidas de origen biológico, muestras de tejido sólido tales como una muestra de biopsia o cultivos tisulares, o células derivadas de los mismos y la progenie de las mismas. La expresión también incluye muestras que se han manipulado de cualquier forma tras obtenerse, tal como mediante tratamiento con reactivos, solubilización o enriquecimiento de ciertos componentes, tales como proteínas o polinucleótidos. La expresión abarca diversos tipos de muestras clínicas obtenidas de cualquier especie, y también incluye células en cultivo, sobrenadantes celulares y lisados celulares.

Regiones determinantes de complementariedad (CDR)

15 La expresión “regiones determinantes de complementariedad” tal como se usa en el presente documento significa secuencias dentro de las regiones variables de moléculas de unión, tales como inmunoglobulinas, que habitualmente contribuyen en un grado grande al sitio de unión a antígeno que es complementario en forma y distribución de carga al epítipo reconocido en el antígeno. Las regiones CDR pueden ser específicas para epítopos lineales, epítopos discontinuos o epítopos conformacionales de proteínas o fragmentos de proteínas, o bien tal como se presentan en la proteína en su conformación nativa o, en algunos casos, tal como se presentan en las proteínas como desnaturalizadas, por ejemplo, mediante solubilización en SDS. Los epítopos también pueden consistir en modificaciones postraduccionales de proteínas.

Delección

20 El término “delección”, tal como se usa en el presente documento, indica un cambio en la secuencia o bien de aminoácidos o bien de nucleótidos en el que uno o más residuos de aminoácido o nucleótido, respectivamente, están ausentes en comparación con la molécula original, a menudo la que se produce de manera natural.

Secuencia de ácido nucleico que regula la expresión

25 La expresión “secuencia de ácido nucleico que regula la expresión” tal como se usa en el presente documento se refiere a secuencias de polinucleótido necesarias para y/o que afectan a la expresión de una secuencia codificante operativamente unida en un organismo huésped particular. Las secuencias de ácido nucleico que regulan la expresión, tales como entre otras secuencias potenciadoras, promotoras, de iniciación y terminación de la transcripción apropiadas; secuencias represoras o activadoras; señales de procesamiento de ARN eficaces tales como señales de corte y empalme y poliadenilación; secuencias que estabilizan el ARNm citoplasmático; secuencias que potencian la eficacia de la traducción (por ejemplo, sitios de unión a ribosomas); secuencias que potencian la estabilidad de la proteína; y cuando se desee, secuencias que potencian la secreción de la proteína, pueden ser cualquier secuencia de ácido nucleico que muestre actividad en el organismo huésped de elección y pueden derivarse de genes que codifican proteínas, que o bien son homólogos o bien heterólogos para el organismo huésped. La identificación y el empleo de secuencias que regulan la expresión son rutinarios para el experto en la técnica.

Variante funcional

40 La expresión “variante funcional”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de unión que comprende una secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos que está alterada en uno o más nucleótidos y/o aminoácidos en comparación con las secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos de la molécula de unión original y que todavía puede competir por la unión a la pareja de unión, por ejemplo, una proteína intracelular de la célula huésped, con la molécula de unión original. En otras palabras, las modificaciones en la secuencia de aminoácidos y/o nucleótidos de la molécula de unión original no afectan ni alteran significativamente las características de unión de la molécula de unión codificada por la secuencia de nucleótidos o que contiene la secuencia de aminoácidos, es decir, la molécula de unión todavía puede reconocer y unirse a su diana. La variante funcional puede tener modificaciones de secuencia conservativas incluyendo sustituciones, adiciones y delecciones de nucleótidos y aminoácidos. Estas modificaciones pueden introducirse mediante técnicas convencionales conocidas en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR al azar, y puede comprender nucleótidos y aminoácidos naturales así como no naturales.

50 Las sustituciones de aminoácidos conservativas incluyen aquellas en las que el residuo de aminoácido se sustituye por un residuo de aminoácido que presenta propiedades químicas o estructurales similares. Se han definido en la técnica familias de residuos de aminoácido que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cistina, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales ramificadas en beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Resultará

claro para el experto en la técnica que pueden emplearse también otras clasificaciones de familias de residuos de aminoácido distintas de la usada anteriormente. Además, una variante puede tener sustituciones de aminoácidos no conservativas, por ejemplo, la sustitución de un aminoácido por un residuo de aminoácido que tiene propiedades químicas o estructurales diferentes. Variaciones menores similares pueden incluir también deleciones o inserciones de aminoácidos, o ambos. Pueden encontrarse directrices para la determinación de qué residuos de aminoácido pueden sustituirse, insertarse o deleccionarse sin suprimir la actividad inmunológica usando programas informáticos bien conocidos en la técnica.

Una mutación en una secuencia de nucleótidos puede ser una única alteración realizada en un locus (una mutación puntual), tal como mutaciones por transición o transversión, o alternativamente pueden insertarse, deleccionarse o cambiarse múltiples nucleótidos en un único locus. Además, puede realizarse una o más alteraciones en cualquier número de loci dentro de una secuencia de nucleótidos. Las mutaciones pueden realizarse mediante cualquier método conocido en la técnica.

Huésped

El término “huésped”, tal como se usa en el presente documento, pretende referirse a un organismo o una célula en la que se ha introducido un vector tal como un vector de clonación o un vector de expresión. El organismo o la célula puede ser procarionta o eucarionta. Debe entenderse que este término pretende referirse no sólo al organismo o la célula objeto particular, sino también a la progenie de un organismo o una célula de este tipo también. Debido a que pueden producirse ciertas modificaciones en generaciones posteriores debido a o bien mutación o bien influencias medioambientales, tal progenie, de hecho, puede no ser idéntica al organismo o la célula original, pero todavía está incluida dentro del alcance del término “huésped” tal como se usa en el presente documento.

Humano/a

El término “humano/a”, cuando se aplica a moléculas de unión tal como se define en el presente documento, se refiere a moléculas que o bien se derivan directamente de un ser humano o bien se basan en una secuencia humana. Cuando una molécula de unión se deriva de o se basa en una secuencia humana y posteriormente se modifica, todavía se considera humana tal como se usa a lo largo de toda la memoria descriptiva. En otras palabras, el término humano/a, cuando se aplica a moléculas de unión, pretende incluir moléculas de unión que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana o basadas en regiones variables o constantes que se producen en un ser humano o linfocito humano y modificadas de alguna forma. Por tanto, las moléculas de unión humanas pueden incluir residuos de aminoácido no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana, comprender sustituciones y/o deleciones (por ejemplo, mutaciones introducidas mediante por ejemplo mutaciones al azar o específicas de sitio *in vitro* o bien mutación somática *in vivo*). “Basado en” tal como se usa en el presente documento se refiere a la situación de que una secuencia de ácido nucleico puede copiarse exactamente de un molde, o con mutaciones menores, tal como mediante métodos de PCR propensa a errores, o prepararse de manera sintética coincidiendo con el molde exactamente o con modificaciones menores. Se considera también que moléculas semisintéticas basadas en secuencias humanas son humanas tal como se usa en el presente documento.

Inserción

El término “inserción”, también conocido como el término “adición”, indica un cambio en una secuencia de aminoácidos o nucleótidos que da como resultado la adición de uno o más residuos de aminoácido o nucleótido, respectivamente, en comparación con la secuencia original.

Aislado/a

El término “aislado/a”, cuando se aplica a moléculas de unión tal como se define en el presente documento, se refiere a moléculas de unión que están sustancialmente libres de otras proteínas o polipéptidos, particularmente libres de otras moléculas de unión que tienen especificidades antigénicas diferentes, y también están sustancialmente libres de otro material celular y/o productos químicos. Por ejemplo, cuando las moléculas de unión se producen de manera recombinante, están preferiblemente libres sustancialmente de medio de cultivo, y cuando las moléculas de unión se producen mediante síntesis química, están preferiblemente libres sustancialmente de precursores químicos u otros productos químicos, es decir, están separadas de precursores químicos u otros productos químicos que están implicados en la síntesis de la proteína. El término “aislado/a” cuando se aplica a moléculas de ácido nucleico que codifican moléculas de unión tal como se define en el presente documento, pretende referirse a moléculas de ácido nucleico en las que las secuencias de nucleótidos que codifican las moléculas de unión están libres de otras secuencias de nucleótidos, particularmente secuencias de nucleótidos que codifican moléculas de unión que se unen a parejas de unión distintas de proteínas de la célula huésped. Además, el término “aislado” se refiere a moléculas de ácido nucleico que están sustancialmente separadas de otros componentes celulares que acompañan de manera natural a la molécula de ácido nucleico nativa en su huésped natural, por ejemplo, ribosomas, polimerasas o secuencias genómicas con las que está asociada de manera natural. Además, moléculas de ácido nucleico “aisladas”, tales como moléculas de ADNc, pueden estar sustancialmente libres de otro material celular, o medio de cultivo cuando se producen mediante técnicas recombinantes, o

sustancialmente libres de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetizan químicamente.

Anticuerpo monoclonal

5 La expresión “anticuerpo monoclonal” tal como se usa en el presente documento se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular individual. Un anticuerpo monoclonal presenta una única especificidad de unión y afinidad por un epítipo particular. Por consiguiente, la expresión “anticuerpo monoclonal humano” se refiere a un anticuerpo que presenta una única especificidad de unión que tiene regiones variables y constantes derivadas de o basadas en secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana o derivadas de secuencias completamente sintéticas. El método de preparación del anticuerpo monoclonal no es relevante.

Que se produce de manera natural

10 La expresión “que se produce de manera natural” tal como se usa en el presente documento tal como se aplica a un objeto se refiere al hecho de que un objeto puede encontrarse en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de polipéptido o polinucleótido que está presente en un organismo que puede aislarse de una fuente en la naturaleza y que no se ha modificado de manera intencionada por el hombre en el laboratorio se produce de manera natural.

Molécula de ácido nucleico

15 La expresión “molécula de ácido nucleico” tal como se usa en la presente invención se refiere a una forma polimérica de nucleótidos e incluye hebras tanto sentido como antisentido de ARN, ADNc, ADN genómico y formas sintéticas de polímeros mixtos de los anteriores. Un nucleótido se refiere a un ribonucleótido, desoxinucleótido o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. La expresión también incluye formas mono y bicatenarias de ADN. Además, un polinucleótido puede incluir cualquiera o tanto nucleótidos modificados como que se producen de
20 manera natural unidos entre sí mediante enlaces de nucleótidos que se producen de manera natural y/o que no se producen de manera natural. Las moléculas de ácido nucleico pueden modificarse química o bioquímicamente o pueden contener bases de nucleótidos no naturales o derivatizadas, tal como apreciarán fácilmente los expertos en la técnica. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, marcadores, metilación, sustitución de uno o más de los nucleótidos que se producen de manera natural por un análogo, modificaciones internucleotídicas tales como
25 enlaces no cargados (por ejemplo, fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosforamidatos, carbamatos, etc.), enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), restos colgantes (por ejemplo, polipéptidos), intercaladores (por ejemplo, acridina, psoralen, etc.), quelantes, alquilantes y enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa-anoméricos, etc.). La expresión anterior también pretende incluir cualquier conformación topológica, incluyendo conformaciones monocatenarias, bicatenarias, parcialmente dobles, triples, en horquilla, circulares y de candado. También se incluyen moléculas sintéticas que imitan a los polinucleótidos en su capacidad para unirse a una secuencia designada por medio de puentes de hidrógeno y otras interacciones químicas. Tales moléculas se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, aquellas en las que enlaces fosfato sustituyen a enlaces peptídicos en la estructura principal de la molécula. Una referencia a una secuencia de ácido nucleico abarca su
30 complemento a menos que se especifique lo contrario. Por tanto, debe entenderse que una referencia a una molécula de ácido nucleico que presenta una secuencia particular abarca su hebra complementaria, con su secuencia complementaria. La hebra complementaria es también útil, por ejemplo, para terapia antisentido, sondas de hibridación y cebadores de PCR.

Operativamente unido

40 La expresión “operativamente unido” se refiere a dos o más elementos de secuencia de ácido nucleico que habitualmente están físicamente unidos y están en una relación funcional entre sí. Por ejemplo, un promotor está operativamente unido a una secuencia codificante, si el promotor puede iniciar o regular la transcripción o expresión de una secuencia codificante, en cuyo caso debe entenderse que la secuencia codificante está “bajo el control del” promotor.

Excipiente farmacéuticamente aceptable

45 Por “excipiente farmacéuticamente aceptable” quiere decirse cualquier sustancia inerte que se combina con una molécula activa tal como un fármaco, agente o molécula de unión para preparar una forma farmacéutica conveniente o agradable. El “excipiente farmacéuticamente aceptable” es un excipiente que no es tóxico para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, y es compatible con otros componentes de la formulación que comprende el fármaco, agente o molécula de unión.

Unión de manera específica

50 La expresión “unión de manera específica”, tal como se usa en el presente documento, en referencia a la interacción de una molécula de unión, por ejemplo un anticuerpo, y su pareja de unión, por ejemplo un antígeno, significa que la interacción depende de la presencia de una estructura particular, por ejemplo un determinante antigénico o epítipo, en la pareja de unión. En otras palabras, el anticuerpo se une o reconoce preferentemente la pareja de unión incluso
55 cuando la pareja de unión está presente en una mezcla de otras moléculas u organismos. La unión puede estar mediada por interacciones covalentes o no covalentes o una combinación de ambas. Aún en otras palabras, la

expresión “unión de manera específica” significa la unión de manera inmuno-específica a un antígeno o un fragmento del mismo y no la unión de manera inmuno-específica a otros antígenos. Una molécula de unión que se une de manera inmuno-específica a un antígeno puede unirse a otros péptidos o polipéptidos con afinidad inferior tal como se determina, por ejemplo, mediante radioinmunoanálisis (RIA), ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), BIACORE u otros ensayos conocidos en la técnica. Las moléculas de unión o fragmentos de las mismas que se unen de manera inmuno-específica a un antígeno pueden reaccionar de manera cruzada con antígenos relacionados. Preferiblemente, las moléculas de unión o fragmentos de las mismas que se unen de manera inmuno-específica a un antígeno no reaccionan de manera cruzada con otros antígenos.

Sustituciones

Una “sustitución”, tal como se usa en el presente documento, indica la sustitución de uno o más aminoácidos o nucleótidos por diferentes aminoácidos o nucleótidos, respectivamente.

Cantidad terapéuticamente eficaz

La expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad de la molécula de unión tal como se define en el presente documento que es eficaz para prevenir, mejorar y/o tratar un estado que resulta de una infección viral.

Tratamiento

El término “tratamiento” se refiere a tratamiento terapéutico así como a medidas profilácticas o preventivas para curar o detener o al menos retrasar la evolución de la enfermedad. Aquellos que necesitan el tratamiento incluyen los que ya están aquejados de un estado que resulta de una infección viral así como aquellos en los que va a prevenirse una infección viral. Sujetos parcial o totalmente recuperados de una infección viral podrían necesitar también el tratamiento. La prevención abarca inhibir o reducir la propagación de un virus o la inhibición o reducción de la aparición, el desarrollo o la evolución de uno o más de los síntomas asociados con una infección viral.

Vector

El término “vector” indica una molécula de ácido nucleico en la que puede insertarse una segunda molécula de ácido nucleico para su introducción en un huésped en el que se replicará, y en algunos casos se expresará. En otras palabras, un vector puede transportar una molécula de ácido nucleico a la que se ha unido. El término “vector” contempla vectores de clonación así como vectores de expresión, tal como se usa en el presente documento. Los vectores incluyen, pero no se limitan a, plásmidos, cósmidos, cromosomas artificiales bacterianos (BAC) y cromosomas artificiales de levaduras (YAS) y vectores derivados de bacteriófagos o virus vegetales o animales (incluyendo humanos). Los vectores comprenden un origen de replicación reconocido por el huésped propuesto y en el caso de vectores de expresión, secuencias promotoras y otras regiones reguladoras reconocidas por el huésped. Se introduce un vector que contiene una segunda molécula de ácido nucleico en una célula mediante transformación, transfección o haciendo uso de mecanismos de entrada viral. Ciertos vectores pueden replicarse de manera autónoma en un huésped en el que se introducen (por ejemplo, vectores que tienen un origen de replicación bacteriano pueden replicarse en bacterias). Otros vectores pueden integrarse en el genoma de un huésped tras su introducción en el huésped, y de ese modo que replican junto con el genoma del huésped.

SUMARIO DE LA INVENCION

La invención proporciona moléculas de unión capaces de unirse específicamente a una proteína de la célula huésped y pueden neutralizar virus. La invención también se refiere a moléculas de ácido nucleico que codifican al menos la región de unión de las moléculas de unión. La invención proporciona además el uso de las moléculas de unión de la invención en la profilaxis y/o el tratamiento de un sujeto que tiene, o corre el riesgo de desarrollar, una infección viral. Además de eso, la invención se refiere al uso de las moléculas de unión de la invención en el diagnóstico/la detección de una infección viral.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

En un primer aspecto, la presente invención abarca moléculas de unión capaces de unirse específicamente a una proteína de la célula huésped. Preferiblemente, la proteína de la célula huésped es una proteína intracelular de la célula huésped, lo que significa que la proteína de la célula huésped no está expuesta normalmente (por ejemplo en una célula huésped no infectada) al exterior de la célula huésped tal como por ejemplo un receptor de superficie celular. En un aspecto, la proteína de la célula huésped es una proteína de la célula huésped de mamíferos, preferiblemente humana. En células huésped normales (por ejemplo no infectadas), células huésped la proteína intracelular de la célula huésped puede tener una ubicación citoplasmática (es una proteína citoplasmática). Alternativamente, puede estar ubicada sobre o dentro de los orgánulos de la célula huésped incluyendo, pero sin limitarse a, la mitocondria, el aparato de Golgi, el núcleo, vacuolas, vesículas y/o el retículo endoplasmático. Tras la infección de la célula huésped con un virus, la proteína intracelular de la célula huésped puede desplazarse a la membrana celular y puede ubicarse/incorporarse en o sobre la superficie celular de la célula huésped. En otras palabras, tras la infección de la célula huésped con un virus, la proteína intracelular de la célula huésped puede presentarse en la superficie de la célula huésped. La ubicación de la proteína de la célula huésped en células

normales (por ejemplo no infectadas) en comparación con células infectadas puede diferir por tanto. Las moléculas de unión de la invención pueden unirse específicamente a una célula huésped, una vez que la proteína intracelular de la célula huésped se expone en o sobre la superficie de la célula. Preferiblemente, las moléculas de unión de la invención pueden unirse también a un fragmento de una proteína de la célula huésped, comprendiendo dicho fragmento al menos un determinante antigénico reconocido por las moléculas de unión de la invención. Un “determinante antigénico” tal como se usa en el presente documento es un resto, tal como un (poli)péptido, una proteína, una glicoproteína, un análogo o fragmento del mismo que puede unirse a una molécula de unión de la invención con afinidad suficientemente alta para formar un complejo de antígeno-molécula de unión detectable.

Según la invención, la proteína intracelular de la célula huésped reconocida por las moléculas de unión de la invención es el factor 1 asociado a Fas (FAF-1; para la secuencia de nucleótidos véase SEQ ID NO:1 (los nucleótidos 278-2230 codifican la proteína) y para la secuencia de aminoácidos véase SEQ ID NO:2; véase también Genbank n.º BC067100) o NADH-deshidrogenasa (ubiquinona) flavoproteína-1 (NDUFV-1; para la secuencia de nucleótidos véase SEQ ID NO:3 (los nucleótidos 34-1428 codifican la proteína) y para la secuencia de aminoácidos véase SEQ ID NO:4; véase también Genbank n.º BC015645.2). En una realización de la invención, formas truncadas o secretadas que se producen de manera natural, formas variantes que se producen de manera natural (por ejemplo, formas cortadas y empalmadas de manera alternativa) y variantes alélicas que se producen de manera natural de FAF-1 o NDUFV-1, particularmente la FAF-1 o NDUFV-1 que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:4, respectivamente, son también una parte de la presente invención. Se muestra una forma variante de NDUFV-1 en Genbank n.º BC008146.1. Esta forma variante tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica a SEQ ID NO:4, con la condición de que carece de los aminoácidos 16-24 de SEQ ID NO:4. Pueden encontrarse otras formas variantes de NDUFV-1 en Genbank n.ºs S67973.1, CR605492.1 y BC007619.1. Se muestra una forma variante de FAF-1 en Genbank n.º NM131917. Esta forma variante tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica a SEQ ID NO:2, con la condición de que como resultado de la falta de una secuencia codificante interna, carece de los aminoácidos 189-344 (pero tiene los mismos extremos N y C-terminales en comparación con la forma de longitud completa de FAF-1). Los aminoácidos 189-344 se han sustituido por los aminoácidos FSSR en esta forma variante. Preferiblemente, las moléculas de unión de la invención pueden unirse específicamente a las variantes y formas alternativas de FAF-1 o NDUFV-1, siempre que las modificaciones en las variantes y formas alternativas no supriman la unión de las moléculas de unión a las mismas. Variantes de FAF-1 o NDUFV-1 pueden comprender una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos el 95%, preferiblemente al menos el 97%, más preferiblemente al menos el 98% e incluso más preferiblemente al menos el 99% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4, respectivamente. Las técnicas de biología molecular para preparar variantes y formas de FAF-1 o NDUFV-1 de manera recombinante y/o purificarlas a partir de una fuente (natural) están dentro del conocimiento del experto en la técnica y también se contemplan en el presente documento.

La presente invención también abarca moléculas de unión capaces de unirse específicamente a un fragmento de FAF-1 o NDUFV-1 o cualquiera de las variantes o formas descritas anteriormente. El fragmento debe comprender al menos el determinante antigénico de FAF-1 o NDUFV-1 reconocido por las moléculas de unión respectivas.

En un aspecto de la invención, la proteína intracelular de la célula huésped puede incorporarse en una membrana viral. La incorporación puede tener lugar dentro de la célula huésped, por ejemplo en el citoplasma, pero también puede tener lugar dentro o sobre la superficie de uno de los orgánulos de las células huésped. Alternativamente, la incorporación también puede tener lugar cerca, en o sobre la superficie de la célula huésped, por ejemplo cuando tras la infección de la célula huésped con un virus la proteína intracelular de la célula huésped se presenta en la superficie de la célula huésped. En otras palabras, la proteína de la célula huésped puede incorporarse en la membrana viral de los virus recién formados tras la infección de una célula huésped con un virus. Por tanto, la proteína intracelular de la célula huésped también puede estar presente en o sobre virus, partículas similares a virus (VLP) u otro material que comprende al menos una membrana viral o partes de la misma que comprende la proteína de la célula huésped. En consecuencia, las moléculas de unión de la invención pueden unirse específicamente a virus, partículas similares a virus o el otro material que comprende al menos una membrana viral o partes de la misma que comprende la proteína de la célula huésped. Los virus que comprenden la proteína de la célula huésped pueden estar en forma activada o inactivada/atenuada. Se conocen bien en la técnica métodos para inactivar/atenuar virus e incluyen, pero no se limitan a, inactivación por calor, inactivación por irradiación UV e inactivación por irradiación gamma. Tal como se usa en el presente documento, “partícula similar a virus” se refiere a una partícula viral que se ensambla para dar estructuras virales envueltas intactas. Sin embargo, una partícula similar a virus no contiene información genética suficiente para replicarse. Las partículas similares a virus tienen esencialmente un aspecto físico similar al virus de tipo natural, es decir, esencialmente son morfológica y antigénicamente similares a viriones auténticos. Las partículas similares a virus tal como se usa en el presente documento pueden comprender, próximas a la proteína intracelular de la célula huésped, secuencias de aminoácidos virales de tipo natural. Las partículas similares a virus también pueden incluir copias funcionales de ciertos genes. Además, las partículas similares a virus también pueden incluir ácido nucleico foráneo. Las partículas similares a virus pueden ser partículas virales que se producen de manera natural o que no se producen de manera natural. Pueden carecer de copias funcionales de ciertos genes del virus de tipo natural, y esto puede dar como resultado que la partícula similar a virus no pueda realizar alguna función que es característica del virus de tipo natural, tal como replicación y/o movimiento célula-célula. Las copias funcionales que faltan de los genes puede

proporcionarlas el genoma de una célula huésped o en un plásmido presente en la célula huésped, restaurando de ese modo la función del virus de tipo natural en la partícula similar a virus cuando se encuentra en la célula huésped. Preferiblemente, las partículas similares a virus presentan el mismo tropismo celular que el virus de tipo natural. La partícula similar a virus puede ser no infecciosa, pero es preferiblemente infecciosa. El término "infeccioso" tal como se usa en el presente documento significa la capacidad de la partícula similar a virus para completar las etapas iniciales del ciclo viral que conducen a la entrada en la célula. En una realización de la invención, la partícula similar a virus se autoensambla. En otra realización, las partículas similares a virus son pseudovirus. El experto en la técnica conoce bien los pseudovirus y su producción. Preferiblemente, los pseudovirus tal como se usa en el presente documento comprenden la proteína intracelular de la célula huésped en su superficie, por ejemplo, incorporada en su membrana viral. Pueden producirse partículas similares a virus en células huésped adecuadas tales como, entre otras, células de mamífero. Pueden producirse intracelular y/o extracelularmente y pueden recogerse, aislarse y/o purificarse como partículas similares a virus intactas mediante medios conocidos para el experto tales como entre otros cromatografía de afinidad, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico y/o sedimentación en gradiente de densidad. Una partícula similar a virus tal como se describe en el presente documento, particularmente una que comprende una proteína intracelular de la célula huésped, por ejemplo FAF-1 y/o NDUFV-1, incorporada en su membrana viral, también es parte de la presente invención.

En una realización la partícula similar a virus se deriva de un virus con envuelta, preferiblemente un miembro del género flavivirus tal como VNO. En una realización, la partícula similar a virus derivada de VNO también comprende la proteína E de VNO. En otra realización, esta partícula similar a virus comprende además la proteína M de VNO. Mediante una "proteína E y M de VNO" quiere decirse una proteína de la envuelta y la membrana, respectivamente, de cualquier cepa de VNO. Preferiblemente, las proteínas E y M de VNO se derivan de una misma cepa de VNO.

En un aspecto adicional, las moléculas de unión de la invención tienen actividad neutralizante de virus. Preferiblemente, las moléculas de unión de la invención tienen actividad neutralizante de virus frente a virus de más de un género. Preferiblemente, neutralizan virus de al menos dos géneros diferentes, más preferiblemente al menos tres géneros diferentes, incluso más preferiblemente al menos cuatro géneros diferentes y en particular al menos cinco o más géneros diferentes. Los virus pueden ser virus no envueltos, pero preferiblemente son virus con envuelta incluyendo, pero sin limitarse a, Herpesviridae (por ejemplo virus del herpes simple tipo 1, 2, 6, 7, 8, citomegalovirus, virus de la varicela zoster, virus de Epstein-Barr), Poxviridae (por ejemplo virus de la viruela), Retroviridae (por ejemplo VIH1, VIH2, HTLV1, HTLV2), Paramyxoviridae (por ejemplo virus de las paperas, virus del sarampión, virus respiratorio sincitial, virus parainfluenza), HepaDNAviridae (por ejemplo virus de la hepatitis B), Orthomyxoviridae (por ejemplo virus influenza A o B), Togaviridae (por ejemplo rubeola), Flaviviridae (por ejemplo virus de la fiebre amarilla, virus del Dengue, virus del Nilo occidental, virus de la hepatitis C, virus de la encefalitis japonesa, virus de la encefalitis de Venezuela), Rhabdoviridae (por ejemplo virus de la rabia), Arenaviridae (por ejemplo virus de Lassa, virus de la coriomeningitis linfocítica) y Coronaviridae (por ejemplo virus SARS, virus de la metaneumonía). Además, pueden neutralizar también virus no mencionados anteriormente, incluyendo, pero sin limitarse a, virus Sindbis, poliovirus, virus del papiloma humano, virus adenoasociado, virus de coxsackie, enterovirus, virus de la hepatitis A, virus de la encefalitis transmitido por garrapatas, astrovirus, virus del Ébola, virus de Marburg, virus de La Crosse, virus de la encefalitis de California, virus Hantaan, virus de Crimea-Congo, fiebre del valle del Rift, virus de la fiebre hemorrágica argentina, virus de la fiebre hemorrágica boliviana, fiebre por garrapatas de Colorado, virus JC, virus BK, adenovirus humano y parvovirus humano. Preferiblemente, las moléculas de unión de la invención tienen una amplia actividad neutralizante del virus y pueden neutralizar diferentes, preferiblemente todos, los virus dentro de un género. Preferiblemente, neutralizan diferentes, preferiblemente todas, las cepas de un virus dado.

En un aspecto específico las moléculas de unión de la invención tienen actividad neutralizante de flavivirus, preferiblemente actividad neutralizante del virus del Nilo occidental. El género flavivirus es un miembro de la familia Flaviviridae. Los flavivirus son virus de ARN de cadena positiva envueltos esféricos pequeños. El género flavivirus comprende más de 80 virus sumamente relacionados incluyendo varios patógenos de seres humanos tales como entre otros el virus de la fiebre amarilla, virus de la encefalitis japonesa, virus de la encefalitis de San Luis, virus de la encefalitis del valle de Murray, virus de la encefalitis transmitido por garrapatas y virus del Dengue. Pueden encontrarse otros virus que pertenecen al género flavivirus entre otros en Kuno *et al.* (1998). Preferiblemente, las moléculas de unión de la invención pueden neutralizar tanto variantes del linaje I de VNO tales como entre otras la cepa 385-99 como variantes del linaje II de VNO tales como entre otras la cepa H-442. En la realización más preferida, las moléculas de unión de la invención pueden neutralizar esencialmente todas las variantes y cepas de VNO actualmente conocidas. En una realización, las moléculas de unión de la invención también neutralizan al menos otro flavivirus incluyendo, pero sin limitarse a, virus de la fiebre amarilla, virus de la encefalitis japonesa, virus de la encefalitis de San Luis, virus de la encefalitis del valle de Murray, virus de la encefalitis transmitido por garrapatas y virus del Dengue, por ejemplo virus del Dengue 1, 2, 3, 4. Además de miembros del género flavivirus, pueden neutralizarse miembros virales del pestivirus en hepacivirus tales como virus de la hepatitis C. Como flavivirus, el ensamblaje y la gemación del virus de la hepatitis C tiene lugar en el RE.

En un aspecto adicional, las moléculas de unión de la invención también tienen actividad neutralizante del virus de la rabia. En un aspecto de la invención, también pueden unirse específicamente al virus de la rabia. El virus de la rabia es miembro del género Lyssavirus. En total, el género Lyssavirus incluye once genotipos: virus de la rabia (genotipo 1), virus del murciélago de Lagos (genotipo 2), virus de Mokola (genotipo 3), virus de Duvenhage (genotipo 4),

lyssavirus del murciélago europeo 1 (genotipo 5), lyssavirus del murciélago europeo 2 (genotipo 6), lyssavirus del murciélago australiano (genotipo 7), virus Aravan (genotipo 8), virus Khujand (genotipo 9), virus Irkut (genotipo 10) y virus del Cáucaso occidental (genotipo 11). Además del virus de la rabia, las moléculas de unión de la invención pueden unirse también a otros genotipos del género Lyssavirus. Preferiblemente, las moléculas de unión también pueden neutralizar otros genotipos del género Lyssavirus. Además, las moléculas de unión de la invención pueden unirse a y/o neutralizar virus, distintos de Lyssavirus, de la familia rhabdovirus. Esta familia incluye, pero no se limita a, los géneros ephemerovirus, lyssavirus, rhabdovirus y vesiculovirus.

En una realización, las moléculas de unión de la invención son moléculas de unión humanas. Las moléculas de unión de la invención pueden ser moléculas de inmunoglobulina intactas tales como anticuerpos policlonales o monoclonales o las moléculas de unión pueden ser fragmentos de unión a antígeno incluyendo, pero sin limitarse a, Fab, F(ab'), F(ab')₂, Fv, dAb, Fd, fragmentos de región determinante de complementariedad (CDR), anticuerpos de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de cadena sencilla bivalentes, anticuerpos en fagos de cadena sencilla, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y (poli)péptidos que contienen al menos un fragmento de una inmunoglobulina que es suficiente para conferir unión a antígeno específico a la proteína intracelular de la célula huésped o fragmento de la misma. En una realización preferida, las moléculas de unión humanas que tienen actividad neutralizante de virus se administran en formato de IgG1, IgA o IgM.

Las moléculas de unión de la invención pueden usarse en forma aislada o no aislada. Además, las moléculas de unión de la invención pueden usarse solas o en una mezcla que comprende al menos una molécula de unión (o variante o fragmento de la misma) de la invención. En otras palabras, las moléculas de unión pueden usarse en combinación, por ejemplo, como una composición farmacéutica que comprende al menos dos o más moléculas de unión de la invención, variantes o fragmentos de la misma. Por ejemplo, pueden combinarse moléculas de unión que tienen actividades diferentes pero complementarias en una única terapia para lograr un efecto profiláctico, terapéutico o de diagnóstico deseado, aunque alternativamente también pueden combinarse moléculas de unión que tienen actividades idénticas en una única terapia para lograr un efecto profiláctico, terapéutico o de diagnóstico deseado. La mezcla puede comprender además al menos otro agente terapéutico. Preferiblemente, el agente terapéutico es útil en la profilaxis y/o el tratamiento de una infección viral (por ejemplo infección por VNO).

Normalmente, las moléculas de unión según la invención pueden unirse a sus parejas de unión, es decir, las proteínas intracelulares de la célula huésped o fragmentos de las mismas, con una constante de afinidad (valor de Kd) que es inferior a $0,2 \times 10^{-4}$ M, $1,0 \times 10^{-5}$ M, $1,0 \times 10^{-6}$ M, $1,0 \times 10^{-7}$ M, preferiblemente inferior a $1,0 \times 10^{-8}$ M, más preferiblemente inferior a $1,0 \times 10^{-9}$ M, más preferiblemente inferior a $1,0 \times 10^{-10}$ M, incluso más preferiblemente inferior a $1,0 \times 10^{-11}$ M y en particular inferior a $1,0 \times 10^{-12}$ M. Las constantes de afinidad pueden variar para isotipos de anticuerpos. Por ejemplo, unión de afinidad para un isotipo IgM se refiere a una afinidad de unión de al menos aproximadamente $1,0 \times 10^{-7}$ M. Las constantes de afinidad pueden medirse por ejemplo usando resonancia de plasmón superficial, es decir, un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones biospecíficas en tiempo real mediante la detección de alteraciones en concentraciones de proteína dentro de una matriz de biosensor, por ejemplo usando el sistema BIACORE (Farmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia).

Las moléculas de unión según la invención pueden unirse a la proteína intracelular de la célula huésped o fragmento de la misma en forma soluble tal como por ejemplo en una muestra o pueden unirse a la proteína intracelular de la célula huésped o un fragmento de la misma unidas o acopladas a un portador o sustrato, por ejemplo, placas de microtitulación, membranas y perlas, etc. Los portadores o sustratos pueden estar fabricados de vidrio, plástico (por ejemplo, poliestireno), polisacáridos, nailon, nitrocelulosa o teflón, etc. La superficie de tales soportes puede ser sólida o porosa y de cualquier forma conveniente. Además, las moléculas de unión pueden unirse a la proteína intracelular de la célula huésped en forma purificada/aislada o no purificada/no aislada. En consecuencia, las moléculas de unión pueden unirse a la proteína intracelular de la célula huésped cuando se incorpora en la célula huésped y/o membrana viral, tal como en una célula huésped infectada, a virus o una partícula similar a virus.

Las moléculas de unión de la invención pueden neutralizar la infectividad de los virus. Esto puede lograrse seleccionando como diana acontecimientos virales específicos en los que están implicados las proteínas intracelulares de la célula huésped incluyendo, pero sin limitarse a, unión del virus a membranas celulares y penetración en células, pérdida de la envuelta del virus, síntesis de ácido nucleico del virus, síntesis de proteínas virales y maduración, ensamblaje y liberación de partículas infecciosas, selección como diana de la membrana de células infectadas dando como resultado una señal que conduce a la no replicación o a una tasa de replicación inferior del virus. Se conocen en la técnica ensayos de neutralización para diferentes virus. Puede medirse por ejemplo la actividad neutralizante de VNO, virus de la fiebre amarilla, virus de la encefalitis japonesa, virus de la encefalitis de San Luis, virus del Dengue y virus de la rabia tal como se describe en el presente documento. Se describen ensayos de neutralización de VNO alternativos en por ejemplo Gollins y Porterfield (1986).

En una realización preferida, las moléculas de unión según la invención comprenden al menos una región CDR3, preferiblemente una región CDR3 de cadena pesada, que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:6. En una realización, las moléculas de unión de la invención pueden comprender dos, tres, cuatro, cinco o incluso las seis regiones CDR de las moléculas de unión de la invención. La región CDR1 de cadena pesada, la región CDR2 de cadena pesada, la región CDR1 de cadena ligera, la región CDR2 de cadena ligera y la región CDR3 de cadena ligera de las moléculas de unión de la invención se

muestran en la tabla 9. Las regiones CDR son según Kabat *et al.* (1991) tal como se describe en Sequences of Proteins of Immunological Interest.

5 Aún en otra realización, las moléculas de unión según la invención comprenden una cadena pesada que comprende la cadena pesada variable de la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:18 y SEQ ID NO:20. En una realización adicional, las moléculas de unión según la invención comprenden una cadena ligera que comprende la cadena ligera variable de la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:22 y SEQ ID NO: 24. La tabla 8 especifica, próxima a la región CDR3 de cadena pesada, la secuencia de nucleótidos y aminoácidos de las cadenas pesada y ligera (sus regiones variables) de los anticuerpos de cadena sencilla.

10 Aún en una realización adicional, las moléculas de unión de la invención comprenden una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs 30 y 32, y/o comprenden una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID Nos 34 y 36.

15 En otra realización, las moléculas de unión de la invención comprenden una región CDR1 de cadena pesada, región CDR2 de cadena pesada, región CDR3 de cadena pesada, región CDR1 de cadena ligera, región CDR2 de cadena ligera y región CDR3 de cadena ligera tal como se muestra en SEQ ID Nos 12, 13, 6, 143, 144 y 145, respectivamente. Aún en otra realización, las moléculas de unión de la invención comprenden una cadena pesada que comprende la cadena pesada variable de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:20 y/o comprenden una cadena ligera que comprende la cadena ligera variable de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:74, es decir, los aminoácidos 1-113 de SEQ ID NO:74. Aún en una realización adicional, las moléculas de unión de la invención comprenden una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 32, y/o comprenden una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:74.

25 Otro aspecto de la invención incluye variantes funcionales de las moléculas de unión tal como se definen en el presente documento. Se considera que moléculas son variantes funcionales de una molécula de unión según la invención si las variantes pueden competir por la unión específica a las proteínas intracelulares de la célula huésped o fragmento de las mismas con las moléculas de unión originales. La proteína de la célula huésped puede estar incorporada en la membrana viral. En otras palabras, cuando las variantes funcionales todavía pueden unirse a la las proteínas intracelulares de la célula huésped o fragmento de las mismas. Además, se considera que moléculas son variantes funcionales de una molécula de unión según la invención si tienen actividad neutralizante de virus (por ejemplo actividad neutralizante de VNO). Las variantes funcionales incluyen, pero no se limitan a, derivados que son sustancialmente similares en secuencia estructural primaria, pero que contienen por ejemplo modificaciones *in vitro* o *in vivo*, químicas y/o bioquímicas, que no se encuentran en la molécula de unión original. Tales modificaciones incluyen entre otras acetilación, acilación, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado de lípido, reticulación, formación de enlaces disulfuro, glicosilación, hidroxilación, metilación, oxidación, pegilación, procesamiento proteolítico, fosforilación.

35 Alternativamente, las variantes funcionales pueden ser moléculas de unión tal como se definen en la presente invención que comprenden una secuencia de aminoácidos que contienen sustituciones, inserciones, deleciones o combinaciones de las mismas de uno o más aminoácidos en comparación con las secuencias de aminoácidos de las moléculas de unión originales. Además, las variantes funcionales pueden comprender truncamientos de la secuencia de aminoácidos en cualquiera o tanto el extremo amino terminal como carboxilo terminal. Las variantes funcionales según la invención pueden tener afinidades de unión iguales o diferentes, o bien superiores o bien inferiores, en comparación con la molécula de unión original pero todavía pueden unirse a las proteínas intracelulares de la célula huésped o fragmento de las mismas. Por ejemplo, las variantes funcionales según la invención pueden tener afinidades de unión aumentadas o disminuidas por las proteínas intracelulares de la célula huésped o fragmento de las mismas en comparación con las moléculas de unión originales. Preferiblemente, se modifican las secuencias de aminoácidos de las regiones variables, incluyendo, pero sin limitarse a, regiones de entramado, regiones hipervariables, en particular las regiones CDR3. Generalmente, la cadena ligera y las regiones variables de cadena pesada comprenden tres regiones hipervariables, que comprenden tres CDR, y regiones más conservadas, las denominadas regiones de entramado (FR). Las regiones hipervariables comprenden residuos de aminoácido de CDR y residuos de aminoácido de bucles hipervariables. Las variantes funcionales que se pretende que se encuentren dentro del alcance de la presente invención tienen al menos de aproximadamente el 50% a aproximadamente el 99%, preferiblemente al menos de aproximadamente el 60% a aproximadamente el 99%, más preferiblemente al menos de aproximadamente el 70% a aproximadamente el 99%, incluso más preferiblemente al menos de aproximadamente el 80% a aproximadamente el 99%, lo más preferiblemente al menos de aproximadamente el 90% a aproximadamente el 99%, en particular al menos de aproximadamente el 95% a aproximadamente el 99% y en particular al menos de aproximadamente el 97% a aproximadamente el 99% de homología de secuencia de aminoácidos con las moléculas de unión humanas originales tal como se definen en el presente documento. Pueden usarse algoritmos informáticos tales como entre otros Gap o Bestfit conocidos por un experto en la técnica para alinear de manera óptima secuencias de aminoácido que van a compararse y para definir residuos de aminoácido similares o idénticos. Pueden obtenerse variantes funcionales alterando las moléculas de unión originales o partes de las mismas mediante métodos de biología molecular generales conocidos en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a, PCR propensa a errores, mutagénesis dirigida por oligonucleótidos, mutagénesis

dirigida al sitio e intercambio de cadena pesada o ligera. Preferiblemente, las variantes funcionales de la invención tienen actividad neutralizante de virus. Esta actividad neutralizante puede ser o bien idéntica, o bien ser superior o inferior en comparación con las moléculas de unión originales. Además, preferiblemente las variantes funcionales tienen actividad neutralizante frente a más de uno género, preferiblemente frente a virus de al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, etc., géneros diferentes. En lo sucesivo, cuando se use la expresión molécula de unión (humana), también abarca variantes funcionales de la molécula de unión (humana).

Aún en un aspecto adicional, la invención incluye inmunoconjugados, es decir moléculas que comprenden al menos una molécula de unión tal como se define en el presente documento y que comprende además al menos una etiqueta, tal como entre otros un resto/agente detectable. También se contemplan en la presente invención mezclas de inmunoconjugados según la invención o mezclas de al menos un inmunoconjugados según la invención y otra molécula, tal como un agente terapéutico u otra molécula de unión o inmunoconjugado. En una realización adicional, los inmunoconjugados de la invención may comprender más de una etiqueta. Estas etiquetas pueden ser iguales o distintas entre sí y pueden unirse/conjugarse de manera no covalente a las moléculas de unión. La(s) etiqueta(s) también pueden unirse/conjugarse directamente a las moléculas de unión humanas a través de enlaces covalentes. Alternativamente, la(s) etiqueta(s) pueden unirse/conjugarse a las moléculas de unión por medio de uno o más compuestos conectores. El experto en la técnica conoce bien técnicas para conjugar etiquetas a moléculas de unión.

Las etiquetas de los inmunoconjugados de la presente invención pueden ser agentes terapéuticos, pero preferiblemente son restos/agentes detectables. Las etiquetas pueden ser también toxinas, tales como toxina botulínica o partes funcionales de la misma. Pueden usarse inmunoconjugados que comprenden un agente detectable en diagnóstico para, por ejemplo, evaluar si un sujeto se ha infectado con un virus o monitorizar el desarrollo o evolución de una infección por virus como parte de un procedimiento de pruebas clínicas para, por ejemplo, determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado. Sin embargo, también pueden usarse para otros fines de detección y/o analíticos y/o de diagnóstico tales como detección de virus o partículas similares a virus que comprenden la proteína intracelular de la célula huésped o células huésped que se han infectado y como consecuencia de lo mismo presentan la proteína intracelular de la célula huésped en su superficie. Los restos/agentes detectables incluyen, pero no se limitan a, enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radiactivos, metales que emiten positrones e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. Las etiquetas usadas para marcar las moléculas de unión para fines de detección y/o analíticos y/o de diagnóstico dependen de las técnicas y/o métodos de detección/análisis/diagnóstico específicos usados tales como entre otros tinción inmunohistoquímica de muestras (de tejido), detección por citometría de flujo, detección por citometría láser de barrido, inmunoensayos fluorescentes, ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), radioinmunoanálisis (RIA), bioensayos (por ejemplo, ensayos de neutralización), aplicaciones de inmunotransferencia de tipo Western, etc. Marcadores adecuados para las técnicas y/o métodos de detección/análisis/diagnóstico conocidos en la técnica están dentro del conocimiento del experto en la técnica.

Además, las moléculas de unión humanas o inmunoconjugados de la invención pueden unirse también a soportes sólidos, que son particularmente útiles para inmunoensayos *in vitro* o la purificación de la proteína intracelular de la célula huésped o fragmento de la misma, células huésped que presentan la proteína intracelular de la célula huésped en su superficie, o virus o partículas similares a virus que tienen la proteína intracelular de la célula huésped incorporada en la membrana viral. Tales soportes sólidos pueden ser porosos o no porosos, planos o no planos. Las moléculas de unión de la presente invención pueden fusionarse a secuencias marcadoras, tales como un péptido para facilitar su purificación. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, la etiqueta de hexa-histidina, la etiqueta de hemaglutinina (HA), la etiqueta myc o la etiqueta flag. Alternativamente, puede conjugarse un anticuerpo con un segundo anticuerpo para formar un anticuerpo heteroconjugado. En otro aspecto, las moléculas de unión de la invención pueden conjugarse/unirse a uno o más antígenos. Preferiblemente, estos antígenos son antígenos que se reconocen por el sistema inmunitario de un sujeto al que se administra el conjugado de molécula de unión-antígeno. Los antígenos pueden ser idénticos, pero también pueden diferir entre sí. Se conocen bien en la técnica métodos de conjugación para unir los antígenos y las moléculas de unión e incluyen, pero no se limitan a, el uso de agentes de reticulación. Las moléculas de unión de la invención se unirán a la proteína intracelular de la célula huésped y los antígenos unidos a las moléculas de unión iniciarán un potente ataque de células T sobre el conjugado, lo que finalmente conducirá a la destrucción de la estructura a la que está unida la proteína intracelular de la célula huésped o en la que se incorpora.

Además de producirse inmunoconjugados químicamente mediante conjugación, directa o indirectamente, mediante por ejemplo un conector, los inmunoconjugados pueden producirse como proteínas de fusión que comprenden las moléculas de unión de la invención y una etiqueta adecuada. Pueden producirse proteínas de fusión mediante métodos conocidos en la técnica tales como, por ejemplo, de manera recombinante construyendo moléculas de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican las moléculas de unión en marco con secuencias de nucleótidos que codifican la(s) etiqueta(s) adecuadas y expresando entonces las moléculas de ácido nucleico.

Otro aspecto de la presente invención es proporcionar una molécula de ácido nucleico que codifica al menos una molécula de unión o inmunoconjugado según la invención. Tales moléculas de ácido nucleico pueden usarse como productos intermedios para fines de clonación, por ejemplo en el proceso de maduración por afinidad tal como se

describió anteriormente. En una realización preferida, las moléculas de ácido nucleico se aíslan o purifican.

El experto apreciará que variantes funcionales de estas moléculas de ácido nucleico también pretenden ser una parte de la presente invención. Variantes funcionales son secuencias de ácido nucleico que pueden traducirse directamente, usando el código genético convencional, para proporcionar una secuencia de aminoácidos idéntica a la traducida a partir de las moléculas de ácido nucleico originales.

Preferiblemente, las moléculas de ácido nucleico codifican moléculas de unión que comprenden una región CDR3, preferiblemente una región CDR3 de cadena pesada, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:6. En una realización adicional, las moléculas de ácido nucleico codifican moléculas de unión que comprenden dos, tres, cuatro, cinco o incluso las seis regiones CDR de las moléculas de unión de la invención.

En otra realización, las moléculas de ácido nucleico codifican moléculas de unión que comprenden una cadena pesada que comprende la cadena pesada variable de la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:18 y SEQ ID NO:20. En otra realización, las moléculas de ácido nucleico codifican moléculas de unión que comprenden una cadena ligera que comprende la cadena ligera variable de la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:22 y SEQ ID NO:24.

Aún en una realización adicional, las moléculas de ácido nucleico codifican moléculas de unión que comprenden una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID Nos 30 y 32, y/o que comprenden una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID Nos 34 y 36.

En otra realización las moléculas de ácido nucleico codifican moléculas de unión que comprenden una región CDR1 de cadena pesada, región CDR2 de cadena pesada, región CDR3 de cadena pesada, región CDR1 de cadena ligera, región CDR2 de cadena ligera y región CDR3 de cadena ligera tal como se muestra en SEQ ID Nos 12, 13, 6, 143, 144 y 145, respectivamente. Aún en otra realización, las moléculas de ácido nucleico codifican moléculas de unión que comprenden una cadena pesada que comprende la cadena pesada variable de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:20 y/o que comprenden una cadena ligera que comprende la cadena ligera variable de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:74, es decir, los aminoácidos 1-113 de SEQ ID NO:74. Aún en una realización adicional las moléculas de ácido nucleico codifican moléculas de unión que comprenden una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 32, y/o que comprenden una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:74.

Otro aspecto de la invención es proporcionar vectores, es decir, constructos de ácido nucleico, que comprenden una o más moléculas de ácido nucleico según la presente invención. Los vectores pueden derivarse de plásmidos tales como, entre otros F, R1, RP1, Col, pBR322, TOL, Ti, etc.; cósmidos; fagos tales como lambda, lambdoid, M13, Mu, P1, P22, Q β , T-even, T-odd, T2, T4, T7, etc.; virus vegetales. Los vectores pueden usarse para la clonación y/o para la expresión de las moléculas de unión de la invención y podrían incluso usarse para fines de terapia génica. Los vectores que comprenden una o más moléculas de ácido nucleico según la invención operativamente unidos a una o más moléculas de ácido nucleico que regulan la expresión también están cubiertos por la presente invención. La elección del vector depende de los procedimientos recombinantes seguido y el huésped usado. La introducción de vectores en células huésped puede efectuarse mediante entre otros transfección con fosfato de calcio, infección viral, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección por lipofectamina o electroporación. Los vectores pueden ser de replicación autónoma o pueden replicarse junto con el cromosoma en el que se han integrado. Preferiblemente, los vectores contienen uno o más marcadores de selección. La elección de los marcadores puede depender de las células huésped de elección, aunque esto no es crítico para la invención ya que los conocen bien los expertos en la técnica. Incluyen, pero no se limitan a, kanamicina, neomicina, puromicina, higromicina, zeocina, gen de timidina cinasa del virus del herpes simple (VHS-TK), gen de dihidrofolato reductasa de ratón (dhfr). Los vectores que comprenden una o más moléculas de ácido nucleico que codifican las moléculas de unión humanas tal como se describieron anteriormente operativamente unidas a una más moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas o péptidos que pueden usarse para aislar las moléculas de unión humanas también están cubiertas por la invención. Estas proteínas o péptidos incluyen, pero no se limitan a, glutatión-S-transferasa, proteína de unión a maltosa, polihistidina de unión a metales, proteína fluorescente verde, luciferasa y beta-galactosidasa.

Los huéspedes que contienen una o más copias de los vectores mencionados anteriormente son un sujeto adicional de la presente invención. Preferiblemente, los huéspedes son células huésped. Las células huésped incluyen, pero no se limitan a, células de origen de mamífero, vegetal, de insecto, fúngico o bacteriano. Las células bacterianas incluyen, pero no se limitan a, células de bacterias Gram-positivas tales como varias especies de los géneros *Bacillus*, *Streptomyces* y *Staphylococcus* o células de bacterias Gram-negativas tales como varias especies los géneros *Escherichia*, tal como *E. coli*, y *Pseudomonas*. En el grupo de células fúngicas, preferiblemente se usan células de levadura. Puede lograrse la expresión en levaduras usando cepas de levadura tales como entre otras *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Hansenula polymorpha*. Además, pueden usarse células de insecto tales como células de *Drosophila* y Sf9 como células huésped. Además de eso, las células huésped pueden ser células vegetales tales como entre otras células de plantas cultivadas tales como plantas forestales, o células de plantas que proporcionan alimentos y materias primas tales como plantas de cereales, o plantas medicinales, o

células de plantas ornamentales, o células de cultivos de bulbos de flores. Se producen células vegetales o plantas transformadas (transgénicas) mediante métodos conocidos, por ejemplo, transferencia génica mediada por *Agrobacterium*, transformación de discos de hojas, transformación de protoplastos mediante transferencia de ADN inducida por polietilenglicol, electroporación, sonicación, microinyección o transferencia génica balística. Adicionalmente, un sistema de expresión adecuado puede ser un sistema de baculovirus. Se prefieren sistemas de expresión que usan células de mamífero tales como células de ovario de hámster chino (CHO), células COS, células BHK o células de melanoma de Bowes en la presente invención. Las células de mamífero proporcionan proteínas expresadas con modificaciones postraduccionales que son lo más similares a moléculas naturales de origen de mamífero. Puesto que la presente invención se ocupa de moléculas que van a administrarse a seres humanos, un sistema de expresión completamente humano sería particularmente preferido. Por tanto, incluso más preferiblemente, las células huésped son células humanas. Ejemplos de células humanas son entre otras células HeLa, 911, AT1080, A549, 293 y HEK293T. En realizaciones preferidas, las células productoras humanas comprenden al menos una parte funcional de una secuencia de ácido nucleico que codifica una región E1 de adenovirus en formato que puede expresarse. Incluso en realizaciones más preferidas, dichas células huésped se derivan de una retina humana y están inmortalizadas con ácidos nucleicos que comprenden secuencias E1 adenovirales, tales como células 911 o la línea celular depositada en la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC), CAMR, Salisbury, Wiltshire SP4 OJG, Gran Bretaña el 29 de febrero de 1996 con el número 96022940 y comercializada con la marca comercial PER.C6® (PER.C6 es una marca registrada de Crucell Holland B.V.). Para los fines de esta solicitud, "PER.C6" se refiere a células depositadas con el número 96022940 o ancestros, pasajes hacia delante o hacia atrás así como descendientes de ancestros de células depositadas, sí como derivados de cualquiera de los anteriores. La producción de proteínas recombinantes en células huésped puede realizarse según métodos bien conocidos en la técnica. El uso de las células comercializadas con la marca comercial PER.C6® como una plataforma de producción para proteínas de interés se ha descrito en el documento WO 00/63403.

Un método de producción de una molécula de unión o un inmunoconjugado según la invención es una parte adicional de la invención. El método comprende las etapas de a) cultivar un huésped según la invención en condiciones que conducen a la expresión de la molécula de unión o inmunoconjugado, y b) opcionalmente, recuperar la molécula de unión o inmunoconjugado expresado. Las moléculas de unión o inmunoconjugados expresados pueden recuperarse del extracto celular libre, pero preferiblemente se recuperan del medio de cultivo. El método anterior de producción puede usarse también para preparar variantes funcionales de las moléculas de unión e inmunoconjugados de la presente invención. El experto en la técnica conoce bien métodos para recuperar proteínas, tales como moléculas de unión, a partir de extractos celulares libres o medio de cultivo. Las moléculas de unión o inmunoconjugados tal como pueden obtenerse mediante el método descrito anteriormente son también una parte de la presente invención.

Alternativamente, además de la expresión en huéspedes, tales como células huésped, las moléculas de unión e inmunoconjugados de la invención pueden producirse de manera sintética mediante sintetizadores peptídicos convencionales o en sistemas de traducción libres de células usando ácido nucleico de ARN derivado de moléculas de ADN según la invención. Las moléculas de unión e inmunoconjugados tal como pueden obtenerse mediante los métodos de producción sintéticos o sistemas de traducción libres de células descritos anteriormente son también una parte de la presente invención.

Aún en otra realización, pueden producirse también moléculas de unión de la presente invención en mamíferos transgénicos, no humanos tales como entre otros conejos, cabras o vacas, y secretarse por ejemplo en la leche de los mismos.

Aún en otra realización alternativa, pueden generarse moléculas de unión según la presente invención, preferiblemente moléculas de unión humanas que se unen específicamente a la proteína intracelular de la célula huésped o fragmento de la misma, mediante mamíferos no humanos transgénicos, tales como por ejemplo ratones o conejos transgénicos, que expresan genes de inmunoglobulina humana. Preferiblemente, los mamíferos no humanos transgénicos tienen un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera humana que codifican todas o una parte de las moléculas de unión humanas tal como se describió anteriormente. Los mamíferos no humanos transgénicos pueden inmunizarse con una preparación purificada o enriquecida de la proteína intracelular de la célula huésped o fragmento de la misma. Los protocolos para inmunizar mamíferos no humanos están bien establecidos en la técnica. Véase *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, editado por: E. Harlow, D. Lane (1998), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York y *Current Protocols in Immunology*, editado por: J.E. Coligan, A.M. Kruisbeek, D.H. Margulies, E.M. Shevach, W. Strober (2001), John Wiley & Sons Inc., Nueva York. Los protocolos de inmunización incluyen a menudo inmunizaciones múltiples, o bien con o bien sin adyuvantes tales como adyuvante completo de Freund y adyuvante incompleto de Freund, pero también pueden incluir inmunizaciones con ADN desnudo. En otra realización, las moléculas de unión humanas se producen mediante células B o células plasmáticas derivadas de los animales transgénicos. Aún en otra realización, las moléculas de unión humanas se producen mediante hibridomas, que se preparan mediante fusión de células B obtenidas a partir de los mamíferos no humanos transgénicos descritos anteriormente con células inmortalizadas. Células B, células plasmáticas e hibridomas tal como pueden obtenerse a partir de los mamíferos no humanos transgénicos descritos anteriormente y moléculas de unión humanas tal como pueden obtenerse a partir de los mamíferos no humanos transgénicos descritos anteriormente, células B, células plasmáticas e hibridomas son también una parte de la presente invención.

Las proteínas intracelulares de la célula huésped FAF-1 y/o NDUFV-1 también pueden producirse y purificarse según los métodos y con los vectores y células huésped tal como se describió anteriormente. Alternativamente, también pueden producirse y/o purificarse a partir de una célula huésped “nativa”, por ejemplo una célula huésped que expresa normalmente la proteína intracelular de la célula huésped. La expresión en una célula huésped “nativa” puede aumentarse sustituyendo el promotor natural de proteínas y/o añadiendo, sustituyendo y/o mutando elementos de potenciación de la expresión de proteínas. El experto en la técnica conoce los elementos y métodos para aumentar la expresión.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método de identificación de moléculas de unión según la invención tal como moléculas de unión humanas, por ejemplo anticuerpos monoclonales o fragmentos de los mismos, que se unen específicamente a una proteína de la célula huésped o moléculas de ácido nucleico que codifican tales moléculas de unión y comprende las etapas de a) poner en contacto una colección de moléculas de unión en la superficie de paquetes genéticos replicables con un virus, partícula similar a virus o fragmento del mismo en condiciones que conducen a la unión, b) seleccionar al menos una vez para detectar un paquete genético replicable que se une al virus, partícula similar a virus o fragmento del mismo, y c) separar y recuperar el paquete genético replicable que se une al virus, partícula similar a virus o fragmento del mismo a partir de paquetes genéticos replicables que no se unen. La proteína de la célula huésped puede ser una proteína intracelular de la célula huésped.

Un paquete genético replicable tal como se usa en el presente documento puede ser procariota o eucariota e incluye células, esporas, levaduras, bacterias, virus, (bacterio)fagos, ribosomas y polisomas. Un paquete genético replicable preferido es un fago. Las moléculas de unión, tales como Fv de cadena sencilla, se presentan en el paquete genético replicable, es decir, unidas a un grupo o molécula ubicada en una superficie exterior del paquete genético replicable. El paquete genético replicable es una unidad que puede examinarse que comprende una molécula de unión que va a examinarse unida a una molécula de ácido nucleico que codifica la molécula de unión. La molécula de ácido nucleico debe ser replicable o bien *in vivo* (por ejemplo, como un vector) o bien *in vitro* (por ejemplo, mediante PCR, transcripción y traducción). La replicación *in vivo* puede ser autónoma (como para una célula), con la ayuda de factores del huésped (como para un virus) o con la ayuda de tanto el huésped como un virus auxiliar (como para un fagémido). Se forman paquetes genéticos replicables que presentan una colección de moléculas de unión introduciendo moléculas de ácido nucleico que codifican moléculas de unión exógenas que van a presentarse en los genomas de los paquetes genéticos replicables para formar proteínas de fusión con proteínas endógenas que normalmente se expresan a partir de la superficie externa de los paquetes genéticos replicables. La expresión de las proteínas de fusión, el transporte a la superficie externa y el ensamblaje dan como resultado que se presenten moléculas de unión exógenas a partir de la superficie externa de los paquetes genéticos replicables.

En una realización, la etapa de selección en el método según la presente invención se realiza en presencia de virus que está inactivado. La inactivación del virus puede realizarse mediante métodos de inactivación viral bien conocidos por el experto en la técnica. El experto en la técnica conoce bien métodos para someter a prueba si un virus es todavía infeccioso o está parcial o completamente inactivado. Los virus usados en el método anterior pueden estar no aislados, por ejemplo, presentes en el suero y/o sangre de un individuo infectado. El virus usado también puede aislarse o bien antes o bien tras la inactivación. La purificación puede realizarse por medio de métodos de purificación bien conocidos adecuados para virus tales como por ejemplo centrifugación a través de un colchón de glicerol. El virus contiene la proteína (intracelular) de la célula huésped incorporada en su membrana viral.

Alternativamente, la etapa de selección puede realizarse en presencia de un fragmento del virus tal como un fragmento que comprende la membrana viral o partículas similares a virus que tienen la proteína (intracelular) de la célula huésped incorporada en sus membranas. El virus inactivado, partícula similar a virus o fragmento del mismo puede inmovilizarse en un material adecuado antes de su uso. En una realización específica, la selección puede realizarse en diferentes materiales que comprenden las proteínas (intracelulares) de la célula huésped. Por ejemplo, la primera ronda de selección puede realizarse sobre virus (inactivado), mientras que la segunda ronda puede realizarse sobre partículas similares a VNO. Alternativamente, la primera ronda de selección puede realizarse sobre células huésped que presentan la proteína (intracelular) de la célula huésped en su superficie, mientras que la segunda ronda de selección puede realizarse sobre virus (inactivado). Por supuesto, otras combinaciones son también adecuadas. Por ejemplo, la primera y segunda ronda de selección pueden realizarse sobre material idéntico tal como partículas similares a VNO. También pueden usarse diferentes materiales que comprenden la proteína (intracelular) de la célula huésped durante una etapa de selección/cribado.

Aún en un aspecto adicional, la invención proporciona un método de obtención de una molécula de unión que se une específicamente a una proteína de la célula huésped o una molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de unión de este tipo que se une específicamente a una proteína de la célula huésped, comprendiendo el método las etapas de a) realizar el método descrito anteriormente de identificación de moléculas de unión, y b) aislar del paquete genético replicable recuperado la molécula de unión y/o la molécula de ácido nucleico que codifica la molécula de unión. La colección de moléculas de unión en la superficie de paquetes genéticos replicables puede ser una colección de scFv o Fab. Una vez que se ha establecido o identificado un nuevo scFv o Fab con el método mencionado anteriormente de identificación de moléculas de unión o moléculas de ácido nucleico que codifican las moléculas de unión, el ADN que codifica los scFv o Fab puede aislarse de las bacterias o fagos y combinarse con técnicas de biología molecular convencionales para preparar constructos que codifican scFv bivalentes o

inmunoglobulinas humanas completas de una especificidad deseada (por ejemplo IgG, IgA o IgM). Estos constructos pueden transfectarse en líneas celulares adecuadas y pueden producirse anticuerpos monoclonales humanos completos (véase Huls *et al.*, 1999; Boel *et al.*, 2000).

5 Tal como se mencionó anteriormente, el paquete genético replicable preferido es un fago. Los métodos de presentación en fagos para identificar y obtener moléculas de unión (humanas), por ejemplo anticuerpos monoclonales, son en la actualidad métodos bien establecidos conocidos por el experto en la técnica. Se describen por ejemplo en la patente estadounidense 5.696.108; Burton y Barbas, 1994; de Kruif *et al.*, 1995b; y Phage Display: A Laboratory Manual. Editado por: CF Barbas, DR Burton, JK Scott y GJ Silverman (2001), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York. Para la construcción de bibliotecas de presentación en fago, se expresan colecciones de genes de regiones variables de cadena pesada y ligera de anticuerpos monoclonales humanos en la superficie de bacteriófagos, preferiblemente bacteriófagos filamentosos, partículas, por ejemplo Fv de cadena sencilla (scFv) o en formato Fab (véase de Kruif *et al.*, 1995b). Bibliotecas grandes de fagos que expresan fragmentos de anticuerpo contienen normalmente más de $1,0 \cdot 10^9$ especificidades de anticuerpo y pueden ensamblarse a partir de las regiones V de inmunoglobulina expresadas en los linfocitos B de individuos inmunizados o no inmunizados. En una realización específica de la invención, la biblioteca de fagos de moléculas de unión, preferiblemente la biblioteca de fagos de scFv, se prepara a partir de ARN aislado a partir de células obtenidas de un sujeto que se ha vacunado o expuesto a un virus. Puede aislarse ARN de entre otros médula ósea o sangre periférica, preferiblemente linfocitos de sangre periférica. El sujeto puede ser un animal vacunado o expuesto a un virus, pero es preferiblemente un sujeto humano que se ha vacunado o se ha expuesto a un virus. Preferiblemente, el sujeto humano se ha recuperado de la infección viral. En una realización de la invención, el virus es un flavivirus tal como VNO.

Alternativamente, pueden construirse bibliotecas de presentación en fagos a partir de regiones variables de inmunoglobulina que se han ensamblado parcialmente *in vitro* para introducir diversidad de anticuerpos adicional en la biblioteca (bibliotecas semisintéticas). Por ejemplo, regiones variables ensambladas *in vitro* contienen tramos de ADN aleatorizado o parcialmente aleatorizado, producido de manera sintética en aquellas regiones de las moléculas que son importantes para la especificidad de anticuerpos, por ejemplo, las regiones CDR. Pueden seleccionarse anticuerpos en fagos específicos de la proteína de la célula huésped a partir de la biblioteca por ejemplo inmovilizando antígenos diana tales como virus, partículas similares a virus, células huésped o proteínas de la célula huésped, por ejemplo, proteínas intracelulares de la célula huésped, en una fase sólida y exponiendo posteriormente los antígenos diana a una biblioteca de fagos para permitir la unión de fagos que expresan fragmentos de anticuerpo específicos para el/los antígeno(s) unido(s) a la fase sólida. Los fagos no unidos se eliminan mediante lavado y los fagos unidos se eluyen de la fase sólida para la infección de bacterias de *E. coli* y posterior propagación. Habitualmente se requieren múltiples rondas de selección y propagación para enriquecer suficientemente los fagos que se unen específicamente al/a los antígeno(s) diana. Si se desea, antes de exponer la biblioteca de fagos a antígenos diana, la biblioteca de fagos puede sustraerse en primer lugar exponiendo la biblioteca de fagos a antígenos no diana unidos a una fase sólida. Los fagos también pueden seleccionarse para determinar su unión a antígenos complejos tales como mezclas complejas de proteínas o (poli)péptidos de la célula huésped, células huésped (de expresión) que expresan una o más proteínas o (poli)péptidos de la célula huésped, partículas similares a virus que comprenden proteínas de la célula huésped, o virus inactivados completos. Pueden seleccionarse anticuerpos en fagos específicos de antígeno a partir de la biblioteca incubando una fase sólida con partículas similares a virus unidas sobre la misma con la biblioteca de anticuerpos en fagos para permitir por ejemplo que la parte de scFv o Fab del virus se una a la partícula similar a virus. Por supuesto, en una realización alternativa, pueden realizarse también selecciones y sustracciones en disolución. Tras la incubación y varios lavados para eliminar fagos no unidos y débilmente unidos, los fagos que se han unido con su parte de scFv o Fab a la partícula similar a virus se eluyen y se usan para infectar *E. coli* para permitir la amplificación de la nueva especificidad. Generalmente, se requieren una o más rondas de selección para separar los fagos de interés del gran exceso de fagos que no se unen. Alternativamente, las proteínas de la célula huésped pueden expresarse en células huésped de expresión, por ejemplo células PER.C6®, y estas células pueden usarse para la selección de anticuerpos en fagos específicos para las proteínas o (poli)péptidos. Un método de presentación en fagos usando células huésped (de expresión) puede extenderse y mejorarse sustrayendo uniones no relevantes durante el examen mediante la adición de un exceso de células huésped que comprende moléculas no diana o moléculas no diana que son similares, pero no idénticas, a la diana, y de ese modo se potencia enormemente la posibilidad de encontrar moléculas de unión relevantes. Por supuesto, la sustracción puede realizarse también antes o después del examen con material que comprende la proteína de la célula huésped o fragmento de la misma. En una realización, la selección puede tener lugar en células huésped que se han infectado con un virus o una partícula similar a virus. Estas células presentan la proteína de la célula huésped ubicada normalmente de manera intracelular tras la infección en su superficie. La sustracción puede realizarse antes, durante o después de la selección y puede realizarse con células huésped que no se han infectado y por tanto comprenden la proteína intracelular de la célula huésped en su ubicación celular original, es decir, dentro de la célula huésped. El proceso de sustracción se denomina proceso Mabstrac® (Mabstrac® es una marca comercial registrada de Crucell Holland B.V., véase también la patente estadounidense número 6.265.150).

Aún en otro aspecto, la invención proporciona un método de obtención de una molécula de unión que tiene potencialmente actividad neutralizante contra un virus y que puede unirse específicamente a una proteína de la

célula huésped, comprendiendo el método las etapas de a) realizar el método de obtención de una molécula de unión que se une específicamente a la proteína de la célula huésped o una molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de unión de este tipo que se une específicamente a la proteína de la célula huésped tal como se describió anteriormente, y b) verificar si la molécula de unión aislada tiene actividad neutralizante contra un virus. Preferiblemente, la proteína de la célula huésped es una proteína intracelular de la célula huésped. En una realización, los métodos descritos anteriormente se realizan con un flavivirus tal como VNO. En una realización preferida del método, se verifica si la molécula de unión aislada tiene actividad neutralizante contra virus de al menos dos géneros diferentes. Más preferiblemente, se verifica si las moléculas de unión son moléculas de unión ampliamente neutralizantes y pueden neutralizar muchos géneros diferentes. Se conocen bien en la técnica ensayos para verificar si una molécula de unión tiene actividad neutralizante para un virus específico.

En un aspecto adicional la invención se refiere a una molécula de unión específica de una proteína de la célula huésped que puede obtenerse mediante los métodos descritos anteriormente. Preferiblemente, la molécula de unión tiene actividad neutralizante contra al menos un virus.

Aún en un aspecto adicional, la invención proporciona composiciones que comprenden al menos una molécula de unión, al menos una variante funcional de la misma, al menos un inmunoconjugado según la invención o una combinación de los mismos. La invención se refiere también a composiciones que comprenden al menos dos moléculas de unión, preferiblemente moléculas de unión humanas, al menos una de las cuales puede ser una molécula de unión de la invención. Preferiblemente, ambas moléculas de unión tienen actividad neutralizante de virus. La actividad puede ser contra el mismo virus pero también contra virus diferentes. En una realización, las composiciones que comprenden dos o más moléculas de unión que tienen actividad neutralizante de virus presentan actividad neutralizante de virus sinérgica. En una realización, las moléculas de unión que actúan de manera sinérgica en la neutralización de un virus también pueden neutralizar otros virus de manera sinérgica. Tal como se usa en el presente documento, el término "sinérgico/a" significa que el efecto combinado de las moléculas de unión cuando se usan en combinación es mayor que sus efectos aditivos cuando se usan individualmente. Un modo de calcular la sinergia es por medio del índice de combinación. El concepto de índice de combinación (IC) se ha descrito por Chou y Talalay, 1984. En una realización alternativa, las composiciones comprenden dos o más moléculas de unión que tienen diferentes modos de acción. En una realización, las moléculas de unión de la invención tienen actividad neutralizante de flavivirus, por ejemplo VNO. Además de eso, las composiciones pueden comprender entre otras moléculas de estabilización, tales como albúmina o polietilenglicol, o sales. Preferiblemente, las sales usadas son sales que retienen la actividad biológica deseada de las moléculas de unión y no confieren ningún efecto toxicológico no deseado. Si es necesario, las moléculas de unión humanas de la invención pueden recubrirse en o sobre un material para protegerlas de la acción de ácidos u otras condiciones naturales o no naturales que pueden inactivar las moléculas de unión.

Aún en un aspecto adicional, la invención proporciona composiciones que comprenden al menos una molécula de ácido nucleico tal como se define en la presente invención. Las composiciones pueden comprender disoluciones acuosas tales como disoluciones acuosas que contienen sales (por ejemplo, NaCl o sales tal como se describió anteriormente), detergentes (por ejemplo, SDS) y/u otros componentes adecuados.

Además, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden al menos una molécula de unión (o fragmento funcional o variante de la misma), al menos un inmunoconjugado según la invención, al menos una composición según la invención, o combinaciones de los mismos. La composición farmacéutica de la invención comprende además al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. Una composición farmacéutica según la invención puede comprender además otro agente terapéutico, profiláctico y/o de diagnóstico. Preferiblemente, la composición farmacéutica comprende al menos otro agente profiláctico y/o terapéutico. Preferiblemente, dichos agentes terapéuticos y/o profilácticos adicionales son agentes capaces de prevenir y/o tratar una infección y/o un estado que resulta de un virus, por ejemplo un flavivirus tal como VNO. Los agentes terapéuticos y/o profilácticos incluyen, pero no se limitan a, agentes antivirales. Tales agentes pueden ser moléculas de unión, moléculas pequeñas, compuestos orgánicos o inorgánicos, enzimas, secuencias de polinucleótido, etc. Agentes capaces de prevenir y/o tratar una infección viral y/o un estado que resulta de un virus que están en la fase experimental también podrían usarse como otros agentes terapéuticos y/o profilácticos útiles en la presente invención.

Las moléculas de unión o composiciones farmacéuticas de la invención pueden someterse a prueba en sistemas modelo animales adecuados antes de su uso en seres humanos. Tales sistemas modelo animales incluyen, pero no se limitan a, un modelo murino, un modelo de hámster y un sistema modelo de gansos.

Normalmente, las composiciones farmacéuticas deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. Las moléculas de unión, inmunoconjugados, moléculas de ácido nucleico o composiciones de la presente invención pueden estar en forma de polvo para su reconstitución en el excipiente farmacéuticamente apropiado antes o en el momento de su administración. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son secado a vacío y secado por congelación (liofilización) que producen un polvo del principio activo más cualquier componente deseado adicional a partir de una disolución previamente esterilizada por filtración de los mismos.

Alternativamente, las moléculas de unión, inmunoconjugados, moléculas de ácido nucleico o composiciones de la presente invención pueden estar en disolución y el excipiente farmacéuticamente aceptable apropiado puede añadirse y/o mezclarse antes o en el momento de la administración para proporcionar una forma inyectable de dosificación unitaria. Preferiblemente, el excipiente farmacéuticamente aceptable usado en la presente invención es adecuado para una alta concentración de fármaco, puede mantener una fluidez apropiada y, si es necesario, puede retrasar la absorción.

La elección de la vía de administración óptima de las composiciones farmacéuticas se verá influida por varios factores incluyendo las propiedades fisicoquímicas de las moléculas activas dentro de las composiciones, la urgencia de la situación clínica y la relación de las concentraciones plasmáticas de las moléculas activas con el efecto terapéutico deseado. Por ejemplo, si es necesario, las moléculas de unión de la invención pueden prepararse con portadores que las protegerán frente a una liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de administración microencapsulados. Pueden usarse entre otros polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como acetato de etilenvinilo, polianhídridos, poli(ácido glicólico), colágeno, poliortoésteres y poli(ácido láctico). Además, puede ser necesario recubrir las moléculas de unión con, o administrar conjuntamente las moléculas de unión con, un material o compuesto que impide la inactivación de las moléculas de unión humanas. Por ejemplo, las moléculas de unión pueden administrarse a un sujeto en un portador apropiado, por ejemplo, liposomas o un diluyente.

Las vías de administración pueden dividirse en dos categorías principales, administración oral y parenteral. La vía de administración preferida es intravenosa.

Pueden formularse formas farmacéuticas orales entre otros como comprimidos, trociscos, pastillas para chupar, suspensiones acuosas u oleosas, gránulos o polvos dispersables, emulsiones, cápsulas duras, cápsulas de gelatina blandas, jarabes o elixires, píldoras, comprimidos recubiertos de azúcar, líquidos, geles o suspensiones. Estas formulaciones pueden contener excipientes farmacéuticamente incluyendo, pero sin limitarse a, diluyentes inertes, agentes de granulación y disgregación, agentes de unión, agentes lubricantes, conservantes, colorantes, agentes aromatizantes o edulcorantes, aceites vegetales o minerales, agentes humectantes y agentes espesantes.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden formularse para administración parenteral. Las formulaciones para administración parenteral pueden estar entre otras en forma de disoluciones o suspensiones para inyección o infusión no tóxicas estériles isotónicas no acuosas. Las disoluciones o suspensiones pueden comprender agentes que no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas tales como 1,3-butanodiol, disolución de Ringer, disolución de Hank, disolución de cloruro de sodio isotónica, aceites, ácidos grasos, agentes anestésicos locales, conservantes, tampones, agentes de aumento de la viscosidad o solubilidad, antioxidantes solubles en agua, antioxidantes solubles en aceite y agentes quelantes de metales.

En un aspecto adicional, las moléculas de unión (fragmentos funcionales y variantes de las mismas), inmunoconjugados, composiciones, o composiciones farmacéuticas de la invención pueden usarse como medicamento. Así, un método de tratamiento y/o prevención de una infección viral usando las moléculas de unión, inmunoconjugados, composiciones, o composiciones farmacéuticas de la invención es otra parte de la presente invención. Las moléculas mencionadas anteriormente pueden usarse entre otros en el diagnóstico, la profilaxis, el tratamiento o combinación de los mismos, de uno o más estados que resultan de un virus o infección viral. Preferiblemente, pueden aplicarse ampliamente para prevenir, detectar y/o tratar varias infecciones virales provocadas por virus de diferentes géneros y/o cepas, incluyendo, pero sin limitarse a, Herpesviridae (por ejemplo virus del herpes simple tipo 1, 2, 6, 7, 8, citomegalovirus, virus de la varicela zoster, virus de Epstein-Barr), Poxviridae (por ejemplo virus de la viruela), Retroviridae (por ejemplo VIH1, VIH2, HTLV1, HTLV2), Paramyxoviridae (por ejemplo virus de las paperas, virus del sarampión, virus respiratorio sincitial, virus parainfluenza), HepaDNAviridae (por ejemplo virus de la hepatitis B), Orthomyxoviridae (por ejemplo virus influenza A o B), Togaviridae (por ejemplo rubeola), Flaviviridae (por ejemplo virus de la fiebre amarilla, virus del Dengue, virus del Nilo occidental, virus de la hepatitis C, virus de la encefalitis japonesa, virus de la encefalitis de Venezuela), Rhabdoviridae (por ejemplo virus de la rabia), Arenaviridae (por ejemplo virus de Lassa, virus de la coriomeningitis linfocítica) y Coronaviridae (por ejemplo virus SARS, virus de la metaneumonía). Además, pueden aplicarse también para prevenir, detectar y/o tratar varias infecciones virales provocadas por virus no mencionados anteriormente, incluyendo, pero sin limitarse a, virus Sindbis, poliovirus, virus del papiloma humano, virus adenoasociado, virus de coxsackie, enterovirus, virus de la hepatitis A, virus de la encefalitis transmitido por garrapatas, astrovirus, virus del Ébola, virus de Marburg, virus de La Crosse, virus de la encefalitis de California, virus Hantaan, virus de Crimea-Congo, fiebre del valle del Rift, virus de la fiebre hemorrágica argentina, virus de la fiebre hemorrágica boliviana, fiebre por garrapatas de Colorado, virus JC, virus BK, adenovirus humano y parvovirus humano. En otras palabras, las moléculas de unión de la invención son moléculas de unión antivirales de amplio espectro. Son adecuadas para el tratamiento de pacientes aún no tratados que padecen un estado que resulta de un virus y pacientes que se han tratado o están tratándose de un estado que resulta de un virus o una infección viral. Protegen frente a la infección adicional mediante un virus durante aproximadamente 1 mes y/o retardarán la aparición o evolución de los síntomas asociados con un virus. Pueden usarse también en profilaxis post-exposición, cuando existe una posibilidad de infección pero están ausentes síntomas. También pueden usarse como profilaxis en el trasplante de órganos infectados o en otras poblaciones de pacientes en alto riesgo de exposición y evolución hasta la enfermedad debido

entre otros a la edad o el estado inmunitario. En una realización específica, los compuestos y composiciones se usan para tratar y/o prevenir una infección por flavivirus, por ejemplo VNO y/o una infección por el virus de la rabia.

5 Las moléculas o composiciones mencionadas anteriormente pueden emplearse conjuntamente con otras moléculas útiles en el diagnóstico, la profilaxis y/o el tratamiento. Pueden usarse *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. Por ejemplo, las moléculas de unión, inmunoconjugados o composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse conjuntamente con una vacuna contra las proteínas intracelulares de la célula huésped. Alternativamente, la vacuna puede administrarse también antes o después de la administración de las moléculas de la invención. En lugar de una vacuna, pueden emplearse también otros agentes antivirales conjuntamente con las moléculas de unión de la presente invención. En un aspecto, la invención se refiere también al uso de una proteína intracelular de la célula huésped, preferiblemente FAF-1 y/o NDUFV-1, como una vacuna adecuada para prevenir y/o tratar una infección viral, por ejemplo una infección por flavivirus tal como infección por VNO.

10 Las moléculas se formulan normalmente en las composiciones y composiciones farmacéuticas de la invención en una cantidad terapéutica o diagnósticamente eficaz. Alternativamente, pueden formularse y administrarse por separado. Por ejemplo, las otras moléculas tales como los compuestos antivirales pueden aplicarse de manera sistémica, mientras que las moléculas de unión de la invención pueden aplicarse por vía intratecal, por vía intraventricular o por vía intradérmica.

15 Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Un intervalo de dosificación adecuado puede ser por ejemplo de 0,1-100 mg/kg de peso corporal, preferiblemente 0,5-15 mg/kg de peso corporal. Además, por ejemplo, puede administrarse un único bolo, pueden administrarse varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente según indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Las moléculas y composiciones según la presente invención son preferiblemente estériles. Se conocen bien en la técnica métodos para hacer que estas moléculas y composiciones sean estériles. Las otras moléculas útiles en el diagnóstico, la profilaxis y/o el tratamiento pueden administrarse en un régimen de dosificación similar tal como se propone para las moléculas de unión de la invención. Si las otras moléculas se administran por separado, pueden administrarse a un paciente antes (por ejemplo, 2 minutos, 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 60 minutos, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 10 horas, 12 horas, 14 horas, 16 horas, 18 horas, 20 horas, 22 horas, 24 horas, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 7 días, 2 semanas, 4 semanas o 6 semanas antes), de manera concomitante con, o posteriormente a (por ejemplo, 2 minutos, 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 60 minutos, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 10 horas, 12 horas, 14 horas, 16 horas, 18 horas, 20 horas, 22 horas, 24 horas, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 7 días, 2 semanas, 4 semanas o 6 semanas después) de la administración de una o más de las moléculas de unión humanas o composiciones farmacéuticas de la invención. El régimen de dosificación exacto se fija durante ensayos clínicos en pacientes humanos.

20 Moléculas de unión humanas y composiciones farmacéuticas que comprenden las moléculas de unión humanas son particularmente útiles, y a menudo se prefieren, cuando van a administrarse a seres humanos como agentes terapéuticos *in vivo*, puesto que la respuesta inmunitaria del receptor frente al anticuerpo administrado será a menudo sustancialmente inferior a la ocasionada por la administración de una molécula de unión humanizada, quimérica o murina monoclonal.

25 En otro aspecto, la invención se refiere al uso de las moléculas de unión (humanas) (fragmentos funcionales y variantes de las mismas), inmunoconjugados, moléculas de ácido nucleico, composiciones o composiciones farmacéuticas según la invención en la preparación de un medicamento para el diagnóstico, la profilaxis, el tratamiento o una combinación de los mismos, de una infección viral y/o un estado que resulta de la misma.

30 Además de eso, kits que comprenden al menos una molécula de unión (fragmentos funcionales y variantes de la misma), al menos un inmunoconjugado, al menos una molécula de ácido nucleico, al menos una composición, al menos una composición farmacéutica, al menos un vector, al menos un huésped según la invención o una combinación de los mismos son también una parte de la presente invención. Opcionalmente, los componentes descritos anteriormente de los kits de la invención se envasan en recipientes adecuados y se etiquetan para el diagnóstico, la profilaxis y/o el tratamiento de los estados indicados. Los componentes mencionados anteriormente pueden almacenarse en recipientes unitarios o de múltiples dosis como una disolución acuosa, preferiblemente estéril o como una formulación liofilizada, preferiblemente estéril para su reconstitución. Los recipientes pueden estar formados de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico y pueden tener un orificio de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de disolución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica). El kit puede comprender además más recipientes que comprenden un tampón farmacéuticamente aceptable. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringuillas, medio de cultivo para uno o más de los huéspedes adecuados y, posiblemente, incluso al menos otro agente terapéutico, profiláctico o de diagnóstico. Asociadas con los kits puede haber instrucciones incluidas habitualmente en envases comerciales de productos terapéuticos, profilácticos o de diagnóstico, que contienen información sobre por ejemplo las indicaciones, el uso, la dosificación, la fabricación, la administración, las contraindicaciones y/o las advertencias referentes al uso de tales productos terapéuticos, profilácticos o de diagnóstico.

La invención se refiere además a un método de detección de una proteína intracelular de la célula huésped tal como FAF-1 y/o NDUFV-1 en una muestra, comprendiendo el método las etapas de a) poner en contacto una muestra con una cantidad diagnósticamente eficaz de una molécula de unión (fragmentos funcionales y variantes de la misma) o un inmunoc conjugado según la invención, y b) determinar si la molécula de unión o inmunoc conjugado se une específicamente a una molécula de la muestra. La muestra puede ser una muestra biológica incluyendo, pero sin limitarse a sangre, suero, orina, tejido u otro material biológico de sujetos (posiblemente) infectados, o una muestra biológica tal como agua, bebidas, etc. Los sujetos (posiblemente) infectados pueden ser sujetos humanos, pero también animales que se sospecha que son portadores de un virus podrían someterse a prueba para detectar la presencia de virus usando las moléculas de unión humanas o inmunoc conjugados de la invención. Detectando las proteínas intracelulares de la célula huésped, puede detectarse una infección viral (célula huésped infectada y/o partícula de virus). En primer lugar, la muestra puede manipularse para hacerla más adecuada para el método de detección. Manipulación significa entre otros tratar la muestra que se sospecha que contiene y/o que contiene un virus de tal modo que el virus se disgregue en componentes antigénicos tales como proteínas, (poli) péptidos u otros fragmentos antigénicos. Preferiblemente, las moléculas de unión humanas o inmunoc conjugados de la invención se ponen en contacto con la muestra en condiciones que permiten la formación de un complejo inmunológico entre las moléculas de unión humanas y la proteína intracelular de la célula huésped o componentes antigénicos de la misma que pueden estar presentes en la muestra. La formación de un complejo inmunológico, si hay alguno, indicando la presencia de un virus en la muestra, se detecta y se mide entonces mediante medios adecuados. Tales métodos incluyen, entre otros, inmunoensayos de unión homogénea y heterogénea, tales como radioinmunoanálisis (RIA), ELISA, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica, FACS, BIACORE, y análisis de inmunotransferencia de tipo Western.

Técnicas de ensayo preferidas, especialmente para examen clínico a gran escala de suero y sangre de pacientes y productos derivados de la sangre son ELISA y técnicas de inmunotransferencia de tipo Western. Se prefieren particularmente las pruebas de ELISA. Para su uso como reactivos en estos ensayos, las moléculas de unión o inmunoc conjugados de la invención se unen convenientemente a la superficie interior de pocillos de microtitulación. Las moléculas de unión o inmunoc conjugados de la invención pueden unirse directamente al pocillo de la placa. Sin embargo, una unión máxima de las moléculas de unión o inmunoc conjugados de la invención a los pocillos podría lograrse tratando los pocillos con polilisina antes de la adición de las moléculas de unión o inmunoc conjugados de la invención. Además, las moléculas de unión o inmunoc conjugados de la invención pueden unirse covalentemente mediante medios conocidos a los pocillos. Generalmente, las moléculas de unión o inmunoc conjugados se usan entre 0,01 y 100 $\mu\text{g/ml}$ para el recubrimiento, aunque también pueden usarse cantidades superiores así como inferiores. Se añaden entonces las muestras a los pocillos recubiertos con las moléculas de unión o inmunoc conjugados de la invención.

Además, las moléculas de unión de la invención pueden usarse para identificar epítopos de las proteínas intracelulares de la célula huésped tales como FAF-1 y/o NDUFV-1. Los epítopos pueden ser lineales, pero también estructurales y/o conformacionales. En una realización, la unión de moléculas de unión de la invención a una serie de péptidos solapantes, tales como péptidos de 15 meros, de la proteína de la célula huésped puede analizarse por medio de análisis PEPSCAN (véase entre otros los documentos WO 84/03564, WO 93/09872, Slootstra *et al.*, 1996). La unión de las moléculas a cada péptido puede someterse a prueba en un inmunoensayo ligado a enzimas basado en PEPSCAN (ELISA). En otra realización, puede examinarse una biblioteca de péptidos al azar que comprende péptidos de las proteínas de la célula huésped para detectar péptidos capaces de unirse a las moléculas de unión de la invención. En los ensayos anteriores, el uso de moléculas de unión neutralizantes puede identificar uno o más epítopos neutralizantes. Los péptidos/epítopos encontrados pueden usarse como vacunas y para el diagnóstico de una infección viral.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método de examen de una molécula de unión (o un fragmento funcional o variante de la misma) para detectar la unión específica al mismo epítipo de la proteína intracelular de la célula huésped, tal como FAF-1 y/o NDUFV-1, como el epítipo al que se une una molécula de unión de la invención, comprendiendo el método las etapas de a) poner en contacto una molécula de unión que va a examinarse, una molécula de unión de la invención y material que comprende la proteína intracelular de la célula huésped o fragmento antigénico de la misma, b) medir si la molécula de unión que va a examinarse puede competir por la unión específica a la proteína intracelular de la célula huésped que comprende material o fragmento antigénico de la misma con la molécula de unión de la invención. El material que comprende la proteína intracelular de la célula huésped o fragmento antigénico de la misma puede ser una célula huésped que presenta la proteína en su superficie, un virus que tiene la proteína incorporada en su membrana viral, una partícula similar a virus que tiene la proteína incorporada en la membrana viral o la propia proteína en forma purificada o no purificada. En una etapa adicional puede determinarse si las moléculas de unión examinadas son capaces de competir por la unión específica a la proteína intracelular de la célula huésped o fragmento antigénico de la misma tienen actividad neutralizante. Una molécula de unión que puede competir por la unión específica a la proteína intracelular de la célula huésped o un fragmento antigénico de la misma con la molécula de unión de la invención es otra parte de la presente invención. En el método de examen descrito anteriormente, "unión específica al mismo epítipo" también contempla la unión específica a sustancial o esencialmente el mismo epítipo que el epítipo al que se une una molécula de unión de la invención. La capacidad para bloquear, o competir con, la unión de las moléculas de unión de la invención a la proteína intracelular de la célula huésped normalmente indica que una molécula de unión que va a examinarse se

5 une a un epítipo o sitio de unión en la proteína intracelular de la célula huésped que estructuralmente se solapa con el sitio de unión en la proteína intracelular de la célula huésped que reconocen de manera inmunespecífica las moléculas de unión de la invención. Alternativamente, esto puede indicar que una molécula de unión que va a examinarse se une a un epítipo o sitio de unión que está suficientemente próximo al sitio de unión reconocido de manera inmunespecífica por las moléculas de unión de la invención para inhibir de manera estérica o de otra manera la unión de las moléculas de unión de la invención a la proteína intracelular de la célula huésped.

10 En general, se mide la unión competitiva por medio de un ensayo, en el que una composición de antígeno, es decir, una composición que comprende la proteína intracelular de la célula huésped o fragmentos antigénicos de la misma, se mezcla con moléculas de unión de referencia, es decir las moléculas de unión de la invención, y moléculas de unión que van a examinarse. Habitualmente, las moléculas de unión que van a examinarse se presentan en exceso. Protocolos basados en ELISA e inmunotransferencias de tipo Western son adecuados para su uso en tales estudios de competición sencillos. En ciertas realizaciones, pueden mezclarse previamente las moléculas de unión de referencia con cantidades variables de los moléculas de unión que van a examinarse (por ejemplo, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50, 1:60, 1:70, 1:80, 1:90 ó 1:100) durante un periodo de tiempo antes de su aplicación a la composición del antígeno. En otras realizaciones, las moléculas de unión de referencia y cantidades variables de moléculas de unión que van a examinarse pueden simplemente mezclarse durante la exposición a la composición del antígeno. Aún en otra realización, las moléculas de unión de referencia o las moléculas de unión que van a examinarse se ponen en contacto antes de que las moléculas de unión que van a examinarse o las moléculas de unión de referencia, respectivamente, se pongan en contacto con la proteína intracelular de la célula huésped o fragmento antigénico de la misma. En cualquier caso, usando anticuerpos secundarios de isotipo o especie se podrá detectar sólo las moléculas de unión de referencia unidas, cuya unión se reducirá por la presencia de una molécula de unión que va a examinarse que reconoce sustancialmente el mismo epítipo. Al realizar un estudio de competición de moléculas de unión entre una molécula de unión de referencia y cualquier molécula de unión que va a examinarse (independientemente de la especie y el isotipo), puede marcarse en primer lugar la molécula de unión de referencia con un marcador detectable, tal como, por ejemplo, biotina, un marcador enzimático, un marcador radiactivo u otro marcador para permitir la posterior identificación. En estos casos, se mezclarían previamente o se incubarán las moléculas de unión de referencia marcadas con las moléculas de unión que van a examinarse a diversas razones (por ejemplo, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50, 1:60, 1:70, 1:80, 1:90 ó 1:100) y (opcionalmente tras un periodo de tiempo adecuado) se somete a ensayo entonces la reactividad de las moléculas de unión de referencia marcadas y se compara esto con un valor de control en el que no se incluyó ninguna molécula de unión potencialmente competidora en la incubación. De nuevo, el ensayo puede ser uno cualquiera de una gama de ensayos inmunológicos basados en la hibridación de anticuerpos, y las moléculas de unión de referencia se detectarían por medio de la detección de su propio marcador, por ejemplo, usando estreptavidina en el caso de moléculas de unión de referencia biotiniladas o usando un sustrato cromogénico conjuntamente con un marcador enzimático (sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) con enzima peroxidasa) o simplemente detectando un marcador radiactivo. Una molécula de unión que va a examinarse que se une al mismo epítipo que la molécula de unión de referencia podrá competir eficazmente por la unión y por tanto reducirá significativamente la unión de la molécula de unión de referencia, tal como se comprueba mediante una reducción en el marcador unido. La reactividad de la molécula de unión de referencia (marcada) en ausencia de una molécula de unión completamente irrelevante sería el valor de control alto. El valor de control bajo se obtendría incubando la molécula de unión de referencia marcada con moléculas de unión de referencia no marcadas de exactamente del mismo tipo, cuando se produciría competición y se reduciría la unión de la molécula de unión de referencia marcada. En un ensayo de prueba, una reducción significativa en la reactividad de la molécula de unión de referencia marcada en presencia de una molécula de unión que va a examinarse es indicativa de una molécula de unión que reconoce el mismo epítipo, es decir, uno que "reacciona de manera cruzada" con la molécula de unión de referencia marcada.

50 Las moléculas de unión identificadas por estos ensayos de competición ("moléculas de unión competitivas" o "moléculas de unión que reaccionan de manera cruzada") incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos, fragmentos de anticuerpo y otros agentes de unión que se unen a un epítipo o sitio de unión al que se une la molécula de unión de referencia, es decir, una molécula de unión de la invención, así como anticuerpos, fragmentos de anticuerpo y otros agentes de unión que se unen a un epítipo o sitio de unión de manera suficientemente proximal a un epítipo al que se une la molécula de unión de referencia para que se produzca la unión competitiva entre las moléculas de unión que van a examinarse y la molécula de unión de referencia. Preferiblemente, las moléculas de unión competitivas de la invención, cuando están presentes en exceso, inhibirán la unión específica de una molécula de unión de referencia a una especie diana seleccionada en al menos un 10%, preferiblemente en al menos un 25%, más preferiblemente en al menos un 50% y lo más preferiblemente en al menos un 75%-90% o incluso más. La identificación de una o más moléculas de unión competitiva que se unen a aproximada, sustancial, esencialmente o al mismo epítipo que las moléculas de unión de la invención es una materia técnica sencilla. Ya que la identificación de las moléculas de unión competitiva se determina en comparación con una molécula de unión de referencia, es decir, una molécula de unión de la invención, se entenderá que realmente no se requiere en ningún modo determinar el epítipo al que la molécula de unión de referencia y la molécula de unión competitiva se unen con el fin de identificar una molécula de unión competitiva que se une al mismo o sustancialmente al mismo epítipo que la molécula de unión de referencia.

60 En un aspecto adicional, la invención se refiere a nuevas secuencias peptídicas líder (también denominadas

secuencias señal o presecuencias) y secuencias de nucleótidos que codifican los péptidos líder. Los péptidos líder son útiles en métodos para producir proteínas recombinantes, por ejemplo moléculas de inmunoglobulina, a partir de una célula huésped. La entrada de casi todos los polipéptidos secretados en la ruta secretora, tanto en procariotas como eucariotas, está dirigida por péptidos líder específicos en el extremo N-terminal de la cadena polipeptídica. Los péptidos líder dirigen los polipéptidos nacientes hacia la maquinaria de la célula que exporta polipéptidos desde la célula al medio circundante o, en algunos casos, al espacio periplásmico. Los mecanismos mediante los que los péptidos líder dirigen cadenas polipeptídicas nacientes a la ruta de secreción y dirigen la escisión proteolítica precisa y eficaz para liberar proteínas maduras no se entienden completamente. Habitualmente, aunque no necesariamente, el péptido líder está ubicado en el extremo N-terminal del producto de traducción primario y generalmente, aunque no necesariamente, se elimina por escisión del polipéptido deseado durante el proceso de secreción, para producir el polipéptido "maduro". La secreción de polipéptidos es un proceso dinámico y de múltiples etapas que implica varios elementos del aparato secretor celular y elementos de secuencia específicos en el péptido señal. Implica además traducción, translocación y procesamiento postraduccional, y una o más de estas etapas puede no completarse necesariamente antes de que otra o bien se haya iniciado o bien completado. Las secuencias señal son indispensables para la producción de anticuerpos en fago, en los que fragmentos de anticuerpo tales como scFv o Fab se fusionan con las proteínas de la cubierta del fago tales como pIII o pVIII.

Las secuencias señal son predominantemente de naturaleza hidrófoba, una característica que puede ser importante en el direccionamiento del péptido naciente a la membrana y la transferencia de proteínas secretoras a través de la membrana interna de procariotas o las membranas del retículo endoplasmático de eucariotas. En células de mamífero, los péptidos líder se reconocen por la proteína 54K de la partícula de reconocimiento de la señal (SRP), que se cree que sujeta la cadena naciente en una conformación competente para la translocación hasta que entra en contacto con la membrana del retículo endoplasmático. La SRP consiste en un ARN 7S y seis polipéptidos diferentes. El ARN 7S y la proteína de unión a péptido líder 54K (SRP54) de SRP de mamífero presentan una fuerte similitud de secuencia con el ARN 4,5S y la proteína P48 (Ffh) de *Escherichia coli*, que forma la partícula de reconocimiento de la señal en bacterias. Es probable que las diversas secuencias encontradas en diferentes péptidos señal interactúen de modos únicos con el aparato de secreción. No está disponible ninguna secuencia señal eucariota que dé como resultado un procesamiento correcto de proteínas y alta expresión de proteínas en bacterias o viceversa.

El formato de fago con anticuerpos o formato de fragmentos scFv a menudo no se considera un formato adecuado en ensayos de funcionalidades distintas de la unión, por ejemplo ensayos para someter a prueba la actividad neutralizante cuando se requiere unión bivalente o cuando se requieren regiones Fc funcionales. Por ejemplo, en ensayos que someten a prueba la actividad neutralizante, los datos obtenidos con anticuerpos en fagos o fragmentos scFv derivados de anticuerpos en fagos no son representativos de la actividad neutralizante de las moléculas de inmunoglobulina completas. Por tanto, se necesitan moléculas de inmunoglobulina completas, por ejemplo IgG1, para someter a prueba especificidades particulares para determinar la actividad funcional. Para aumentar la eficacia mediante la que las moléculas de scFv pueden reformarse para dar IgG1, se diseñó un nuevo sistema de vector que hace uso de péptidos líder nuevos. Los nuevos vectores y péptidos líder se diseñaron para permitir el transporte directo de regiones de cadena pesada de inmunoglobulina (región VH) y regiones de cadena ligera de inmunoglobulina (región VL) a partir de vectores de expresión bacterianos, tales como vectores de presentación en fago, por ejemplo PDV, pHEN y vectores derivados de los mismos, a un sistema de expresión eucariota. Este enfoque tiene una ventaja de tiempo y coste significativa con respecto a los sistemas convencionales en los que cada región VH y VL tienen que amplificarse por PCR, clonarse y comprobarse para detectar mutaciones frecuentes que se producen a través del proceso de amplificación antes de transportarse a vectores de expresión eucariotas. En resumen, el procedimiento es tal como sigue. Se clonan repertorios de fragmentos VH y VK en vectores de expresión procariotas tales como pHEN1 y PDV-C06 usando enzimas de restricción específicas. Estos sitios se eligen para que estén fuera de las secuencias que codifican la región V porque hay demasiada diversidad de secuencia dentro de las regiones V como para lograr una amplificación por PCR y clonación eficaces de repertorios de genes V. Normalmente, el sitio de reconocimiento de la enzima en el extremo 5' de los fragmentos de anticuerpo VH está ubicado en la región codificante de la secuencia líder procariota tal como el sitio Sfil en la secuencia líder PelB de pHEN1 o PDV-C06. Por tanto, Sfil es uno de los sitios disponibles para la clonación en el extremo 5' que está presente en todos los clones de scFv derivados de presentación en fago. Cuando se usa este sitio para la clonación, la secuencia codificada por el sitio Sfil y la secuencia en el sentido de 3' se transfieren al vector eucariota; esto significa que la parte C-terminal del líder procariota se transfiere al vector eucariota. En la presente invención, se diseñó un líder eucariota que es funcional cuando la región que codifica la parte C-terminal de la secuencia líder procariota (por ejemplo PelB) se transfiere al vector eucariota. Se clonan repertorios de fragmentos de anticuerpo VL usando un sitio Sall que está ubicado dentro de la secuencia de ligador de scFv. Cuando se usa este sitio para la clonación, la secuencia codificada por el sitio Sall se transfiere al vector eucariota y formará parte de la secuencia líder eucariota. Por tanto, se diseñaron líderes que contenían una secuencia en el sentido de 5' del sitio de restricción Sall que junto con la secuencia codificada por el sitio de restricción Sall y la secuencia en el sentido de 3' del sitio de restricción tras la transcripción y traducción forman un líder funcional en células eucariotas. La región VH se corta de un vector de presentación en fagos con enzimas de restricción y se clona en marco entre un péptido líder eucariota "truncado" y los dominios constante y de bisagra de una cadena pesada de inmunoglobulina presente en el vector de expresión. De un modo idéntico, la región VL se clona en marco con un péptido líder eucariota "truncado" y el dominio constante de la cadena ligera (o bien lambda o bien kappa) de

5 inmunoglobulina. Los péptidos líder recién diseñados tienen una secuencia que se reconoce por el aparato secretor celular y se escinde proteolíticamente durante la secreción de las cadenas de inmunoglobulina desde las células huésped, por ejemplo células huésped eucariotas, dando como resultado proteínas de cadena pesada y ligera de Ig maduras correctamente procesadas. La invención también proporciona un vector de expresión (pIGCHG1) para la producción de una molécula de inmunoglobulina de cadena pesada IgG1 de longitud completa y dos vectores que codifican un fragmento de cadena ligera completo. Un vector (pIG-Ckappa) produce el subtipo de cadena ligera kappa y el otro (pIG-Clambda) la variante de cadena ligera lambda. Es esencial determinar de antemano a qué subtipo pertenece la región VL, de modo que pueda fusionarse con la misma el dominio de cadena ligera constante correcto. Por supuesto, el dominio constante IgG1 en el vector puede sustituirse por un dominio IgG2, IgG3 o IgG4 para producir cadenas pesadas del formato IgG2, IgG3 o IgG4. También pueden prepararse otras proteínas que necesitan una secuencia líder tanto en procariontes como eucariotas por medio de los nuevos líderes. Para lograr una clonación conveniente y eficaz, se extendieron los vectores pIG con fragmentos de relleno grandes de manera que se separan fácilmente vectores de doble corte de vectores de corte único lineales.

15 En un aspecto, la invención se refiere a un péptido líder eucariota que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:150, SEQ ID NO:152 y SEQ ID NO:154. En un aspecto adicional, la invención proporciona un polipéptido recombinante (por ejemplo proteína recombinante) que comprende un péptido líder eucariota de la invención y un polipéptido de interés. El polipéptido de interés puede ser cualquier proteína recombinante, pero preferiblemente es una proteína eucariota tal como una proteína de mamífero, o más preferiblemente una proteína humana. En una realización, el polipéptido de interés se selecciona del grupo que consiste en una cadena pesada de inmunoglobulina, una cadena ligera de inmunoglobulina, un fragmento de cadena pesada de inmunoglobulina y un fragmento de cadena ligera de inmunoglobulina. Fragmentos preferidos son regiones variables de inmunoglobulina (regiones VH o VL). Preferiblemente, los fragmentos y cadenas de inmunoglobulina son humanos. En un aspecto de la invención, el péptido líder se usa para dirigir o incluso potenciar la secreción del polipéptido recombinante producido en un organismo huésped recombinante (es decir, transformado), por ejemplo una célula huésped. En una realización, el extremo carboxilo terminal del péptido líder eucariota se une/fusiona al extremo amino terminal del polipéptido de interés. Preferiblemente, el péptido líder que comprende la SEQ ID NO:150 se fusiona a una cadena pesada de inmunoglobulina o fragmento de la misma. Este péptido líder es el resultado de la unión de un péptido líder eucariota "truncado" codificado por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:155 a una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada de inmunoglobulina o fragmento de la misma, por ejemplo una región variable de cadena pesada del plásmido pHEN1 o PDV-C06. Los péptidos líder que comprenden las SEQ ID NO:152 y SEQ ID NO:154 se unen a una cadena ligera kappa y lambda o fragmento de la misma, respectivamente. Estos péptidos líder son el resultado de la unión de un péptido líder eucariota "truncado" codificado por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:156 o SEQ ID NO:157 a una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera kappa o lambda de inmunoglobulina o fragmento de la misma, por ejemplo una región variable de cadena ligera kappa o lambda del plásmido pHEN1 o PDV-C06. Por tanto, la invención proporciona un polipéptido de fusión que comprende una secuencia de péptido líder de la invención y una secuencia de proteína recombinante. El polipéptido de fusión puede diseñarse de manera que estén presentes aminoácidos adicionales entre el péptido líder y la proteína recombinante. En estos casos, la escisión del péptido líder del polipéptido de fusión puede producir una proteína recombinante modificada que tiene aminoácidos adicionales en el extremo N-terminal. Alternativamente, el polipéptido de fusión puede diseñarse de manera que el sitio para la escisión del péptido líder se encuentre unos cuantos aminoácidos en la secuencia de la proteína recombinante. En estos casos, puede producirse una proteína recombinante modificada que tiene un extremo N-terminal alterado.

45 En otro aspecto, la invención proporciona una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido líder eucariota de la invención. Los péptidos líder eucariotas según la invención comprende los nucleótidos GGCCAGCCGCC (SEQ ID NO:158), es decir un sitio Sfil, o los nucleótidos TCGAC (SEQ ID NO:159), es decir, un sitio XhoI/SalI, dentro de la secuencia de ácido nucleico que codifica los péptidos líder. El sitio XhoI/SalI combinado se prepara ligando el sitio XhoI es un líder procarionte en un vector eucariota que se ha digerido con la enzima de restricción SalI. Preferiblemente, los sitios se ubican dentro de la parte carboxilo terminal de las secuencias que codifican el péptido líder. En una realización preferida, la secuencia de ácido nucleico que codifica los nuevos péptidos líder según la invención comprenden una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:149, SEQ ID NO:151 y SEQ ID NO:153. La secuencia de ácido nucleico puede comprender además una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés. Se mencionaron anteriormente polipéptidos de interés adecuados. La secuencia de ácido nucleico que codifica los péptidos líder y la secuencia de ácido nucleico que codifica los polipéptidos de interés pueden formar un denominado constructo de fusión. Por "constructo de fusión" quiere decirse un ácido nucleico que comprende la secuencia codificante para un péptido líder y la secuencia codificante, con o sin intrones, para una proteína recombinante, en el que las secuencias codificantes están adyacentes en el mismo marco de lectura de manera que, cuando la construcción de fusión se transcribe y traduce en una célula huésped, se produce una proteína en la que el extremo C-terminal del péptido líder está unido al extremo N-terminal de la proteína recombinante. El producto proteico de la construcción de fusión puede denominarse en el presente documento "polipéptido de fusión". El ácido nucleico que codifica el péptido líder puede estar operativamente unido/ligado al ácido nucleico que contiene la región codificante de la proteína recombinante de manera que la región codificante del péptido líder está en el sentido de 5' de (es decir, en 5' respecto a) y en el mismo marco de lectura con la región codificante de la proteína recombinante para proporcionar un constructo de

fusión. Normalmente, el extremo 3' del ácido nucleico que codifica el péptido líder está unido al extremo 5' del ácido nucleico que codifica la proteína recombinante. Las dos regiones codificantes están unidas de manera que están en el mismo marco de lectura. De este modo, la construcción de fusión codificará para una única proteína, que tiene el péptido líder en el extremo N-terminal seguido por la proteína recombinante en el extremo C-terminal. El péptido líder y la proteína recombinante pueden unirse directamente o puede haber uno o varios aminoácidos que los conectan. Se sabe bien que ciertos aminoácidos interfieren con la escisión mediante peptidasas señal y estos residuos se evitan en el diseño del sitio de escisión para el polipéptido de fusión. La construcción de fusión puede expresarse en una célula huésped para proporcionar un polipéptido de fusión que comprende el péptido líder unido, en su extremo carboxilo terminal, a la proteína recombinante en su extremo amino terminal. El polipéptido de fusión puede secretarse a partir de la célula huésped. Normalmente, el péptido líder se escinde del polipéptido de fusión durante el proceso de secreción, dando como resultado la acumulación de proteína recombinante secretada en el entorno celular externo.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico según la invención. Preferiblemente, la secuencia de ácido nucleico de la invención comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido líder según la invención. Puede comprender además una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de interés. Pueden prepararse vectores de expresión que contienen los ácidos nucleicos que codifican el péptido líder o la construcción de fusión mediante métodos que se conocen bien en la técnica. En general, los vectores de expresión contendrán ácido nucleico que codifica el péptido líder, o la construcción de fusión, bajo el control de un promotor. En algunas realizaciones, más de un péptido líder o constructo de fusión puede colocarse bajo el control de un único promotor. En tales realizaciones, el/los constructo(s) de fusión adicional(es) se colocara(n) en el sentido de 3' del primer constructo de fusión y separado(s) de la construcción de fusión en el sentido de 5' por nucleótidos. El promotor se elige de modo que sea capaz de dirigir la transcripción en un huésped de interés. Se conocen bien promotores capaces de dirigir la transcripción en diversas células huésped. En una realización, el promotor es el promotor largo de CMV, pero puede elegirse también cualquier otro promotor adecuado. En general, un "promotor" incluirá todas las secuencias de nucleótido en el sentido de 5' del inicio traduccional necesarias para la transcripción de la región codificante del péptido líder y/o polipéptido de fusión. El promotor puede incluir o solaparse con la secuencia del sitio de unión a ribosomas. La selección del promotor influirá a menudo en la selección del sitio de unión a ribosomas también. El vector de expresión puede contener también otras secuencias de ácido nucleico que regulan la expresión incluyendo genes marcadores seleccionables, orígenes de replicación, secuencias señal de poliadenilación, etc. Otras secuencias de ácido nucleico que regulan la expresión y secuencias adicionales, por ejemplo secuencias de polipéptidos útiles para el aislamiento, que pueden incluirse en los vectores, se mencionaron anteriormente. Los vectores de expresión pueden contener uno o más genes marcadores seleccionables, incluyendo ampicilina y/o neomicina, para la selección en el huésped de interés y/o uno o más orígenes de replicación, incluyendo un ori pUc y/o un ori SV40 y/o un ori f1, para proporcionar la replicación autónoma del vector en el huésped. Adicionalmente, pueden contener una o más secuencias señal de poliadenilación incluyendo una señal de SV40-poliA y/o una señal de BGH-poliA. Alternativamente, o además, el vector de expresión puede contener secuencias de nucleótidos para ayudar en la integración del vector en el cromosoma del huésped. Un vector de expresión según la invención puede comprender además un sitio XhoI o un sitio NotI. Una región variable de cadena pesada y/o ligera de inmunoglobulina puede estar ubicada por ejemplo entre un sitio SfiI y un sitio XhoI (por ejemplo en un vector de expresión para la producción de cadenas de inmunoglobulina de cadena pesada (IgG1)), y estar ubicada entre un sitio XhoI y un sitio NotI (por ejemplo en un vector de expresión para la producción de cadenas de inmunoglobulina de cadena ligera (kappa y lambda)). Los sitios de restricción pueden estar ubicados en el sentido de 3' de una secuencia de ácido nucleico que codifica el promotor, por ejemplo el promotor largo de CMV, y en el sentido de 3' del péptido líder eucariota de la invención. Los sitios pueden estar ubicados en el sentido de 5' de una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio constante de inmunoglobulina.

En una realización adicional, la invención proporciona un vector de expresión de una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:155, SEQ ID NO:156 y SEQ ID NO:157, es decir, un péptido líder eucariota "truncado". El vector de expresión que comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:155 comprende un sitio SfiI en su extremo carboxilo terminal. Los vectores de expresión que comprenden la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:156 o SEQ ID NO:157 comprenden un sitio XhoI en sus extremos carboxilo terminales. Los vectores pueden comprender además en el sentido de 3' de la secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:155, SEQ ID NO:156 y SEQ ID NO:157 un sitio XhoI (para SEQ ID NO:155) o un sitio NotI (para SEQ ID NO:156 y SEQ ID NO:157). Pueden comprender además una secuencia de relleno entre la secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:155, SEQ ID NO:156 y SEQ ID NO:157 y el sitio XhoI o el sitio NotI. La secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:155, SEQ ID NO:156 y SEQ ID NO:157, la secuencia de relleno y el sitio XhoI y el sitio NotI pueden estar ubicados en el sentido de 3' de una secuencia promotora tal como una secuencia promotora larga de CMV. Pueden estar ubicados en el sentido de 5' de una región constante de cadena pesada o ligera de inmunoglobulina. El vector de expresión puede comprender además otras secuencias de ácido nucleico que regulan la expresión u otras secuencias. Se mencionaron anteriormente ejemplos de secuencias de ácido nucleico que regulan la expresión u otras secuencias adecuadas. En una realización, el vector de expresión según la invención comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54 y SEQ ID NO:58. Estos vectores comprenden una secuencia de relleno.

Una célula huésped que comprende al menos un vector de expresión según la invención es otro aspecto de la invención. Preferiblemente, la célula huésped es una célula huésped humana. Otras células huésped adecuadas se mencionaron anteriormente. Además, la invención se refiere al uso de un vector de expresión según la invención y/o una célula huésped según la invención para la producción de una cadena y/o molécula de inmunoglobulina.

- 5 Aún en un aspecto adicional la invención proporciona un método para producir vectores de expresión. En una realización, el vector de expresión producido es adecuado para producir una cadena pesada de inmunoglobulina. El método comprende las etapas de: digerir/cortar un vector de expresión que comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:155 y en el sentido de 3' de la misma un sitio XhoI y una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina con las enzimas de restricción SfiI y XhoI, digerir/cortar un vector de presentación en fagos que comprende una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina con las enzimas de restricción SfiI y XhoI, insertar la región variable de cadena pesada de inmunoglobulina en el vector de expresión y aislar el vector de expresión. En una realización específica, el vector de expresión que comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:155 y en el sentido de 3' de la misma un sitio XhoI y una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:53. En otra realización, el vector de expresión producido es adecuado para producir una cadena ligera de inmunoglobulina. El método comprende las etapas de digerir/cortar un vector de expresión que comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:156 o SEQ ID NO:157 y en el sentido de 3' de la misma un sitio NotI y una región constante de cadena ligera de inmunoglobulina con las enzimas de restricción XhoI y NotI, digerir/cortar un vector de presentación en fagos que comprende una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina con las enzimas de restricción Sall y NotI, insertar la región variable de cadena ligera de inmunoglobulina en el vector de expresión y aislar el vector de expresión. En una realización específica, el vector de expresión que comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:156 o SEQ ID NO:157 y en el sentido de 3' de la misma un sitio NotI y una región constante de cadena ligera de inmunoglobulina comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:54 o SEQ ID NO:58, respectivamente. El vector de presentación en fagos puede ser un fagémido pero también cualquier otro vehículo adecuado. Queda claro que las etapas de digestión/corte pueden realizarse en cualquier orden e incluso de manera simultánea. Debe entenderse además que las regiones de cadena ligera variables y de cadena pesada variables en el vector de presentación en fago, tal como pHEN1 o PDV, están ubicadas entre los sitios SfiI y XhoI y Sall y NotI, respectivamente. Digiriendo los vectores de presentación con las enzimas de restricción respectivas, se obtienen las regiones y pueden usarse para su inserción en los vectores de expresión eucariotas.
- 30 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para producir una cadena pesada o ligera de inmunoglobulina, comprendiendo el método las etapas de transformar al menos una célula huésped con un vector de expresión tal como se produjo anteriormente, cultivar la célula huésped en condiciones que conducen a la expresión de una cadena de inmunoglobulina y, opcionalmente, purificar la cadena de inmunoglobulina del medio o extracto celular. En una realización, la célula huésped puede transformarse con un vector de expresión adecuado para producir una cadena pesada y un vector de expresión adecuado para producir una cadena ligera y puede producirse una inmunoglobulina completa. Muchas proteínas comercialmente significativas se producen mediante expresión génica recombinante en células huésped procariontas o eucariotas apropiadas. Es deseable frecuentemente aislar el producto proteico expresado tras su secreción al medio de cultivo. Las proteínas secretadas son normalmente solubles y pueden separarse fácilmente de proteínas contaminantes del huésped y otros componentes celulares. Se conocen bien en la técnica métodos para la separación y/o purificación.

EJEMPLOS

Para ilustrar la invención, se proporcionan los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

- 45 *Construcción de una biblioteca de presentación en fagos de scFv usando ARN extraído de sangre periférica de donantes convalecientes de VNO.*

Se tomaron muestras de sangre de tres pacientes con VNO convalecientes 1, 2 y 3 meses tras la infección. Se aislaron leucocitos de sangre periférica mediante centrifugación y se guardó y congeló el suero sanguíneo a -80°C. Todos los donantes en todos los puntos de tiempo tenían altos títulos de anticuerpos neutralizantes frente a VNO tal como se determinó usando un ensayo de neutralización de virus. Se preparó ARN total a partir de las células usando separación de fases orgánicas y posterior precipitación con etanol. Se disolvió el ARN obtenido en agua libre de ARNasa y se determinó la concentración mediante medición de la DO a 260 nm. Después de eso, se diluyó el ARN hasta una concentración de 100 ng/μl. A continuación, se convirtió 1 μg de ARN en ADNc tal como sigue: A 10 μl de ARN total, se le añadieron 13 μl de agua ultrapura tratada con DEPC y 1 μl de hexámeros al azar (500 ng/μl) y se calentó la mezcla obtenida a 65°C durante 5 minutos y se enfrió rápidamente sobre hielo húmedo. Entonces, se añadieron a la mezcla 8 μl de tampón 5X First-Strand, 2 μl de dNTP (10 mM cada uno), 2 μl de DTT (0,1 M), 2 μl de inhibidor de ARNasa (40 U/μl) y 2 μl de transcriptasa inversa del VLMM Superscript™III (200 U/μl), se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos y se incubó durante 1 hora a 50°C. Se terminó la reacción mediante inactivación por calor, es decir, incubando la mezcla durante 15 minutos a 75°C.

Se diluyeron los productos de ADNc obtenidos hasta un volumen final de 200 μl con agua ultrapura tratada con

DEPC. La DO a 260 nm de una disolución diluida 50 veces (en tampón Tris 10 mM) de la dilución de los productos de ADNc obtenidos dio un valor de 0,1.

Para cada donante, se usaron de 5 a 10 μ l de los productos de ADNc diluidos como molde para la amplificación por PCR de las secuencias de cadena ligera kappa o lambda y la familia de cadena pesada gamma de inmunoglobulina usando cebadores de oligonucleótido específicos (véanse las tablas 1-6). Las mezclas de reacción de PCR contenían, además de los productos de ADNc diluidos, 25 pmoles de cebador sentido y 25 pmoles de cebador antisentido en un volumen final de 50 μ l de Tris-HCl 20 mM (pH 8,4), KCl 50 mM, MgCl₂ 2,5 mM, dNTP 250 μ M y 1,25 unidades de Taq polimerasa. En un ciclador termico de tapa calentada que tenía una temperatura de 96°C, se fundieron rápidamente las mezclas obtenidas durante 2 minutos, seguido por 30 ciclos de: 30 segundos a 96°C, 30 segundos a 60°C y 60 segundos a 72°C.

En una primera ronda de amplificación, se combinaron cada uno de diecisiete cebadores sentido de región variable de cadena ligera (once para la cadena ligera lambda (véase la tabla 1) y seis para la cadena ligera kappa (véase la tabla 3) con un cebador antisentido que reconocía la región constante de C-kappa denominado HuCk 5'-ACACTCTCCCCTGTTGAAGCT CTT-3' (véase SEQ ID NO:37) o de C-lambda HuC λ 2 5'-TGAACATTCTGTAGGGGCCACTG-3' (véase SEQ ID NO:38) y HuC λ 7 5'-AGAGCATTCTGCAGGGGCCACTG-3' (véase SEQ ID NO:39) (los cebadores antisentido HuC λ 2 y HuC λ 7 se mezclaron hasta equimolaridad antes de su uso), proporcionando 4 multiplicado por 17 productos de aproximadamente 600 pares de bases. Estos productos se purificaron en un gel de agarosa al 2% y se aislaron del gel usando columnas de extracción en gel de Qiagen. Se usó 1/10 de cada uno de los productos aislados en una reacción de PCR idéntica a la descrita anteriormente usando los mismos diecisiete cebadores sentido, mediante lo cual se combinó cada cebador sentido de cadena ligera lambda con uno de los tres cebadores antisentido específicos de región J-lambda y cada cebador sentido de cadena ligera kappa se combinó con uno de los cinco cebadores antisentido específicos de región J-kappa. Los cebadores usados en la segunda amplificación se extendieron con sitios de restricción (véase la tabla 3) para permitir la clonación directa en el vector de presentación en fagos PDV-C06 (véase SEQ ID NO: 40). Esto dio como resultado 4 multiplicado por 63 productos de aproximadamente 350 pares de bases que se combinaron para dar un total de 10 fracciones. Se eligió este número de fracciones para mantener la distribución natural de las diferentes familias de cadenas ligeras dentro de la biblioteca y no representar en exceso o en defecto determinadas familias. Se usó el número de alelos dentro de una familia para determinar el porcentaje de representación dentro de una biblioteca (véase la tabla 4). En la siguiente etapa, se digirieron 2,5 μ g de fracción combinada y 100 μ g de vector PDV-C06 con Sall y NotI y se purificaron a partir de gel. Posteriormente, se realizó la ligación durante la noche a 16°C de la siguiente manera. A 500 ng de vector PDV-C06 se le añadieron 70 ng de fracción combinada en un volumen total de 50 μ l de mezcla de ligación que contenían Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), MgCl₂ 10 mM, DTT 10 mM, ATP 1 mM, BSA 25 μ g/ml y ADN ligasa de T4 2,5 μ l (400 U/ μ l). Se siguió este procedimiento para cada fracción combinada. Se purificaron las mezclas de ligación mediante fenol/cloroformo, seguido por una extracción en cloroformo y precipitación en etanol, métodos bien conocidos por el experto en la técnica. Se disolvió el ADN obtenido en 50 μ l de agua ultrapura y se sometieron a electroporación dos veces alícuotas de 2,5 μ l por mezcla de ligación en 40 μ l de bacterias *E. coli* competentes para TG1 según el protocolo del fabricante (Stratagene). Se hicieron crecer los transformantes durante la noche a 37°C en un total de 30 placas (tres placas por fracción combinada; tamaño de la placa: 240 mm x 240 mm) que contenían agar 2TY complementado con ampicilina 50 μ g/ml y un 4,5% de glucosa. Se obtuvo una (sub)biblioteca de regiones de cadena ligera variables raspando los transformantes de las placas de agar. Esta (sub)biblioteca se usó directamente para la preparación de ADN de plásmido usando un kit de preparación QIAFilter MAXI de Qiagen™.

Para cada donante se amplificaron las secuencias de inmunoglobulina de cadena pesada a partir de las mismas preparaciones de ADNc en un procedimiento de PCR de dos rondas similar y parámetros de reacción idénticos a los descritos anteriormente para las regiones de cadena ligera con la condición de que se usaron los cebadores representados en las tablas 5 y 6. La primera amplificación se realizó usando un conjunto de nueve cebadores dirigidos sentido (véase la tabla 5; que cubre todas las familias de regiones variables de cadena pesada) cada uno combinado con un cebador antisentido de región constante específico de IgG denominado HuCIgG 5'-GTC CAC CTT GGT GTT GCT GGG CTT-3' (SEQ ID NO: 41) proporcionando cuatro multiplicado por nueve productos de aproximadamente 650 pares de bases. Estos productos se purificaron en un gel de agarosa al 2% y se aislaron del gel usando columnas de extracción en gel de Qiagen. Se usó 1/10 de cada uno de los productos aislados en una reacción de PCR idéntica a la descrita anteriormente usando los mismos nueve cebadores sentido, mediante lo cual se combinó cada cebador sentido de cadena pesada con uno de los cuatro cebadores antisentido específicos de región JH. Los cebadores usados en la segunda ronda se extendieron con sitios de restricción (véase la tabla 6) para permitir la clonación dirigida en el vector de (sub)biblioteca de cadena ligera. Esto dio como resultado por donante 36 productos de aproximadamente 350 pares de bases. Se combinaron estos productos para cada donante por cebador sentido (VH) usado en nueve fracciones. Se purificaron los productos obtenidos usando columnas de purificación de PCR de Qiagen. A continuación, se digirieron las fracciones con Sfil y XhoI y se ligaron en el vector de (sub)biblioteca de cadena ligera, que se cortó con las mismas enzimas de restricción, usando el mismo procedimiento de ligación y volúmenes que los descritos anteriormente para la (sub)biblioteca de cadena ligera. Alternativamente, se digirieron las fracciones con NcoI y XhoI y se ligaron en el vector de cadena ligera, que se cortó con las mismas enzimas de restricción, usando el mismo procedimiento de ligación y volúmenes que los descritos anteriormente para la (sub)biblioteca de cadena ligera. La ligación, purificación y posterior transformación de la

biblioteca definitiva resultante también se realizaron tal como se describió anteriormente para la (sub)biblioteca de cadena ligera y en este punto se combinaron las mezclas de ligación de cada donante por combinación de VH. Se hicieron crecer los transformantes en 27 placas (tres placas por fracción combinada; tamaño de la placa: 240 mm x 240 mm) que contenían agar 2TY complementado con ampicilina 50 µg/ml y un 4,5% de glucosa. Se recogieron todas las bacterias en medio de cultivo 2TY que contenía ampicilina 50 µg/ml y un 4,5% de glucosa, se mezclaron con glicerol hasta el 15% (v/v) y se congelaron en alícuotas de 1,5 ml a -80°C. Se realizaron el rescate y la selección de cada biblioteca tal como se describe a continuación.

Ejemplo 2

Selección de fagos que llevan fragmentos Fv monocatenarios que reconocen específicamente la proteína (E) de la envuelta de VNO

Se seleccionaron fragmentos de anticuerpo usando bibliotecas de presentación en fagos de anticuerpo, tecnología de presentación en fagos general y tecnología MAbstract[®], esencialmente tal como se describe en la patente estadounidense n.º 6.265.150 y en el documento WO98/15833. Las bibliotecas de fagos de anticuerpo usadas fueron dos bibliotecas de fagos scFv semisintéticas diferentes (JK1994 y WT2000) y la biblioteca inmunitaria preparada tal como se describió en el ejemplo 1. La primera biblioteca de fagos scFv semisintética (JK1994) se ha descrito en de Kruif *et al.*, 1995b, la segunda (WT2000) se construyó esencialmente tal como se describe en de Kruif *et al.*, 1995b. En resumen, la biblioteca tiene un formato semisintético mediante lo cual se incorporó variación en los genes V de cadena ligera y pesada usando oligonucleótidos degenerados que incorporan variación dentro de las regiones CDR. Sólo se usaron genes de cadena pesada VH3, en combinación con genes de cadena ligera kappa y lambda. Se recrearon sintéticamente CDR1 y CDR3 de la cadena pesada y CDR3 de la cadena ligera en un enfoque basado en PCR similar al descrito en de Kruif *et al.*, 1995b. Se clonaron secuencialmente los genes de región V así creados en un formato de scFv en un vector fagémido y se amplificaron para generar una biblioteca de fagos tal como se describió anteriormente. Además, se usaron los métodos y fagos cooperadores descritos en el documento WO 02/103012 en la presente invención. Para identificar anticuerpos en fagos que reconocían la proteína E de VNO, se realizaron experimentos de selección de fagos usando VNO completo (denominado cepa USA99b o cepa 385-99) inactivado mediante irradiación gamma (50 Gy durante 1 hora), proteína E de VNO expresada de manera recombinante (cepa 382-99) y/o partículas similares a VNO que expresan la proteína E de VNO (cepa 382-99) en su superficie.

Se produjo la proteína E expresada de manera recombinante tal como sigue. Se sintetizó la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína M/preM y la proteína E de longitud completa de la cepa de VNO 382-99 (véase SEQ ID NO:42 para la secuencia de aminoácidos de una proteína de fusión que comprende ambos polipéptidos de VNO). Los aminoácidos 1-93 de SEQ ID NO:42 constituyen la proteína preM de VNO, los aminoácidos 94-168 de SEQ ID NO:42 constituyen la proteína M de VNO, los aminoácidos 169-669 de SEQ ID NO:42 constituyen la proteína E de VNO (la proteína E de VNO soluble (ectodominio) constituye los aminoácidos 169-574 de SEQ ID NO:42, mientras que la región del tallo y transmembrana de la proteína E de VNO constituye los aminoácidos 575-669 de SEQ ID NO:42). Se clonó la secuencia de nucleótidos sintetizada en el plásmido pAdapt y se obtuvo el plásmido denominado pAdapt.WNV.prM-E (FL).

Para producir una forma secretada soluble de la proteína E, se preparó un constructo que carecía de las regiones que abarcan la transmembrana presentes en los 95 aminoácidos finales en el extremo carboxilo terminal de la proteína E de longitud completa (forma truncada). Para ese fin, se amplificó por PCR la construcción de longitud completa pAdapt.WNV.prM-E (FL) con los cebadores CMV-Spe (SEQ ID NO: 43) y WNV-E-95 REV (SEQ ID NO:44) y se clonó el fragmento obtenido en el plásmido pAdapt.myc.his para crear el plásmido denominado pAdapt.VNO -95. A continuación, se amplificaron por PCR la región que codifica la proteína preM, la proteína E truncada, la etiqueta Myc y la etiqueta His con los cebadores clefsmaquwv (SEQ ID NO:45) y WNVmychis inverso (SEQ ID NO:46) y se clonaron en el vector pSyn-C03 que contenía el péptido líder HAVT20 usando los sitios de restricción EcoRI y SpeI. La construcción de expresión obtenida, pSyn-C03-WNV-E -95, se transfectó en células HEK293T confluentes al 90% usando lipofectamina según las instrucciones del fabricante. Se cultivaron las células durante 5 días en medio CHO ultra libre de suero, entonces, se recogió el medio y se purificó mediante pase sobre columnas de quelación HisTrap (Amersham Bioscience) precargadas con iones níquel. Se eluyó la proteína E truncada con 5 ml de imidazol 250 mM y se purificó adicionalmente mediante pase sobre una columna de filtración en gel G-75 equilibrada con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se analizaron las fracciones obtenidas mediante análisis de SDS-PAGE e inmunotransferencia de tipo Western usando el anticuerpo murino 7H2 específico de la proteína E de VNO (Bioreliance, véase Beasley y Barrett 2002). Se tomaron alícuotas de tres fracciones de 5 ml que contenían una única banda de ~45 kDa que era inmunorreactiva con el anticuerpo 7H2 y se almacenaron a -20°C hasta su uso posterior. Se determinó la concentración de proteína mediante la DO a 280 nm.

Se produjeron partículas similares a VNO tal como sigue. Se digirieron la construcción pSyn-C03-WNV-E -95 descrito anteriormente y pDNAC3.1 (Invitrogen) con las endonucleasas de restricción MnlI y XbaI y se digirió la construcción pAdapt.WNV.prM-E (FL) descrito anteriormente con las endonucleasas de restricción ClaI y XbaI. Se combinaron los fragmentos resultantes en una ligación de tres puntos para producir la construcción pSyn-H-preM/E FL. Este constructo contenía la proteína E de longitud completa y expresaba las dos proteínas estructurales de VNO, la proteína M y E, requeridas para el ensamblaje de un virión envuelto. Se transfectó la construcción en células

HEK293T confluentes al 70% usando lipofectamina según las instrucciones del fabricante. Se cultivaron las células durante 3 días en medio CHO ultra libre de suero, entonces se recogió el medio, se dispuso en capas sobre una disolución de glicerol al 30% a una razón 2:1 y se sedimentó mediante centrifugación durante 2 horas a 120.000*g a 4°C. Se resuspendieron las partículas similares a VNO en PBS, se dividieron en alícuotas y se almacenaron a -80°C. Se analizaron las alícuotas mediante análisis de SDS-PAGE e inmunotransferencia de tipo Western usando el anticuerpo murino 7H2 específico de la proteína E de VNO (Bioreliance).

Antes de la inactivación, se purificó VNO completo mediante sedimentación a través de una disolución de glicerol al 30% tal como se describió anteriormente para partículas similares a VNO. Se resuspendió el VNO purificado en Tris/HCl 10 mM pH 7,4 que contenía EDTA 10 mM y NaCl 200 mM, se mantuvo la preparación obtenida en hielo seco durante la inactivación, se sometió a prueba para determinar la infectividad y se almacenó a -80°C en pequeñas alícuotas. Se analizaron las alícuotas mediante análisis de SDS-PAGE e inmunotransferencia de tipo Western usando el anticuerpo murino 7H2 específico de la proteína E de VNO (Bioreliance).

Se diluyeron VNO inactivado completo, partículas similares a VNO o proteína E soluble expresada de manera recombinante en PBS. Se añadieron 2-3 ml de la preparación a tubos MaxiSorp™ Nunc-Immuno (Nunc) y se incubaron durante la noche a 4°C sobre una rueda giratoria. Se bloqueó una alícuota de una biblioteca de fagos (500 µl, aproximadamente 10¹³ ufc, amplificada usando el fago cooperador CT (véase el documento WO 02/103012)) en tampón de bloqueo (Protifar al 2% en PBS) durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Se añadió la biblioteca de fagos bloqueada a los inmunotubos, se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente y se lavó con tampón de lavado (Tween-20 al 0,1% v/v en PBS) para eliminar los fagos no unidos. Se eluyeron los fagos unidos del antígeno mediante incubación con 1 ml de glicina-HCl 50 mM pH 2,2 durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se mezclaron los fagos eluidos con 0,5 ml de Tris-HCl 1 M pH 7,5 para neutralizar el pH. Se usó esta mezcla para infectar 5 ml de un cultivo de *E. coli* XL1-Blue que se había hecho crecer a 37°C hasta una DO a 600 nm de aproximadamente 0,3. Se dejó que los fagos infectaran las bacterias XL1-Blue durante 30 minutos a 37°C. Entonces, se centrifugó la mezcla durante 10 minutos a 3200*g a temperatura ambiente y se resuspendió el sedimento bacteriano en 0,5 ml de medio de extracto de levaduras 2-triptona (2TY). Se dividió la suspensión bacteriana obtenida sobre dos placas de agar 2TY complementado con tetraciclina, ampicilina y glucosa. Tras la incubación durante la noche de las placas a 37°C, se rasparon las colonias de las placas y se usaron para preparar una biblioteca de fagos enriquecida, esencialmente tal como se describe por De Kruif *et al.* (1995a) y el documento WO 02/103012. En resumen, se usaron las bacterias raspadas para inocular medio 2TY que contenía ampicilina, tetraciclina y glucosa y se hicieron crecer a una temperatura de 37°C hasta una DO a 600 nm de ~0,3. Se añadieron fagos cooperadores CT y se dejó que infectaran las bacterias tras lo cual se cambió el medio a 2TY que contenía ampicilina, tetraciclina y kanamicina. Se continuó la incubación durante la noche a 30°C. Al día siguiente, se retiraron las bacterias del medio 2TY mediante centrifugación tras lo que se precipitaron los fagos en el medio usando polietilenglicol (PEG) 6000/NaCl. Finalmente, se disolvieron los fagos en 2 ml de PBS con albúmina sérica bovina al 1% (BSA), se esterilizaron por filtración y se usaron para la siguiente ronda de selección.

Normalmente, se realizaron dos rondas de selecciones antes del aislamiento de anticuerpos en fagos individuales. Tras la segunda ronda de selección, se usaron colonias de *E. coli* individuales para preparar anticuerpos en fagos monoclonales. Esencialmente, se hicieron crecer colonias individuales hasta la fase logarítmica en un formato de placa de 96 pocillos y se infectaron con fagos cooperadores CT, tras lo cual se dejó que continuara la producción de anticuerpos en fagos durante la noche. Los anticuerpos en fagos producidos se precipitaron con PEG/NaCl y se esterilizaron por filtración y se sometieron a prueba en ELISA para determinar la unión a partículas similares a VNO purificadas tal como se describió anteriormente.

Ejemplo 3

Validación de los anticuerpos en fagos de cadena sencilla específicos de VNO

Se validaron los anticuerpos en fagos de cadena sencilla seleccionados que se obtuvieron en los exámenes descritos anteriormente en ELISA para determinar su especificidad, es decir, su unión a proteína E de VNO, VNO completamente inactivado y partículas similares a VNO, todos purificados tal como se describió anteriormente. Para este fin, se recubrieron VNO inactivado completo, la proteína E de VNO, o partículas similares a VNO en placas de ELISA Maxisorp™. Además, se recubrió virus de la rabia inactivado completo sobre las placas como control. Tras el recubrimiento, se bloquearon las placas en PBS que contenía Protifar al 1% durante 1 hora a temperatura ambiente. Se incubaron los anticuerpos en fagos de cadena sencilla seleccionados durante 15 minutos en un volumen igual de PBS que contenía Protifar al 1% para obtener anticuerpos en fagos bloqueados. Se vaciaron las placas y se añadieron los anticuerpos en fagos de cadena sencilla bloqueados a los pocillos. Se dejó que la incubación continuara durante una hora, se lavaron las placas en PBS que contenía Tween-20 al 0,1% v/v y se detectaron los anticuerpos en fagos unidos (usando medición de la DO a 492 nm) usando un anticuerpo anti-M13 conjugado con peroxidasa. Como control, se realizó el procedimiento de manera simultánea sin anticuerpo en fago de cadena sencilla, con un anticuerpo en fago de cadena sencilla de control negativo dirigido contra la glicoproteína del virus de la rabia (anticuerpo denominado SC02-447), con un anticuerpo en fago de cadena sencilla de control negativo dirigido contra SARS-CoV (anticuerpo denominado SC03-014) y un anticuerpo en fago de cadena sencilla de control positivo dirigido contra el virus de la rabia. Tal como se muestra en la tabla 7, los anticuerpos en fagos seleccionados denominados SC04-348 y SC04-354 presentaban una unión significativa a partículas similares a VNO

5 y VNO inactivado completo inmovilizados. Se seleccionaron ambos anticuerpos en fagos de cadena sencilla cuando se usaron partículas similares a VNO en la primera y segunda ronda de selección. Cuando se realizó el ELISA con proteína E de VNO soluble purificada expresada de manera recombinante preparada tal como se describió anteriormente o virus de la rabia, los anticuerpos en fagos de cadena sencilla SC04-348 y SC04-354 no se unían, lo que sugiere que o bien se unen a una región no presente en la proteína E soluble truncada, se unen a una proteína no relacionada en la superficie del virión, no se unen a la forma monomérica de la proteína E o bien no se unen debido al formato de anticuerpo en fago.

Ejemplo 4

Caracterización de los scFv específicos de VNO

10 A partir de los clones de anticuerpos en fagos de cadena sencilla específicos seleccionados (scFv) se obtuvo ADN de plásmido y se determinaron secuencias de nucleótidos según técnicas convencionales. Las secuencias de nucleótidos de los scFv (incluyendo sitios de restricción para la clonación) denominados SC04-348 y SC04-354 se muestran en SEQ ID NO:25 y SEQ ID NO:27, respectivamente. Las secuencia de aminoácidos de los scFv denominados SC04-348 y SC04-354 se muestran en SEQ ID NO:26 y SEQ ID NO: 28, respectivamente.

15 La identidad de genes de VH y VL (véase Tomlinson IM, Williams SC, Ignatovitch O, Corbett SJ, Winter G. V-BASE Sequence Directory. Cambridge United Kingdom: MRC Centre for Protein Engineering (1997)) y secuencias de CDR3 de cadena pesada de los scFv que se unen específicamente a VNO se representan en la tabla 8. La tabla 9 muestra las otras regiones CDR de los scFv específicos de VNO.

Ejemplo 5

20 *Construcción de moléculas de inmunoglobulina totalmente humanas (anticuerpos anti-VNO monoclonales humanos) a partir de los Fv de cadena sencilla anti-VNO seleccionados*

25 Se amplificaron por PCR regiones variables de cadena pesada y ligera del scFv denominado SC04-354 usando oligonucleótidos para adjuntar sitios de restricción y/o secuencias para la expresión en los vectores de expresión de IgG pSyn-C18-HC γ 1 (véase SEQ ID No:47) y pSyn-C04-C λ (véase SEQ ID No:48). Se clonó la región variable de cadena pesada del scFv denominado SC04-354 en el vector pSyn-C18-HC γ 1; se clonó la región variable de cadena ligera del scFv denominado SC04-354 en el vector pSyn-C04-C λ . Se amplificó en primer lugar el gen lambda de VL usando el siguiente conjunto de oligonucleótidos: SC04-354, 5LC (SEQ ID NO:49) y sy3L-Cmod (SEQ ID NO:50) y se clonó el producto de PCR en el vector pSyn-C04-C λ . Se verificó la secuencia de nucleótidos para la construcción según técnicas convencionales conocidas por el experto en la técnica. Se amplificó en primer lugar el gen VH usando el siguiente conjunto de oligonucleótidos: SC04-354, 5H-A (SEQ ID NO:51) y sy3H-A (SEQ ID NO:52). Después de eso, se clonó el producto de PCR en el vector pSyn-C18-HC γ 1 y se verificó la secuencia de nucleótidos según técnicas convencionales conocidas por el experto en la técnica.

35 Se clonó directamente la región variable de cadena ligera y pesada del scFv denominado SC04-348 mediante digestión por restricción para su expresión en los vectores de expresión de IgG plg-C911-HCgamma1 (véase SEQ ID NO:53) y plg-C909-Ckappa (véase SEQ ID NO:54). Se clonaron las regiones variables de cadena pesada del scFv denominado SC04-348 en el vector plg-C911-HCgamma1 mediante digestión por restricción usando las enzimas Sfil y XhoI y se clonó la región variable de cadena ligera del scFv denominado SC04-348 en el vector plg-C909-Ckappa mediante digestión por restricción usando las enzimas Sall y NotI. Después de eso, se verificó la secuencia de nucleótidos según técnicas convencionales conocidas por el experto en la técnica.

40 Las construcciones de expresión resultantes pgG104-348C911 y pgG104-354C18 que codifican las cadenas pesadas de IgG1 humana y pgG104-348C909 y pgG104-354C04 que codifican las cadenas ligeras de IgG1 humana se expresaron de manera transitoria en combinación en células 293T y se obtuvieron sobrenadantes que contenían anticuerpos de IgG1 humana. Las secuencias de nucleótidos de las cadenas pesadas de los anticuerpos denominados CR4348 y CR4354 se muestran en SEQ ID Nos 29 y 31, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas de los anticuerpos denominados CR4348 y CR4354 se muestran en SEQ ID NOs 30 y 32, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos de la cadena ligera de los anticuerpos CR4348 y CR4354 se muestran en SEQ ID NOs 33 y 35, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera de los anticuerpos CR4348 y CR4354 se muestran en SEQ ID NOs 34 y 36, respectivamente. Un experto en la técnica puede determinar las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos anteriores según Kabat *et al.* (1991) tal como se describe en Sequences of Proteins of Immunological Interest. Alternativamente, se produjeron lotes de más de 1 mg de cada anticuerpo y se purificaron usando procedimientos convencionales. Se titularon entonces los anticuerpos en una concentración fijada de virus del Nilo occidental irradiado y se sometieron a prueba en ELISA tal como se describió anteriormente. Los resultados se muestran en la tabla 10. Como control negativo, se usó un anticuerpo anti-virus de la rabia. Ambos anticuerpos mostraron unión al virus de una manera dependiente de la dosis. Los anticuerpos podían unirse también a partículas similares a VNO (datos no mostrados).

Adicionalmente, se sometió a prueba la unión de CR4348 y CR4354L4328 (una variante optimizada del anticuerpo CR4354; véase el ejemplo 8 para la selección de esta variante) a material viral en un ELISA de captura. Para este

fin, se recubrieron CR4348, CR4283 (un anticuerpo monoclonal anti-VNO; control positivo para el VNO inactivado y partícula similar a VNO y control negativo para el virus de la rabia), CR4354L4328 y CR4104 (un anticuerpo monoclonal anti-virus de la rabia; control positivo para el virus de la rabia y control negativo para el VNO inactivado y partícula similar a VNO) en una concentración de 5 mg/ml en placas de ELISA Maxisorp™. Tras el recubrimiento, se bloquearon las placas en PBS que contenía Protifar al 1% durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se realizó una dilución en serie de VNO inactivado completo, partículas similares a VNO, o virus de la rabia (inactivado con BPL) en PBS/protifar en un volumen de 100 ml hasta que se alcanzó una dilución de 1/2048. Se dejó incubarse el material viral durante 1 hora a temperatura ambiente. Se vaciaron las placas y se lavaron 3 veces con 100 µl de PBS que contenía Tween-20 al 0,1% v/v. A continuación, se añadió el anticuerpo monoclonal de ratón 7H2 (Bioreliance) a una concentración de 1 mg/ml (diluido en PBS/protifar) para la detección del VNO inactivado y las partículas similares a VNO. Además, se añadió el anticuerpo monoclonal de ratón 1112 dirigido contra el virus de la rabia en una dilución 1:1000 (diluido en PBS/protifar) para la detección del virus de la rabia. Se detectaron anticuerpos monoclonales unidos mediante medición de la DO a 492 nm con un anticuerpo anti-ratón conjugado con peroxidasa (Jackson) en una dilución 1:2000 en PBS/protifar. CR4348, CR4283 y CR4354L4328 mostraron una unión muy alta a partículas similares a VNO uniéndose CR4348 con una eficacia doble en comparación con CR4354L4328 (datos no mostrados). Además, CR4348, CR4283 y CR4354L432B se unieron también a VNO (datos no mostrados). Cuando se realizó el ELISA de captura con virus de la rabia, se observó unión con el control positivo CR4104 y el anticuerpo CR4348. No se observó unión del anticuerpo CR4354L4328 (datos no mostrados).

Ejemplo 6

20 *Neutralización in vitro de VNO mediante scFv e IgG específicos de VNO (ensayo de neutralización de virus)*

Con el fin de determinar si los scFv seleccionados podían bloquear la infección por VNO, se realizaron ensayos de neutralización *in vitro* (VNA). Los VNA se realizaron en células Vero (ATCC CCL 81). Se diluye la cepa de VNO 385-99 que se usa en el ensayo hasta un título de 4×10^3 TCID₅₀/ml (dosis infectiva en cultivo tisular del 50% por ml), calculándose el título según el método de Spearman y Kaerber. Se realizan diluciones de 2 veces en serie de las preparaciones de scFv en PBS comenzando a partir de 1:2 (1:2 - 1:1024). Se mezclan 25 µl de la dilución de scFv respectiva con 25 µl de suspensión de virus (100 TCID₅₀/25 µl) y se incuban durante una hora a 37°C. Se pipetea entonces la suspensión dos veces por triplicado en placas de 96 pocillos. A continuación, se añaden 50 µl de una suspensión recién tripsinizada y homogénea de células Vero (división 1:3 de la monocapa de células confluentes de un matraz T75) resuspendidas en DMEM con suero de ternero fetal al 10% v/v y antibióticos. Se cultivan las células inculadas durante 3-4 días a 37°C y se observan diariamente para detectar el desarrollo de efecto citopático (CPE). Se compara el CPE con el control positivo (células inoculadas con VNO) y controles negativos (células inoculadas de manera simulada o células incubadas con scFv sólo). La ausencia completa de CPE en un cultivo celular individual se define como protección (= reducción del título del 100%). La dilución del suero que proporciona protección en el 50% de los pocillos (es decir, tres de seis pocillos) se define como el título de anticuerpos neutralizantes del 50%. Se usa el anticuerpo neutralizante murino 7H2 (Bioreliance) como control positivo en el ensayo. Un título de neutralización del 50% de $\leq 1:4$ (lo que significa que el anticuerpo está diluido 4 veces o más) se considera como una prueba específica de actividad neutralizante del scFv frente a VNO.

Alternativamente, se realizaron ensayos de neutralización *in vitro* (VNA) con el fin de determinar si las IgG anti-VNO podían bloquear la infección por VNO. Los VNA se realizaron esencialmente tal como se describió para scFv, con la condición de que la dilución del suero que proporciona protección en el 66% de los pocillos (es decir, dos de tres pocillos) se definió como el título de anticuerpos neutralizantes del 66% y un título de neutralización del 66% de $\leq 1:2$ se consideró como una prueba específica de la actividad neutralizante de la IgG frente a VNO.

Se expresaron sobrenadantes que contenían los anticuerpos anti-VNO denominados CR4348 y CR354 tal como se describió en el ejemplo 5 y se sometieron a los VNA descritos anteriormente. Todos los anticuerpos tenían un título neutralizante $\leq 1:2$. La potencia de los anticuerpos (en µg/ml) se facilita en la tabla 11.

Ejemplo 7

Protección in vivo mediante anticuerpos monoclonales frente a la infección mortal por VNO en un modelo de exposición murino

Se adaptó un modelo de exposición murino de la bibliografía (véase Ben-Nathan *et al.* 2003; Beasley *et al.* 2002; Wang *et al.* 2001). En Ben-Nathan *et al.* (2003) se usaron ratones BALB/c de 4 semanas de edad y a los animales se les inoculó por vía intraperitoneal (i.p.) 20 veces la dosis viral que daba como resultado una supervivencia del 50% (DL₅₀) de la cepa ISR52 de VNO (la DL₅₀ era equivalente a 5 ufp). Con esta dosificación, los ratones sucumbieron a la infección 6-7 días tras la inoculación y alcanzaron el 100% de mortalidad tras 11 días. En otro estudio, se mostró que la cepa USA99 de VNO (usada en los experimentos descritos en el presente documento) tenía una DL₅₀ de 0,5 ufp. Esto es 10 veces inferior a la DL₅₀ de ISR52, lo que puede indicar un grado superior de neuroinvasividad para esta cepa viral o diferencias asociadas con la cepa de ratón usada (véase Beasley *et al.* 2002).

Para determinar la DL₅₀ i.p. de USA99 en ratones BALB/c de 4 semanas de edad, se les inyectó a los animales (5

por grupo) USA99 a TCID₅₀ (dosis infecciosa en cultivo tisular) de 100, 30, 10, 3, 1, 0,3, 0,1, 0,03 el 50% en dos experimentos separados. La DL₅₀ calculada a partir de este primer experimento fue de 5,75 TCID₅₀ y a partir del segundo experimento 13,25 TCID₅₀. Para el cálculo de la dosis viral en experimentos adicionales, se calculó el promedio de los dos experimentos, es decir, 9,5 TCID₅₀, mediante análisis de regresión Probit.

5 Se sometió a prueba la capacidad protectora de los anticuerpos neutralizantes *in vitro* CR4348 y CR4354 en el modelo *in vivo*. Se inyectaron anticuerpos purificados por vía i.p. en ratones BALB/c de 4 semanas de edad (5 animales por grupo) a una concentración de 15 mg/kg. Tras 24 horas, se inyectó la cepa USA99 de VNO por vía i.p. a una dosis de 20 veces la DL₅₀ calculada. Se observaron los animales para detectar signos de enfermedad a lo largo de 21 días y se sacrificaron cuando eran evidentes síntomas de encefalitis. En el modelo, los animales no protegidos sucumbieron generalmente a la infección entre el día 8 y el día 10.

La tabla 12 muestra que los dos anticuerpos, CR4348 y CR4354, son protectores al 100% *in vivo* a la dosis de 15 mg/kg. El anticuerpo control positivo 7H2 (un anticuerpo monoclonal murino anti-VNO) era totalmente protector y el anticuerpo control negativo (que se une a un antígeno irrelevante) no mostró protección en el experimento.

15 Para establecer una relación de dosis-protección, se tituló el anticuerpo protector CR4348 en el modelo de ratón usando dosis de 10, 3, 1, 0,3, 0,1, 0,03, 0,01, 0,003 y 0,001 mg/kg. Usando las mismas dosis, se tituló en el modelo de ratón una variante optimizada del anticuerpo CR4354, es decir CR4354L4328 (véase el ejemplo 8 para la selección de esta variante). Se incluyó un anticuerpo control negativo que se une a un antígeno irrelevante como control a una dosis de 10 mg/kg.

20 La figura 1 muestra que el anticuerpo CR4354L4328 es protector al 100% a una dosis de 0,03 mg/kg. Las dosis de 10, 3, 1, 0,3 y 0,1 mg/kg eran también protectoras al 100% (datos no mostrados). La figura 1 también muestra que hay una correlación directa entre la dosis y la capacidad protectora. La dosis protectora al 50% calculada mediante análisis de regresión Probit es de 0,003 mg/kg.

25 La figura 2 muestra que el anticuerpo CR4348 es protector al 100% a una dosis de 0,1 mg/kg. Las dosis de 10, 3, 1 y 0,3 mg/kg eran también protectoras al 100% (datos no mostrados). La figura 2 muestra además que hay una correlación directa entre la dosis y la capacidad protectora. La dosis protectora al 50% calculada mediante análisis de regresión Probit es de 0,006 mg/kg.

30 Se compararon los datos de titulación de los anticuerpos mediante análisis de regresión Probit. Los valores para la prueba de bondad de ajuste de Pearson (Chi cuadrado = 10,38, DF = 30, p = 1,00) demostraron que el modelo era válido y los resultados de la prueba de paralelismo (Chi cuadrado = 3,47, DF = 3, p = 0,324) significaban que las curvas podían compararse de manera fiable. Los valores para la dosis protectora al 50% y la dosis protectora al 95% se resumen en la tabla 13.

Ejemplo 8

Selección de variantes optimizadas del anticuerpo monoclonal neutralizante CR4354

35 Se seleccionó el anticuerpo monoclonal CR4354 que se mostró que tenía actividad neutralizante de VNO *in vitro* y que era protector al 100% *in vivo* para mejorar su potencia y afinidad. Se realizó esto basándose en la siguiente hipótesis. La especificidad de CR4354 (tal como se determina mediante la región CDR3 en la cadena variable de cadena pesada) es una que selecciona como diana un potente epítopo neutralizante de VNO, pero la cadena ligera que se aparea aleatoriamente con la cadena pesada (a través del proceso de presentación en fagos) no recrea de manera óptima el sitio de unión a antígeno original. El apareamiento con una cadena ligera mutada de manera más óptima podría mejorar el “ajuste” del bolsillo de unión a anticuerpo para el antígeno relacionado. Por tanto, la sustitución de la cadena ligera podría ser un modo de mejorar la potencia y afinidad del anticuerpo.

40 El análisis de la cadena pesada y ligera del anticuerpo CR4354 mostró que pertenecen a la familia génica VH1 1-46 (DP-7) y Vlambda1 (1c-V1-16), respectivamente. Análisis adicionales de scFv específicos de VNO seleccionados a partir de la biblioteca inmunitaria de VNO tal como se describió en el ejemplo 1 revelaron 5 scFv, es decir SC04-261, SC04-267, SC04-328, SC04-335 y SC04-383 (estos scFv no se incluyeron en la tabla 8), que tenían cadenas ligeras que tenían la misma familia génica que la cadena ligera de CR4354. Ninguno de los scFv o sus IgG respectivas mostraron actividad neutralizante de VNO. Cada una de estas cadenas ligeras contenía mutaciones en las regiones CDR y de entramado lejos de la línea germinal lo que indica que se habían modificado como parte del proceso de maduración por afinidad natural.

50 En resumen, la construcción de los anticuerpos fue tal como sigue. Se preparó CR4354 tal como se describió en el ejemplo 5. Se amplificaron por PCR las regiones variables de cadena pesada de los scFv denominados SC04-261, SC04-267, SC04-328 y SC04-335 usando oligonucleótidos para adjuntar sitios de restricción y/o secuencias para la expresión en el vector de expresión de IgG pSyn-C18-HCγ1 y se clonaron en este vector. Se realizó la amplificación usando los siguientes conjuntos de oligonucleótidos: SC04-261, 5HA (SEQ ID NO:51) y sy3H-A (SEQ ID NO:52); SC04-267, 5H-A (SEQ ID NO:51) y sy3H-C (SEQ ID NO:55); SC04-328, 5H-A (SEQ ID NO:51) y sy3HA (SEQ ID NO:52); y SC04-335, 5H-C (SEQ ID NO:56) y sy3H-A (SEQ ID NO:52).

Se clonó la región variable de cadena pesada del scFv denominado SC04-383 mediante digestión por restricción usando las enzimas Sfil y XhoI en el vector de expresión de IgG plg-C911-HCgamma1.

5 Se amplificó en primer lugar la región variable de cadena ligera del scFv denominado SC04-267 usando los oligonucleótidos SC04-267, 5L-C (SEQ ID NO:49) y sy3L-Amod (SEQ ID NO:57) y se clonó el producto de PCR en el vector pSyn-C04-Clambda.

Se clonaron las regiones variables de cadena ligera de los scFv denominados SC04-261, SC04-328, SC04-335 y SC04-383 directamente mediante digestión por restricción usando las enzimas Sall y NotI para la expresión en el vector de expresión de IgG plg-C910-Clambda (SEQ ID NO:58).

10 Se verificaron las secuencias de nucleótidos para todas las construcciones según técnicas convencionales conocidas por el experto en la técnica.

15 Las construcciones de expresión resultantes pgG104-261C18, pgG104-267C18, pgG104-328C18, pgG104-335C18 y pgG104-383C911 que codifican las cadenas pesadas de IgG1 humana anti-VNO y pgG104-261C910, pgG104-267C04, pgG104-328C910, pgG104-335C910 y pgG104-383C910 que codifican las cadenas ligeras de IgG1 humana anti-VNO se expresaron de manera transitoria en combinación en células 293T y se obtuvieron sobrenadantes que contenían anticuerpos de IgG1 humana.

20 Las secuencias de nucleótidos de las cadenas pesadas de los anticuerpos denominados CR4261, CR4267, CR4328, CR4335, CR4354 y CR4383 se muestran en SEQ ID NOs:59, 61, 63, 65, 31 y 67, respectivamente (las regiones variables son desde los nucleótidos 1-348; 1-381; 1-348; 1-351; 1-363; y 1-372, respectivamente). Las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas de los anticuerpos denominados CR4261, CR4267, CR4328, CR4335, CR4354 y CR4383 se muestran en SEQ ID Nos:60, 62, 64, 66, 32 y 68, respectivamente (las regiones variables son desde los aminoácidos 1-116; 1-127; 1-116; 1-117; 1-121; y 1-124, respectivamente). Las secuencias de nucleótidos de la cadena ligera de los anticuerpos CR4261, CR4267, CR4328, CR4335, CR4354 y CR438 se muestran en SEQ ID NOs: 69, 71, 73, 75, 35 y 77, respectivamente (las regiones variables son desde los nucleótidos 1-342; 1-330; 1-339; 1-339; 1-330; y 1-339, respectivamente). Las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera de los anticuerpos CR4261, CR4267, CR4328, CR4335, CR4354 y CR4383 se muestran en SEQ ID NOs: 70, 72, 74, 76, 36 y 78, respectivamente (las regiones variables son desde los aminoácidos 1-114; 1-110; 1-113; 1-113; 1-110; y 1-113, respectivamente).

30 Se combinó la construcción de expresión que codifica la cadena pesada de CR4354 con las construcciones que expresan las cadenas ligeras de los respectivos anticuerpos para la transfección de células HEK293T esencialmente tal como se describió en el ejemplo 5. Los anticuerpos obtenidos se designaron CR4354L4261, CR4354L4267, CR4354L4328, CR4354L4335 y CR4354L4383. Se sometieron a prueba los sobrenadantes para detectar la unión mediante tinción con ELISA tal como se describió en el ejemplo 5 y para determinar la potencia en el ensayo de neutralización *in vitro* tal como se describió en el ejemplo 6.

35 Los datos de unión mostraban que todas las variantes intercambiadas tenían especificidad por el antígeno preseleccionado (véase la figura 3).

En cuanto a la actividad funcional, se concluyó que dos variantes con cadena intercambiada CR4354L4328 y CR4354L4335 tenían una afinidad superior por VNO en comparación con CR4354. CR4354L4261 se unía al virus con una afinidad similar en comparación con CR4354, mientras que tanto CR4354L4383 como CR4354L4267 se unían con una afinidad inferior al virus en comparación con CR4354 (véase la figura 3).

40 Además, los anticuerpos CR4354L4383 y CR4354L4267 no mostraron ninguna actividad neutralizante de VNO, lo que concordaba con su afinidad de unión inferior. CR4354L4261 tenía una concentración de punto final de neutralización similar al anticuerpo original CR4534, que concordaba de nuevo con los datos de unión. CR4354L4335 que se unía a VNO con una afinidad superior en comparación con CR4354 tenía una actividad neutralizante inferior en comparación con el anticuerpo original CR4534. En cambio, la variante de anticuerpo CR4354L4328 que tenía una afinidad superior por VNO en comparación con CR4354 tenía también una actividad neutralizante superior en comparación con el anticuerpo original CR4534 (véase la tabla 14). En 4 de 5 casos, había una correlación directa entre la afinidad de unión y la potencia de neutralización de las variantes. Se demostró que la sustitución de cadenas ligeras similares puede mejorar una funcionalidad de interés de un anticuerpo, por ejemplo afinidad o actividad neutralizante.

50 Además, se convirtió CR4354 en un formato de IgM totalmente humana eliminando la región Fc gamma de la construcción pgG104-354C18 mediante digestión por restricción con las endonucleasas NheI y XbaI. Se digirió el vector pCR-IgM (SEQ ID NO:146) que contenía una región Fc mu con las mismas enzimas de restricción y se ligó la región Fc mu obtenida en el vector pgG104-354C18 y se fusionó en marco con el gen de cadena pesada variable derivado de SC04-354 para preparar el vector pgM104-354C899. Este constructo se expresó de manera transitoria en combinación junto con la construcción de cadena ligera pgG104-354C04 (véase anteriormente) en células 293T y se obtuvieron sobrenadantes que contenían anticuerpos de IgM humana. La secuencia de nucleótidos del vector pgM104-354CB99 se muestra en SEQ ID NO:147. La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo denominado CRM4354 se muestra en SEQ ID NO:148. Se purificó el anticuerpo de IgM del sobrenadante

añadiendo sulfato de amonio hasta una concentración final de 2,4 M e incubando la mezcla durante la noche en hielo, con agitación. Se recuperó la IgM precipitada mediante centrifugación a 10.395xg durante 30 minutos. Se resuspendió el sedimento en PBS y se purificó adicionalmente mediante filtración en gel. Se cargó una columna de calidad de preparación HiLoad 26/60 Superdex 200 (GE healthcare) equilibrada con PBS con la IgM resuspendida y se recogieron fracciones de la columna, mientras que se lavaba bajo una velocidad de flujo constante con PBS. Se recogió el primer pico de elución principal, que contenía la IgM purificada. Se confirmó la actividad de unión del anticuerpo mediante titulación en partículas similares a virus del Nilo occidental (VLP) (datos no mostrados).

Ejemplo 9

10 *Potencia de neutralización in vitro determinada mediante prueba de neutralización por reducción en placa (PRNT)*

Para investigar adicionalmente la actividad neutralizante de los anticuerpos de la invención, se desarrolló una PRNT. En resumen, se tripsinizaron y se realizó un recuento de células Vero-E6. Se añadieron $2,5 \times 10^5$ células a cada pocillo de una placa de 12 pocillos y se incubaron durante la noche a 37°C en un incubador de CO₂ humidificado. Se realizaron diluciones en serie (10 veces) de una disolución madre titulada de virus del Nilo occidental USA99b en medio completo. Se incubaron mezclas de igual volumen (250 µl) de virus (100 ufp) y diluciones en serie de anticuerpos IgG1 purificados por duplicado a 37°C durante 1 hora. Se realizaron diluciones tanto de virus como de anticuerpos en medio DMEM. Entonces se añadió la mezcla (400 µl) a las placas de 12 pocillos que contenían monocapas de células Vero tras cuidadosa aspiración del medio durante la noche. Tras incubar las placas a 37°C durante 1 hora, se añadió por pocillo un recubrimiento de 1,5 ml de medio de carboximetilcelulosa CMC con 10% de FBS (v/v) (medio CMC:completo) y se colocaron las placas en un incubador de CO₂ humidificado durante 3 días a 37°C. Un día antes de la tinción se retiró el medio CMC:completo de los pocillos y se sustituyó con una mezcla de CMC:PBS (1:1; v/v) que contenía rojo neutro 8,25 mg/ml (2 ml de rojo neutro a 3,3 g/l en 80 ml de CMC:PBS). Se incubaron las placas 1 día más a 37°C en un incubador de CO₂ humidificado, tras lo que se cuantificó el número de placas visibles.

Para analizar los datos de potencia de los anticuerpos a partir de la PRNT, se usó un modelo de regresión binaria conocido como análisis Probit. El análisis Probit es válido, si puede suponerse que la probabilidad de neutralizar el VNO *in vitro* sigue una distribución normal con respecto a la cantidad de anticuerpos usados. La suposición de normalidad sigue lo más probablemente una escala logarítmica, puesto que la neutralización del virus se modeló como una función del logaritmo de la cantidad de anticuerpos administrados. Se compararon los anticuerpos directamente en el modelo de regresión, con un nivel de significación alfa fijado a 0,05. Las concentraciones de anticuerpos que producían una neutralización del 50% y el 90% se estimaron a partir del modelo, junto con los intervalos de confianza del 95%. En la tabla 15 se facilita un resumen del análisis final de los anticuerpos. Al convertir CR4354 en formato de IgM (CRM4354) se aumentó espectacularmente la potencia *in vitro* (véase la tabla 15).

Usando el ensayo descrito anteriormente, se sometieron a prueba los anticuerpos para determinar su potencia de neutralización frente a otros flavivirus incluyendo el virus de la fiebre amarilla, el virus de la encefalitis japonesa, el virus de la encefalitis de San Luis y el virus del Dengue 2. En la figura 4 se muestra que CR4348 tenía una actividad neutralizante significativa contra el virus de la encefalitis de San Luis y el virus del Dengue 2.

Ejemplo 10

40 *Identificación de los antígenos diana de CR4348 y CR4354L4328*

Para identificar los antígenos diana de los anticuerpos CR4348 y CR4354L4328, se examinó una biblioteca de expresión de proteínas de cerebro fetal humano con los anticuerpos. Se construyó la biblioteca de ADNc en el vector de expresión bacteriano pQE-30 (Qiagen) para la expresión inducible por IPTG de proteínas de fusión con cola de (His)₆. La biblioteca estaba compuesta por 38.016 clones con un inserto promedio de 1500 pb y se imprimieron por duplicado en las membranas. Para identificar los antígenos diana, se sometieron a análisis de micromatriz de proteínas los antígenos CR4348, CR4354L4328 y un anticuerpo control negativo (CR4374) (RZPD (Heidelberg, Alemania)). Se realizaron dos experimentos independientes con los anticuerpos. Las matrices de proteínas se incubaron con el anticuerpo primario y la unión se detectó con un anticuerpo secundario anti-ser humano conjugado. Los clones se consideraron positivos si aparecían manchas por duplicado que no estaban presentes con el anticuerpo secundario solo. El control negativo no mostró ninguna reactividad, mientras que 5 clones diferentes reaccionaron con CR4348 y 4 clones diferentes con CR4354L4328. Los clones reactivos se secuenciaron y se usaron para la búsqueda en base de datos en la base de datos del NCBI usando el programa BLAST nucleótido a nucleótido. La identidad de los clones se representa en la tabla 16.

Para confirmar los datos de la matriz de proteínas obtenida con CR4348 y CR4354L4328, se expresaron los diferentes clones de ADNc. Los 9 clones diferentes y un clon bacteriano que expresaba la proteína E de VNO se sembraron en estrías en una placa de agar y se hicieron crecer durante la noche a 37°C. A continuación, se inocularon volúmenes de 10 ml de LB con los nueve clones diferentes y el clon control de la proteína E de VNO. Las bacterias se hicieron crecer durante la noche a 37°C. Al día siguiente se diluyeron los cultivos 1:50 y se hicieron

crecer hasta que se alcanzó una DO a 600 nm de 0,6, posteriormente se indujo la expresión de la proteína añadiendo IPTG y se recogieron las células tras 4 horas de inducción en tres porciones de 1 ml. A continuación, se sometió cada porción a un procedimiento de extracción diferente que permitió la extracción de proteínas solubles y no solubles. El clon de proteína E de VNO se incluyó como control positivo en la prueba, puesto que esta proteína se expresa como una proteína soluble y por tanto está presente en los tres procedimientos de extracción. Todos los métodos comenzaron con un ciclo de tres congelaciones-descongelaciones del sedimento. En el primer método, se extrajo el sedimento en un volumen el doble del volumen del sedimento celular en un tampón de extracción suave (Na_2HPO_4 50 mM, NaCl 300 mM, tampón Tween-20 al 0,05% con lisozima 1 mg/ml) mediante la incubación del sedimento celular durante 30 minutos en hielo, a continuación se sedimentaron las células y se almacenó el sobrenadante para su análisis (fracción 1). Posteriormente, se extrajo el sedimento con un tampón más riguroso (DOC al 0,2% - Triton X-100 al 1%) y se resuspendió en un volumen el doble del volumen del sedimento celular. Tras un periodo de incubación de 30 minutos en hielo, se sedimentaron las células y se almacenó el sobrenadante para su análisis (fracción 2). En el segundo método (una adaptación del procedimiento de inmunotransferencia de colonias), se lisó el sedimento mediante la adición de SDS al 10% (el doble del volumen del sedimento celular). Tras 10 minutos de incubación a temperatura ambiente, se desnaturalizó la suspensión con un volumen igual de NaOH 5 M que contenía NaCl 1,5 M durante 5 minutos a temperatura ambiente. Mediante la adición de un volumen igual de NaCl 1,5 M, Tris 0,5 M pH 7,4 se neutralizó la suspensión. A continuación, se sedimentaron los restos celulares y se almacenó el sobrenadante para su análisis (fracción 3). En el tercer método se solubilizaron cuerpos de inclusión y se extrajo el sedimento mediante la adición de urea 8 M en Tris/HCl 100 mM, Na_2HPO_4 100 mM en un volumen el doble del volumen del sedimento celular. Tras 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, se sedimentaron los restos celulares y se almacenó el sobrenadante para su análisis (fracción 4). Las proteínas extraídas con cada procedimiento se colocaron en un filtro de nitrocelulosa. Además, se colocaron los controles, es decir la proteína E de VNO purificada (control negativo) y la IgG humana (control positivo). Se bloquearon las membranas durante la noche con un 4% de leche en polvo al 4% en TBST a 4°C. Posteriormente, se incubaron las inmunotransferencias con 5 µg/ml de CR4348, CR4354L4328 o el anticuerpo monoclonal 7H2 anti-proteína E de VNO murino. El anticuerpo usado para la detección de la proteína E de VNO reconoce un epítipo lineal y todavía reacciona con la proteína recombinante tras el tratamiento con reactivos desnaturalizantes como urea 8 M (método 3). Tras un periodo de incubación de 1 hora a temperatura ambiente en un incubador giratorio, se lavaron las membranas tres veces durante cinco minutos con TBST. La unión de los anticuerpos se detectó con anticuerpos de cabra anti-ratón (DAKO) o de cabra anti-ser humano conjugados con HRP (Pharmingen). Finalmente, las membranas se lavaron exhaustivamente en TBST seguido por una etapa de lavado con PBS. Las proteínas reactivas se revelaron mediante el sistema de detección quimiofluorescente ECL (Amersham).

CR4348 reaccionó con las fracciones 1, 2 y 3 del clon de expresión de FAF-1 (datos no mostrados). CR4354L4328 reaccionó únicamente con la fracción 3 del clon de expresión de la NADH deshidrogenasa flavoproteína 1 (NDUFV1) (datos no mostrados). Esto indica que ambos anticuerpos reaccionan con un único clon de expresión. Además se concluyó que ambos anticuerpos reconocen un epítipo conformacional, puesto que no reaccionaron con la proteína extraída usando urea 8 M, mientras que los anticuerpos anti-VNO que reconocen un epítipo lineal sí reaccionaron con la proteína extraída usando este procedimiento (datos no mostrados). En conclusión, CR4348 reconoce un epítipo presente en la proteína FAF-1, mientras que CR4354L4328 reconoce un epítipo presente en la proteína NDUFV-1.

Para confirmar la identificación de NDUFV-1 como el antígeno diana reconocido por CR4354L4328, se extrajo ARNm de 2×10^7 células 293T usando el kit de mini-purificación de ARNm NucleoTrap (Beckton Dickinson) según protocolos proporcionados por el fabricante. Se realizó RT-PCR en el ARNm aislado. Para el procedimiento de PCR, se diseñaron los siguientes cebadores: cebador directo 5'-ATGAAGGTGACAGCGTGAGGTGAC-3' (SEQ ID NO:160) y cebador inverso 5'-ACATGGATAGACGCAGGACAGCAG-3' (SEQ ID NO:161). Se realizó la PCR con Pfu (Promega) en presencia de DMSO al 5% y dio como resultado un producto de 1500 pb. Se clonó el fragmento resultante en el vector pCR4TOPO (Invitrogen) y se transformó en células DH5 α . El clon resultante, TOPONDUFV1, se verificó mediante análisis de secuencia y se alineó con la secuencia presente en la base de datos. Para simplificar la detección de la proteína en los experimentos de transfección posteriores, se fusionó la proteína con un marcador myc en el extremo 5' del cebador por medio de PCR (usando la construcción como molde). Para la construcción 5'myc se diseñaron los siguientes cebadores: cebador directo 5'-AAGCTTAGCATGGAACAAAACTTATTTCTGAAGAAGATCTGCTGGCAACACG GCGGCTGCTCGGCTG-3'(SEQ ID NO:162) y cebador inverso 5'-GATATCCTTTATTGTCCAGCATTCCAC-3' (SEQ ID NO:163). Se realizó la PCR usando Pfu polimerasa y el fragmento resultante del marcador 5'myc se clonó en PCRblunt4-TOPO, y posteriormente se digirió con HindIII-EcoRV. Se clonó el fragmento resultante en los sitios correspondientes de pADNc3,1/zeo (Invitrogen) dando como resultado la construcción mycNDUFV-1. La construcción se verificó mediante secuenciación. Todos los procedimientos de clonación se realizaron según técnicas moleculares convencionales. Se sembraron 3×10^5 células 293T en matraces T175 y se sometieron a un procedimiento de transfección tras 72 horas. La construcción de expresión mycNDUFV-1 y un constructo control positivo ATAD3Amyc se lisaron las células en tampón DOC (Triton X-100 al 1% y desoxicolato al 0,5% p/v en tampón fosfato 0,2 M que contenía NaCl 0,12 M, pH 7,4 e inhibidores de proteasa (Sigma)). Se eliminó el material insoluble mediante centrifugación durante 30 minutos a 4°C a 20.000*g. A continuación, se analizaron los lisados de las células transfectadas para determinar la cantidad de proteína marcada con myc expresada. Después, se despejó

5 previamente el lisado con perlas de proteína A (Amersham) durante 2 horas a 4°C. Mientras, se acoplaron 4 µg de CR4354L4328, anticuerpo control CR4374 (control negativo, anticuerpo dirigido contra la proteína E de VNO) y anticuerpo control CR2361 IgG1 (control positivo; anticuerpo dirigido contra ATAD3A) a perlas de proteína A a temperatura ambiente. A continuación, se incubaron las muestras despejadas previamente con las IgG acopladas a las perlas durante 2 horas a 4°C. Las perlas de proteína A se lavaron tres veces durante 5 minutos con 1 ml de tampón de lisis DOC y los complejos unidos se eluyeron mediante la adición de tampón de carga de muestra. Las muestras se sometieron a SDS-PAGE en condiciones no reductoras. Tras la inmunotransferencia en membranas de PVDF, se detectaron las proteínas marcadas con myc con el anticuerpo monoclonal 9E10 anti-myc conjugado con HRP (Amersham). La inmunotransferencia desarrollada con el anticuerpo anti-myc demostró que mycNDUFV-1 sólo
10 inmunoprecipitó mediante CR4354L4328 y no mediante ninguno de los otros anticuerpos (véase la figura 5). Además, la proteína ATAD3Amyc sólo inmunoprecipitó mediante CR2361 (datos no mostrados).

Ejemplo 11

Distribución del antígeno reconocido por CR4348 y CR4354L4328 en células 293T y células HEK293T transfectadas con VLP tal como se muestra mediante FACS

15 Se analizó la distribución de los antígenos diana reconocidos por los anticuerpos CR4348 y CR4354L4328 mediante citometría de flujo de tres formas diferentes: a) usando células HEK293T en formato permeabilizado, b) usando células HEK293T en formato no permeabilizado, y c) usando células HEK293T transfectadas con VLP de VNO no permeabilizadas. Las células 293T se obtuvieron de ATCC CRL-11268 y se recogieron con tripsina/EDTA. Una parte de las células se fijó y se permeabilizó para tinción intracelular con el tinte IntraStain de DakoCytomation (K2311) según las instrucciones del fabricante, la otra parte de las células se tiñó extracelularmente y se incubó directamente con los anticuerpos tras la recogida. Para cada muestra, se incubaron 100.000 células con 2,5 µg/ml de CR4354L4328, CR4348 o los anticuerpos control CR2300, CR4374 y CR4104 diluidos en PBS que contenía BSA al 1%. CR2300 es un anticuerpo control positivo (que reconoce CD46 que está presente en las células nucleadas); CR4374 reconoce la proteína E de VNO y es el anticuerpo control positivo para las células 293T transfectadas con VLP y el anticuerpo negativo para las células 293T no transfectadas; y CR4104 reconoce la glicoproteína del virus de la rabia y se incluye como control negativo para todas las tinciones. Se incubaron los anticuerpos con las células durante 1 hora en hielo y se recogieron las células tres veces con PBS/BSA. Se visualizó la unión de los anticuerpos a las células tras la incubación durante 1 hora en hielo con anticuerpo de cabra anti-ficoeritina humana (Pharmingen). Se lavaron las células dos veces en PBS/BSA antes del análisis. En el experimento de tinción extracelular, se excluyeron del análisis las células muertas o permeables mediante la tinción con 7-AAD, un tinte que tiñe el ADN nuclear. Se recogieron las células 293T transfectadas con VLP 24 horas tras la transfección y se tiñeron según el método descrito anteriormente para la tinción extracelular. Se analizaron las células en un dispositivo FACScalibur (BD) usando el software CellQuest. Para el análisis final de las células teñidas extracelularmente, se activaron las células basándose en dispersión frontal frente a una señal baja de 7-AAD. Una muestra se consideró positiva si la intensidad de fluorescencia media fue más de dos veces la señal obtenida con el anticuerpo control negativo. Tal como se muestra en la tabla 17, CR4348 y CR4354L4328 reconocen ambos un antígeno diana intracelular que no se expresa en la superficie celular en condiciones de cultivo normales. Sin embargo, tras la transfección con la construcción de ADN para la producción de VNO-VLP, se detectaron los antígenos diana de CR4348 y CR4354L4328 en la superficie celular. Los anticuerpos reaccionaron específicamente con antígenos expresados tras la transfección con VNO-VLP, puesto que no se unían a la superficie celular de células transfectadas de manera simulada (datos no mostrados). Cuando los anticuerpos se aplicaron en una dilución en serie, se unieron a los antígenos diana de una forma dependiente de la dosis (datos no mostrados).

45 A partir de estos datos de expresión combinados se concluyó que los antígenos reconocidos por CR4348 y CR4354L4328 se ubican intracelularmente en células sanas, normales. Sin embargo, tras simular una infección por VNO mediante la introducción de un constructo VNO-VLP en las células, los antígenos llegaron a expresarse en la superficie celular.

Ejemplo 12

Ubicación intracelular de los antígenos diana de CR4354L4328 y CR4348 demostrada mediante inmunofluorescencia

50 Se analizó la ubicación intracelular de los antígenos diana de CR4354L4328 y CR4348 mediante tinción inmunofluorescente de las células. Se sembraron células VERO y células 293T a una confluencia del 20% en cámaras LAB-TEK de 4 pocillos (Nuno). 24 horas tras la siembra de las células, se infectó una parte de las células VERO con 8,1E-3 TCID₅₀/célula de la cepa 385-99 de VNO. Se transfectó una parte de las células 293T con la construcción VNO-VLP. Las células VERO y 293T que no se usaron para la infección o transfección se dejaron crecer durante 24 horas adicionales. 24 horas tras la infección o transfección, se fijaron todas las células VERO y 293T con formaldehído al 2% en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después se mantuvieron en PBS hasta el procedimiento de tinción. Para permitir que los anticuerpos reaccionaran con los antígenos intracelulares en la célula, se permeabilizaron las células con Triton X-100 al 0,2% en PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente y se aclararon durante 15 minutos. A continuación, se bloquearon las células con BSA al 2% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron diferentes tinciones. Tinciones dobles: se aplicaron los
60

5 anticuerpos CR4354L4328, CR4348, C4104 y CR4283 a una concentración de 5 µg/ml en BSA al 2% durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras 3 lavados de 5 minutos en PBS, se visualizaron los anticuerpos mediante la adición de anticuerpo de cabra anti-ser humano teñido con Alexa fluor 488 a una concentración de 5 µg/ml en BSA al 2% que
 10 contiene 5 unidades de faloidina Bodipy (Molecular probes) para teñir la estructura del citoesqueleto. Las células se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad. A continuación, se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS y se añadió agente anti-decoloración (Vectashield) para evitar la decoloración de la señal fluorescente. Entonces se adhirió un cubreobjetos de vidrio en la parte superior con laca de uñas opaca (Miss Helen, HEMA). Se realizaron tinciones triples para analizar la ubicación conjunta de CR4348 y CR4354L4328 con sus
 15 antígenos diana FAF-1 y NDUFV1. Se visualizaron los portaobjetos bajo un microscopio de barrido láser confocal TCS-NT de Leica. La tinción de las células VERO no infectadas con CR4348 demostró un patrón de tipo red que consistía en vesículas diminutas. Tras la infección con VNO, aparecieron vesículas más grandes que se dispersaron por todo el citoplasma. La tinción de las células VERO no infectadas con CR4354L4328 demostró una tinción nuclear brillante. Tras la infección de las células VERO con VNO, aparecieron vesículas densamente empaquetadas por todo el citoplasma y desapareció la tinción del núcleo. En las células 293T, la diana para CR4348 se ubicó en estructuras similares a vesículas cerca de la membrana celular. Tras la transfección con la construcción de VLP, apareció un patrón de tinción más brillante y también se ubicaron vesículas por todo el citoplasma. En las células
 20 293T, CR4354L4328 tiñe vesículas pequeñas que se ubicaron por todo el citoplasma en estructuras densamente empaquetadas. Tras la transfección de la construcción de VLP, desapareció el aspecto de las vesículas en estructuras densamente empaquetadas y las vesículas se dispersaron por toda la célula y mostraron un patrón de tinción brillante.

Ejemplo 12

Neutralización del virus de la rabia con CR4354L4328

25 Para investigar la actividad neutralizante de CR4354L4328 sobre otras especies virales, se sometió a prueba el anticuerpo en un experimento de RFIIT para la neutralización del virus de la rabia. Se llevó a cabo RFIIT mezclando diluciones en serie cinco veces de CR4354L4328, CR4374 (control negativo; anticuerpo anti-proteína E de VNO) y CR57 (control positivo; anticuerpo anti-virus de la rabia) con una cantidad constante del virus de la rabia (50 FFD50/0,1 ml) en un portaobjetos de múltiples cámaras. Se determina un unidad del virus como la dilución a la que el 50% de los campos microscópicos observados contienen uno o más focos de células infectadas, la dosis de
 30 formación de foco, FFD50. Tras permitir que la mezcla reaccionara en un incubador de CO₂ a 37°C durante 90 minutos, se añadieron células de neuroblastoma de ratón (MNA) en medio esencial mínimo de Eagle con 10% de suero bovino fetal (MEM-10) a cada mezcla de anticuerpo monoclonal-virus dando como resultado una concentración final de 1*10⁵ células/ml. Los cultivos celulares-virus-anticuerpo monoclonal se incubaron durante 20 horas en un incubador de CO₂ a 37°C. Los cultivos se retiraron del incubador, se lavaron, se fijaron y luego se tiñeron con un conjugado de anticuerpo anti-virus de la rabia dirigido contra la nucleoproteína y se observaron bajo
 35 un microscopio de fluorescencia para determinar la presencia de células fluorescentes; se leyeron 20 campos microscópicos (160X - 200X) para cada dilución de anticuerpo monoclonal y se compararon con el control con virus (50 FFD50/0,1 ml), que debe contener de 18 a 20 campos con células fluorescentes. Se define el punto final de neutralización del 50% de un anticuerpo particular como la dilución a la que el 50% o más de los campos microscópicos observados contienen una o más células infectadas y se calculó usando el método de Reed-Muench.
 40 Se normalizaron los títulos de anticuerpo neutralizantes de virus a unidades internacionales (U.I.) usando el lote R3 de referencia de la inmunoglobulina del virus de la rabia humana patrón de NIH US (SRIG). Se obtuvo el punto de neutralización del 50% de CR57 a una concentración de 7,3 ng/ml. Se obtuvo el punto de neutralización del 50% de CR4354 a una concentración de 9,2 µg/ml. El anticuerpo control CR4374 no pudo neutralizar el virus de la rabia a ninguna concentración sometida a prueba. Los resultados muestran claramente que CR4354L4328 tiene actividad
 45 neutralizante del virus de la rabia.

Tabla 1: Cebadores de la región variable de la cadena lambda humana (sentido).

Nombre del cebador	Secuencia de nucleótidos del cebador	SEQ ID NO
HuVλ1A	5'-CAGTCTGTGCTGACT CAGCCACC-3'	SEQ ID NO: 79
HuVλ1B	5'-CAGTCTGTGYTGACG CAGCCGCC-3'	SEQ ID NO: 80
HuVλ1C	5'-CAGTCTGTCGTGACG CAGCCGCC-3'	SEQ ID NO: 81
HuVλ2	5'-CARTCTGCCCTGACT CAGCCT-3'	SEQ ID NO: 82
HuVλ3A	5'-TCCTATGWGCTGACT CAGCCACC-3'	SEQ ID NO: 83

HuVλ3	5'-TCTTCTGAGCTGACT CAGGACCC-3'	SEQ ID NO: 84
HuVλ4	5'-CACGTTATACTGACT CAACCGCC-3'	SEQ ID NO: 85
HuVλ5	5'-CAGGCTGTGCTGACT CAGCCGTC-3'	SEQ ID NO: 86
HuVλ6	5'-AATTTTATGCTGACT CAGCCCA-3'	SEQ ID NO: 87
HuVλ7/8	5'-CAGRCTGTGGTGACY CAGGAGCC-3'	SEQ ID NO: 88
HuVλ9	5'-CWGCCTGTGCTGACT CAGCCMCC-3'	SEQ ID NO: 89

Tabla 2: Cebadores de región variable de cadena kappa humana (sentido).

Nombre del cebador	Secuencia de nucleótidos del cebador	SEQ ID NO
HuVκ1B	5'- GACATCCAGWTGACCC AGTCTCC-3'	SEQ ID NO: 90
HuVκ2	5'-GATGTTGTGATGACT CAGTCTCC-3'	SEQ ID NO: 91
HuVκ3	5'-GAAATTGTGWTGACR CAGTCTCC-3'	SEQ ID NO: 92
HuVκ4	5'-GATATTGTGATGACC CACACTCC-3'	SEQ ID NO: 93
HuVκ5	5'-GAAACGACACTCACG CAGTCTCC-3'	SEQ ID NO: 94
HuVκ6	5'-GAAATTGTGCTGACTC AGTCTCC-3'	SEQ ID NO: 95

5 Tabla 3: Cebadores de región variable de cadena kappa humana extendidos con sitios de restricción Sall (sentido), cebadores de región J de cadena kappa humana extendidos con sitios de restricción NotI (antisentido), cebadores de región variable de cadena lambda humana extendidos con sitios de restricción Sall (sentido) y cebadores de región J de cadena lambda humana extendidos con sitios de restricción NotI (antisentido).

Nombre del cebador	Secuencia de nucleótidos del cebador	SEQ ID NO
HuVκB-Sall	5'-TGAGCACACAGGTCG ACGGACATCCAGWTGACC CAGTCTCC-3'	SEQ ID NO: 96
HuVκ2-Sall	5'-TGAGCACACAGGTCG ACGGATGTTGTGATGACT CAGTCTCC-3'	SEQ ID NO: 97
HuVκ3B-Sall	5'-TGAGCACACAGGTCG ACGGAAATTGTGWTGACR CAGTCTCC-3'	SEQ ID NO: 98
HuVκ4B-Sall	5'-TGAGCACACAGGTCG ACGGATATTGTGATGACC CACACTCC-3'	SEQ ID NO: 99
HuVκ5-Sall	5'-TGAGCACACAGGTCGACG GAAACGACACTCACGCAGTCT CC-3'	SEQ ID NO: 100

HuVκ6-Sall	5'-TGAGCACACAGGTCG ACGGAAATTGTGCTGACT CAGTCTCC-3'	SEQ ID NO: 101
HuVκ1-NotI	5'-GAGTCATTCTCGACTTGC GGCCGCACGTTTGATTTCCAC CTTGGTCCC-3'	SEQ ID NO: 102
HuJκ2-NotI	5'-GAGTCATTCTCGACT TGCGGCCGCACGTTTGAT CTCCAGCTTGGTCCC-3'	SEQ ID NO: 103
HuJκ3-NotI	5'-GAGTCATTCTCGACTTGC GGCCGCACGTTTGATATCCAC TTTGGTCCC-3'	SEQ ID NO: 104
HuVκ4-NotI	5'-GAGTCATTCTCGACT TGCGGCCGCACGTTTGAT CTCCACCTTGGTCCC-3'	SEQ ID NO: 105
HuVκ5-NotI	5'-GAGTCATTCTCGACTTGC GGCCGCACGTTTAATCTCCAG TCGTGTCCC-3'	SEQ ID NO: 106
HuVλ1A-Sall	5'-TGAGCACACAGGTCGACG CAGTCTGTGCTGACTCAGCCA CC-3'	SEQ ID NO: 107
HuVλ1B-Sall	5'-TGAGCACACAGGTCGACG CAGTCTGTGYTGACGCAGCCG CC-3'	SEQ ID NO: 108
HuVλ1C-Sall	5'-TGAGCACACAGGTCGACG CAGTCTGTGCTGACGCAGCCG CC-3'	SEQ ID NO: 109
HuVλ2-Sall	5'-TGAGCACACAGGTCGACG CARTCTGCCCTGACTCAGCCT- 3'	SEQ ID NO: 110
HuVλ3A-Sall	5'-TGAGCACACAGGTCGACG TCCTATGWGCTGACTCAGCCA CC-3'	SEQ ID NO: 111
HuVλ3B-Sall	5'-TGAGCACACAGGTCGACG TCTTCTGAGCTGACTCAGGAC CC-3'	SEQ ID NO: 112
HuVλ4-Sall	5'-TGAGCACACAGGTCGACG CACGTTATACTGACTCAACCG CC-3'	SEQ ID NO: 113
HuVλ5-Sall	5'-TGAGCACACAGGTCGACG CAGGCTGTGCTGACTCAGCCG TC-3'	SEQ ID NO: 114
HuVλ6-Sall	5'-TGAGCACACAGGTCGACG AATTTTATGCTGACTCAGCCC CA-3'	SEQ ID NO: 115
HuVλ7/8-Sall	5'-TGAGCACACAGGTCGACG CAGRCTGTGGTGACYCAGGAG CC-3'	SEQ ID NO: 116
HuVλ9-Sall	5'-TGAGCACACAGGTCGACG CWGCCTGTGCTGACTCAGCCM CC-3'	SEQ ID NO: 117

HuJλ-NotI	5'-GAGTCATTCTCGACTTGC GGCCGCACCTAGGACGGTGAC CTTGGTCCC-3'	SEQ ID NO: 118
HuVλ2/3-NotI	5'-GAGTCATTCTCGACTTGC GGCCGCACCTAGGACGGTCAG CTTGGTCCC-3'	SEQ ID NO: 119
HuJλ4/5-NotI	5'-GAGTCATTCTCGACTTGC GGCCGCACYTAAAACGGTGAG CTGGGTCCC-3'	SEQ ID NO: 120

Tabla 4: Distribución de los diferentes productos de cadena ligera a lo largo de las 10 fracciones.

Productos de cadena ligera	Número de alelos	Número de fracciones	Alelos/fracción
Vk1B/Jk1-5	19	1 y 2	9,5
Vk2/Jk1-5	9	3	9
Vk3B/Jk1-5	7	4	7
Vk4B/Jk1-5	1	5	5
Vk5/Jk1-5	1		
Vk6/Jk1-5	3		
Vλ1A/JI1-3	5	6	5
Vλ1B/JI1-3			
Vλ1C/JI1-3			
Vλ2/JI1-3	5	7	5
Vλ3A/JI1-3	9	8	9
Vλ3B/JI1-3			
Vλ4/JI1-3	3	9	5
Vλ5/JI1-3	1		
Vλ6/JI1-3	1		
Vλ7/8/JI1-3	3	10	6
Vλ9/JI1-3	3		

Tabla 5: Cebadores de región variable de cadena pesada de IgG humana (sentido).

Nombre del cebador	Secuencia de nucleótidos del cebador	SEQ ID NO
HuVH1B/7A	5'-CAGRTGCAGCTGGTG CARTCTGG-3'	SEQ ID NO: 121
HuVH1C	5'-SAGGTCCAGCTGGTR CAGTCTGG-3'	SEQ ID NO: 122
HuVH2B	5'-SAGGTGCAGCTGGTG GAGTCTGG-3'	SEQ ID NO: 123
HuVH3B	5'-SAGGTGCAGCTGGTG GAGTCTGG-3'	SEQ ID NO: 124
HuVH3C	5'-GAGGTGCAGCTGGTG GAGWCYGG-3'	SEQ ID NO: 125
HuVH4B	5'-CAGGTGCAGCTACAG CAGTGGGG-3'	SEQ ID NO: 126
HuVH4C	5'-CAGSTGCAGCTGCAG GAGTCSGG-3'	SEQ ID NO: 127
HuVH5B	5'-GARGTGCAGCTGGTG CAGTCTGG-3'	SEQ ID NO: 128
HuVH6A	5'-CAGGTACAGCTGCAG CAGTCAGG-3'	SEQ ID NO: 129

Tabla 6: Cebadores de región variable de cadena pesada de IgG humana extendidos con sitios de restricción Sfil/NcoI (sentido) y cebadores de región J de cadena pesada de IgG humana extendidos con sitios de restricción XhoI/BstEII (antisentido).

Nombre del cebador	Secuencia de nucleótidos del cebador	SEQ ID NO
HuVH1B/7A-Sfil	5'-GTCCTCGCAACTGCG GCCCAGCCGGCCATGGCC CAGRTGCAGCTGGTGCAR TCTGG-3'	SEQ ID NO: 130
HuVH1C-Sfil	5'-GTCCTCGCAACTGCG GCCCAGCCGGCCATGGCC SAGGTCCAGCTGGTRCAG TCTGG-3'	SEQ ID NO: 131
HuVH2B-Sfil	5'-GTCCTCGCAACTGCG GCCCAGCCGGCCATGGCC CAGRTCACCTTGAAGGAG TCTGG-3'	SEQ ID NO: 132
HuVH3B-Sfil	5'-GTCCTCGCAACTGCGGCC CAGCCGGCCATGGCCSAGGTG CAGCTGGTGGAGTCTGG-3'	SEQ ID NO: 133
HuVH3C-Sfil	5'-GTCCTCGCAACTGCG GCCCAGCCGGCCATGGCC GAGGTGCAGCTGGTGGAG WCYGG-3'	SEQ ID NO: 134
HuVH4B-Sfil	5'-GTCCTCGCAACTGCG GCCCAGCCGGCCATGGCC CAGGTGCAGCTACAGCAG TGGGG-3'	SEQ ID NO: 135
HuVH4C-Sfil	5'-GTCCTCGCAACTGCGGCC CAGCCGGCCATGGCCCAGSTG CAGCTGCAGGAGTCSGG-3'	SEQ ID NO: 136
HuVH5B-Sfil	5'-GTCCTCGCAACTGCG GCCCAGCCGGCCATGGCC GARGTGCAGCTGGTGCAG TCTGG-3'	SEQ ID NO: 137
HuVH6A.Sfil	5'-GTCCTCGCAACTGCG GCCCAGCCGGCCATGGCC CAGGTACAGCTGCAGCAG TCAGG-3'	SEQ ID NO: 138
HuJH1/2-XhoI	5'-GAGTCATTCTCGACTCGA GACGGTGACCAGGGTGCC-3'	SEQ ID NO: 139
HuJH3-XhoI	5'-GAGTCATTCTCGACT CGAGACGGTGACCATTGT CCC-3'	SEQ ID NO: 140
HuJH4/5-XhoI	5'-GAGTCATTCTCGACT CGAGACGGTGACCAGGGT TCC-3'	SEQ ID NO: 141
HuJH6-XhoI	5'-GAGTCATTCTCGACTCGA GACGGTGACCGTGGTCCC-3'	SEQ ID NO: 142

Tabla 7: Unión de anticuerpos en fagos monocatenarios (scFv) a virus del Nilo Occidental (VNO), proteína E de VNO recombinante, FBS y virus de la rabia según se mide mediante ELISA a 492 nm).

Nombre de anticuerpo en fago	Virus NO	Proteína E de VNO	Partícula similar a VNO	FBS (5%)	Virus de la rabia
SC04-348	1,026	0,093	0,771	ND	0,063
SC04-354	1,041	0,069	0,811	ND	0,063
SC02-447	0,094	0,057	ND	0,041	ND
SC03-014	0,061	0,060	ND	ND	0,062
Pos. control	0,067	0,056	0,062	ND	0,991

ND significa no determinado

Tabla 8: Datos de Fv monocatenarios específicos para VNO.

Nombre de scFv	SEQ ID NO de secuencia de nucl.	SEQ ID NO de secuencia de aminoácidos*	HCDR3 (SEQ ID NO:)	Locus de V _H	Locus de V _L
SC04-348	25	26 (Vh 1-124; VI 143-250)	DKSYYYGSGTSGGWF DP (SEQ ID NO:5)	3-09 (DP-31)	Vk I (O12/O2-DPK9)
SC04-354	27	28 (Vh 1-121; VI 140-250)	DWGSNYWGSYPKY (SEQ ID NO:6)	1-46 (DP-7)	VI 1 (1c - V1-16)

5 * entre paréntesis se muestran los aminoácidos que constituyen la región variable de cadena pesada (VH) y la región variable de cadena ligera (VL)

Tabla 9: Datos de las regiones CDR de los FV monocatenarios específicos para VNO.

Nombre de scFv	HCDR1 (SEQID NO:)	HCDR2 (SEQID NO:)	LCDR1 (SEQ ID NO:)	LCDR2 (SEQ ID NO:)	LCDR3 (SEQ ID NO:)
SC04-348	7	8	9	10	11
SC04-354	12	13	14	15	16

Tabla 10: Unión de anticuerpos IgG1 frente a VNO según se mide mediante ELISA (DO a 492 nm).

Ac	Concentración de anticuerpo (µg/ml)										
	20,000	10,000	5,000	2,500	1,250	0,630	0,310	0,160	0,078	0,039	0,000
CR4348	ND	0,370	0,343	0,300	0,251	0,192	0,143	0,122	0,104	0,085	0,003
CR4354	0,291	0,262	0,217	0,167	0,151	0,106	0,067	0,034	0,014	0,010	0,003
Control neg.	0,051	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

10 ND significa no determinado

Tabla 11: Potencia de los anticuerpos anti-VNO en el ensayo de título de anticuerpos neutralizantes del 66%.

Nombre del anticuerpo	µg/ml
CR4348	1,97
CR4354	0,48

Tabla 12: Protección de la exposición mortal a VNO en ratones mediante anticuerpos monoclonales.

Anticuerpo (15 mg/kg)	Animales supervivientes
CR4348	5/5

CR4354	5/5
7H2	5/5
IgG1 control negativo	0/5

Tabla 13: Análisis Probit de la actividad protectora de la IgG1 humana en un modelo murino de exposición mortal a VNO

Anticuerpo	Protección del 50% ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Protección del 95% ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
CR4354L4328	2,74	57,4
CR4348	6,26	131

5 Tabla 14: Diferencia en porcentaje en la concentración de neutralización del 66% de variantes de IgG1 de CR4354 frente a VNO según se mide mediante VNA.

Anticuerpo	Potencia (%)*
CR4354	100
CR4354L4261	106
CR4354L4267	Por debajo de la detección
CR4354L4328	286
CR4354L4335	60
CR4354L4383	Por debajo de la detección

* La potencia se representa en comparación con el anticuerpo original CR4354 (cuya concentración de neutralización del 66% se estableció en el 100%) y se calculó dividiendo la concentración de neutralización del 66% (en $\mu\text{g}/\text{ml}$) de CR4354 entre la concentración de neutralización del 66% (en $\mu\text{g}/\text{ml}$) de las variantes con cadena intercambiada y multiplicando el número resultante por 100%.

10 Tabla 15: Potencia de neutralización frente a la cepa USA99b del virus del Nilo occidental según se mide mediante PRNT.

Anticuerpo	PRNT50 (CI del 95%) ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	PRNT90 (CI del 95%) ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
CR4348	3,72 (3,21 - 4,27)	65,2 (52,3 - 84,1)
CR4354L4328	21,2 (10,1 - 53,4)	1602 (397 - 20000)
CRM4354	0,17 (0,11 - 0,25)	4,3 (2,85 - 7,29)

15 Tabla 16. Clones reactivos con CR4348 y CR4354L4328 según se reconoce mediante el análisis de micromatriz de proteínas.

Anticuerpo	Clon reactivo	Blast	Diana (<i>Homo sapiens</i>)
CR4348	MPMGp800B14568	gi 19528653 ref NM007051.2	Factor 1 asociado a Fas(TNFRSF6) (FAF1)
CR4348	MPMGp800G07549Q170	gi 27924136 gb BC044933.1	clon IMAGE:4540326, ARNm, CDS parcial
CR4348	MPMGp800005569Q170	gi 54607125 ref NM013364.2	antígeno paraneoplásico MA3 (PNMA3), ARNm
CR4348	MPMGp800E02577Q	gi 34364672 emb BX640642.1	ARNm; ADNc DKFZp686K01114
CR4348	MPMGp800M04560Q183	gi 39761682 gb AY405708.1	Gen de CYLN2, TRANSCRITO VIRTUAL
CR4354L4328	MPMGp800J14549Q	gi 14198175 gb BC008146.1	NADH deshidrogenasa (ubiquinona) flavoproteína 1
CR4354L4328	MPMGp800K13552Q	gi 62087473 dbj AB208947.1	ARNm para isoforma de chordin, una proteína variante
CR4354L4328	MPMGp800A02549Q	gi 17149812 ref NM0057161.2	Dominio kelch que contiene 3 (KLHDC3)
CR4354L4328	MPMGp800I05513Q	gi 4753262 gb AC006360.2	Clon de PAC RP5-1140N14 de 14q24,3

Tabla 17. Fluorescencia media medida tras la incubación con anticuerpo 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Anticuerpo	293T extracelular	293T intracelular	293T-VLP extracelular
CR4348	16	225	15
CR4354L4328	16	840	11
CR4104	15	55	4
CR4374	15	57	19
CR2300	484	236	10

BIBLIOGRAFÍA

- Beasley DW y Barrett AD (2002), Identification of neutralizing epitopes within structural domain III of the West Nile virus envelope protein. *J. Virol.* 76:13097-13100.
- 5 Beasley DW, Li L, Suderman MT y Barrett AD (2002), Mouse neuroinvasive phenotype of West Nile virus strains varies depending upon virus genotype. *Virology* 296:17-23.
- Ben-Nathan D, Lustig S, Tam G, Robinzon S, Segal S y Rager-Zisman B (2003), Prophylactic and therapeutic efficacy of human intravenous immunoglobulin in treating WNV infection in mice. *J. Infect. Dis.* 188:5-12.
- 10 Boel E, Verlaan S, Poppelier MJ, Westerdaal NA, Van Strijp JA y Logtenberg T (2000), Functional human monoclonal antibodies of all isotypes constructed from phage display library-derived single-chain Fv antibody fragments. *J. Immunol. Methods* 239:153-166.
- Burton DR y Barbas CF (1994), Human antibodies from combinatorial libraries. *Adv. Immunol.* 57:191-280.
- Chou, TC y P Talalay (1984), Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv. Enzyme Regul.* 22:27-55.
- 15 De Kruif J, Terstappen L, Boel E y Logtenberg T (1995a), Rapid selection of cell subpopulation-specific human monoclonal antibodies from a synthetic phage antibody library. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:3938.
- De Kruif J, Boel E y Logtenberg T (1995b), Selection and application of human single-chain Fv antibody fragments from a semi-synthetic phage antibody display library with designed CDR3 regions. *J. Mol. Biol.* 248:97-105.
- 20 Gollins SW y Porterfield JS (1986), A new mechanism for the neutralization of enveloped viruses by antiviral antibody. *Nature* 321:244-246.
- Huls G, Heijnen IJ, Cuomo E, van der Linden J, Boel E, van de Winkel J y Logtenberg T (1999), Antitumor immune effector mechanisms recruited by phage display-derived fully human IgG1 and IgA1 monoclonal antibodies. *Cancer Res.* 59:5778-5784.
- 25 Kuno G, Chang GJ, Tsuchiya KR, Karabatsos N y Cropp CB (1998), Phylogeny of the genus *Flavivirus*. *J. Virol.* 72:73-83.
- Rizzuto CD y Sodroski JG (1997), Contribution of virion ICAM-1 to human immunodeficiency virus infectivity and sensitivity to neutralization. *J. Virol.* 71:4847-4851.
- Slootstra JW, Puijk WC, Ligtoet GJ, Langeveld JP, Meloen RH (1996), Structural aspects of antibody-antigen interaction revealed through small random peptide libraries. *Mol. Divers.* 1:87-96.
- 30 Wang T, Anderson JF, Magnarelli LA, Wong SJ, Koski RA y Fikrig E (2001), Immunization of mice against West Nile virus with recombinant envelope protein. *J. Immunol.* 167:5273-5277.
- <Engle MJ y Diamond MS (2003), Antibody Prophylaxis and Therapy against West Nile Virus Infection in Wild-Type and Immunodeficient Mice. *J. Virol.* 77:12941-12949.
- 35 Oliphant T, Engle M, Nybakken GE, Doane C, Johnson S, Hunag L, Gorlatov S, Mehlhop E, Marri A, Chung KM, Ebel GD, Kramer LD, Fremont DH, Diamond MS (2005), Development of a humanized monoclonal antibody with therapeutic potential against West Nile virus. *Nature Medicine* 11:522-530.>

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Crucell Holland B.V.
Throsby, Mark
- 40 De Kruif, John
- <120> Moléculas de unión específicas de célula huésped capaces de neutralizar virus y usos de las mismas

<130> 0142 WO 00 ORD
<150> PCT/EP2005/052160
<151> 12-05-2005
<150> PCT/EP2005/054002
5 <151> 15-08-2005
<150> PCT/EP2005/052946
<151> 23-06-2005
<150> PCT/EP2005/052648
<151> 08-06-2005
10 <160> 163
<170> PatentIn versión 3.1
<210> 1
<211> 2424
<212> ADN
15 <213> *Homo sapiens*
<220>
<221> CDS
<222> (278)..(2230)
<223>
20 <400> 1

ES 2 365 749 T3

cccacatcca gaccaatctt cctgtccggg ctgetgcgac gcgggctccg caggttgacg	60
gcgggcggcc ggggcgcctg aaggttaccg agtgcacgag cgctagcgc tccccgcgt	120
gccccgccc ctggcccgc gaccgccc cggtctgcc cgcagcccc tcggcggccg	180
gcggcggcgg cggcgggtggc ggcgacggtc gcaggaggtg ccgtctgcct cccaggtgcg	240
cgcttcgctc cgggagccgc ggaactcggc ggccgcc atg gcg tcc aac atg gac	295
	Met Ala Ser Asn Met Asp
	1 5
cgg gag atg atc ctg gcg gat ttt cag gca tgt act ggc att gaa aac	343
Arg Glu Met Ile Leu Ala Asp Phe Gln Ala Cys Thr Gly Ile Glu Asn	
	10 15 20
att gac gaa gct att aca ttg ctt gaa caa aat aat tgg gac tta gtg	391
Ile Asp Glu Ala Ile Thr Leu Leu Glu Gln Asn Asn Trp Asp Leu Val	
	25 30 35
gca gct atc aat ggt gta ata cca cag gaa aat ggc att cta caa agt	439
Ala Ala Ile Asn Gly Val Ile Pro Gln Glu Asn Gly Ile Leu Gln Ser	
	40 45 50
gaa tat gga ggt gag acc ata cca gga cct gca ttt aat cca gca agt	487
Glu Tyr Gly Gly Glu Thr Ile Pro Gly Pro Ala Phe Asn Pro Ala Ser	
	55 60 65 70
cat cca gct tca gct cct act tcc tct tct tct tca gcg ttt cga cct	535
His Pro Ala Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ala Phe Arg Pro	
	75 80 85
gta atg cca tcc agg cag att gta gaa agg caa cct cgg atg ctg gac	583
Val Met Pro Ser Arg Gln Ile Val Glu Arg Gln Pro Arg Met Leu Asp	
	90 95 100
ttc agg gtt gaa tac aga gac aga aat gtt gat gtg gta ctt gaa gac	631
Phe Arg Val Glu Tyr Arg Asp Arg Asn Val Asp Val Val Leu Glu Asp	
	105 110 115

acc tgt act gtt gga gag att aaa cag att cta gaa aat gaa ctt cag	679
Thr Cys Thr Val Gly Glu Ile Lys Gln Ile Leu Glu Asn Glu Leu Gln	
120 125 130	
ata cct gtg tcc aaa atg ctg tta aaa ggc tgg aag acg gga gat gtg	727
Ile Pro Val Ser Lys Met Leu Leu Lys Gly Trp Lys Thr Gly Asp Val	
135 140 145 150	
gaa gac agt acg gtc cta aaa tct cta cac ttg cca aaa aac aac agt	775
Glu Asp Ser Thr Val Leu Lys Ser Leu His Leu Pro Lys Asn Asn Ser	
155 160 165	
ctt tat gtc ctt aca cca gat ttg cca cca cct tca tca tct agt cat	823
Leu Tyr Val Leu Thr Pro Asp Leu Pro Pro Ser Ser Ser Ser His	
170 175 180	
gct ggt gcc ctg cag gag tca tta aat caa aac ttc atg ctg atc atc	871
Ala Gly Ala Leu Gln Glu Ser Leu Asn Gln Asn Phe Met Leu Ile Ile	
185 190 195	
acc cac cga gaa gtc cag cgg gag tac aac ctg aac ttc tca gga agc	919
Thr His Arg Glu Val Gln Arg Glu Tyr Asn Leu Asn Phe Ser Gly Ser	
200 205 210	
agt act att caa gag gta aag aga aat gtg tat gac ctt aca agt atc	967
Ser Thr Ile Gln Glu Val Lys Arg Asn Val Tyr Asp Leu Thr Ser Ile	
215 220 225 230	
ccc gtt cgc cac caa tta tgg gag ggc tgg cca act tct gct aca gac	1015
Pro Val Arg His Gln Leu Trp Glu Gly Trp Pro Thr Ser Ala Thr Asp	
235 240 245	
gac tca atg tgt ctt gct gaa tca ggg ctc tct tat ccc tgc cat cga	1063
Asp Ser Met Cys Leu Ala Glu Ser Gly Leu Ser Tyr Pro Cys His Arg	
250 255 260	
ctt aca gtg gga aga aga tct tca cct gca cag acc cgg gaa cag tcg	1111
Leu Thr Val Gly Arg Arg Ser Ser Pro Ala Gln Thr Arg Glu Gln Ser	
265 270 275	
gaa gaa caa atc acc gat gtt cat atg gtt agt gat agc gat gga gat	1159
Glu Glu Gln Ile Thr Asp Val His Met Val Ser Asp Ser Asp Gly Asp	
280 285 290	
gac ttt gaa gat gct aca gaa ttt ggg gtg gat gat gga gaa gta ttt	1207
Asp Phe Glu Asp Ala Thr Glu Phe Gly Val Asp Asp Gly Glu Val Phe	
295 300 305 310	
ggc atg gcg tca tct gcc ttg aga aaa tct cca atg atg cca gaa aac	1255
Gly Met Ala Ser Ser Ala Leu Arg Lys Ser Pro Met Met Pro Glu Asn	
315 320 325	
gca gaa aat gaa gga gat gcc tta tta caa ttt aca gca gag ttt tct	1303
Ala Glu Asn Glu Gly Asp Ala Leu Leu Gln Phe Thr Ala Glu Phe Ser	
330 335 340	
tca aga tat ggt gat tgc cat cct gta ttt ttt att ggc tca tta gaa	1351

ES 2 365 749 T3

Ser	Arg	Tyr	Gly	Asp	Cys	His	Pro	Val	Phe	Phe	Ile	Gly	Ser	Leu	Glu		
		345					350					355					
gct	gct	ttt	caa	gag	gcc	ttc	tat	gtg	aaa	gcc	cga	gat	aga	aag	ctt	1399	
Ala	Ala	Phe	Gln	Glu	Ala	Phe	Tyr	Val	Lys	Ala	Arg	Asp	Arg	Lys	Leu		
		360				365				370							
ctt	gct	atc	tac	ctc	cac	cat	gat	gaa	agt	gtg	tta	acc	aac	gtg	ttc	1447	
Leu	Ala	Ile	Tyr	Leu	His	His	Asp	Glu	Ser	Val	Leu	Thr	Asn	Val	Phe		
		375		380						385					390		
tgc	tca	caa	atg	ctt	tgt	gct	gaa	tcc	att	gtt	tct	tat	ctg	agt	caa	1495	
Cys	Ser	Gln	Met	Leu	Cys	Ala	Glu	Ser	Ile	Val	Ser	Tyr	Leu	Ser	Gln		
			395					400						405			
aat	ttt	ata	acc	tgg	gct	tgg	gat	ctg	aca	aag	gac	tcc	aac	aga	gca	1543	
Asn	Phe	Ile	Thr	Trp	Ala	Trp	Asp	Leu	Thr	Lys	Asp	Ser	Asn	Arg	Ala		
			410					415					420				
aga	ttt	ctc	act	atg	tgc	aat	aga	cac	ttt	ggc	agt	gtt	gtg	gca	caa	1591	
Arg	Phe	Leu	Thr	Met	Cys	Asn	Arg	His	Phe	Gly	Ser	Val	Val	Ala	Gln		
		425					430					435					
acc	att	cgg	act	caa	aaa	acg	gat	cag	ttt	ccg	ctt	ttc	ctg	att	att	1639	
Thr	Ile	Arg	Thr	Gln	Lys	Thr	Asp	Gln	Phe	Pro	Leu	Phe	Leu	Ile	Ile		
		440				445					450						
atg	gga	aag	cga	tca	tct	aat	gaa	gtg	ttg	aat	gtg	ata	caa	ggg	aac	1687	
Met	Gly	Lys	Arg	Ser	Ser	Asn	Glu	Val	Leu	Asn	Val	Ile	Gln	Gly	Asn		
		455			460					465					470		
aca	aca	gta	gat	gag	tta	atg	atg	aga	ctc	atg	gct	gca	atg	gag	atc	1735	
Thr	Thr	Val	Asp	Glu	Leu	Met	Met	Arg	Leu	Met	Ala	Ala	Met	Glu	Ile		
			475						480					485			
ttc	aca	gcc	caa	caa	cag	gaa	gat	ata	aag	gac	gag	gat	gaa	cgt	gaa	1783	
Phe	Thr	Ala	Gln	Gln	Gln	Glu	Asp	Ile	Lys	Asp	Glu	Asp	Glu	Arg	Glu		
			490					495					500				
gcc	aga	gaa	aat	gtg	aag	aga	gag	caa	gat	gag	gcc	tat	cgc	ctt	tca	1831	
Ala	Arg	Glu	Asn	Val	Lys	Arg	Glu	Gln	Asp	Glu	Ala	Tyr	Arg	Leu	Ser		
		505					510					515					
ctt	gag	gct	gac	aga	gca	aag	agg	gaa	gct	cac	gag	aga	gag	atg	gca	1879	
Leu	Glu	Ala	Asp	Arg	Ala	Lys	Arg	Glu	Ala	His	Glu	Arg	Glu	Met	Ala		
		520				525					530						
gaa	cag	ttt	cgt	ttg	gag	cag	att	cgc	aaa	gaa	caa	gaa	gag	gaa	cgt	1927	
Glu	Gln	Phe	Arg	Leu	Glu	Gln	Ile	Arg	Lys	Glu	Gln	Glu	Glu	Glu	Arg		
		535			540					545					550		
gag	gcc	atc	cgg	ctg	tcc	tta	gag	caa	gcc	ctg	cct	cct	gag	cca	aag	1975	
Glu	Ala	Ile	Arg	Leu	Ser	Leu	Glu	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Glu	Pro	Lys		
			555						560					565			
gaa	gaa	aat	gct	gag	cct	gtg	agc	aaa	ctg	cgg	atc	cgg	acc	ccc	agt	2023	
Glu	Glu	Asn	Ala	Glu	Pro	Val	Ser	Lys	Leu	Arg	Ile	Arg	Thr	Pro	Ser		

570	575	580	
ggc gag ttc ttg gag cgg cgt ttc ctg gcc agc aac aag ctc cag att			2071
Gly Glu Phe Leu Glu Arg Arg Phe Leu Ala Ser Asn Lys Leu Gln Ile			
585	590	595	
gtc ttt gat ttt qta gct tcc aaa gga ttt cca tgg gat gag tac aag			2119
Val Phe Asp Phe Val Ala Ser Lys Gly Phe Pro Trp Asp Glu Tyr Lys			
600	605	610	
tta ctg agc acc ttt cct agg aga gac gta act caa ctg gac cca aat			2167
Leu Leu Ser Thr Phe Pro Arg Arg Asp Val Thr Gln Leu Asp Pro Asn			
615	620	625	630
aaa tca tta ttg gag gta aag ttg ttc cct caa gaa acc ctt ttc ctt			2215
Lys Ser Leu Leu Glu Val Lys Leu Phe Pro Gln Glu Thr Leu Phe Leu			
635	640	645	
gaa gca aaa gag taa acacggccca gcggtggaac cagccattcc ttgacaagcc			2270
Glu Ala Lys Glu			
650			
agcagcctgc gtcaggagaa gggctcctcg ccaaccacc cacacgctcg tctcactcaa			2330
ttcaatgtca cacttctgcc tcttgcaaaa ttgctggaaa aagtaataat aaatatagct			2390
acttaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa			2424

<210> 2

<211> 650

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

Met Ala Ser Asn Met Asp Arg Glu Met Ile Leu Ala Asp Phe Gln Ala																		
1				5					10									15
Cys Thr Gly Ile Glu Asn Ile Asp Glu Ala Ile Thr Leu Leu Glu Gln																		
			20						25									30
Asn Asn Trp Asp Leu Val Ala Ala Ile Asn Gly Val Ile Pro Gln Glu																		
			35						40									45
Asn Gly Ile Leu Gln Ser Glu Tyr Gly Gly Glu Thr Ile Pro Gly Pro																		
			50						55									60

ES 2 365 749 T3

Ala Phe Asn Pro Ala Ser His Pro Ala Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser
65 70 75 80

Ser Ser Ala Phe Arg Pro Val Met Pro Ser Arg Gln Ile Val Glu Arg
85 90 95

Gln Pro Arg Met Leu Asp Phe Arg Val Glu Tyr Arg Asp Arg Asn Val
100 105 110

Asp Val Val Leu Glu Asp Thr Cys Thr Val Gly Glu Ile Lys Gln Ile
115 120 125

Leu Glu Asn Glu Leu Gln Ile Pro Val Ser Lys Met Leu Leu Lys Gly
130 135 140

Trp Lys Thr Gly Asp Val Glu Asp Ser Thr Val Leu Lys Ser Leu His
145 150 155 160

Leu Pro Lys Asn Asn Ser Leu Tyr Val Leu Thr Pro Asp Leu Pro Pro
165 170 175

Pro Ser Ser Ser Ser His Ala Gly Ala Leu Gln Glu Ser Leu Asn Gln
180 185 190

Asn Phe Met Leu Ile Ile Thr His Arg Glu Val Gln Arg Glu Tyr Asn
195 200 205

Leu Asn Phe Ser Gly Ser Ser Thr Ile Gln Glu Val Lys Arg Asn Val
210 215 220

Tyr Asp Leu Thr Ser Ile Pro Val Arg His Gln Leu Trp Glu Gly Trp
225 230 235 240

Pro Thr Ser Ala Thr Asp Asp Ser Met Cys Leu Ala Glu Ser Gly Leu
245 250 255

Ser Tyr Pro Cys His Arg Leu Thr Val Gly Arg Arg Ser Ser Pro Ala
260 265 270

Gln Thr Arg Glu Gln Ser Glu Glu Gln Ile Thr Asp Val His Met Val
275 280 285

Ser Asp Ser Asp Gly Asp Asp Phe Glu Asp Ala Thr Glu Phe Gly Val

His Glu Arg Glu Met Ala Glu Gln Phe Arg Leu Glu Gln Ile Arg Lys
 530 535 540

Glu Gln Glu Glu Glu Arg Glu Ala Ile Arg Leu Ser Leu Glu Gln Ala
 545 550 555 560

Leu Pro Pro Glu Pro Lys Glu Glu Asn Ala Glu Pro Val Ser Lys Leu
 565 570 575

Arg Ile Arg Thr Pro Ser Gly Glu Phe Leu Glu Arg Arg Phe Leu Ala
 580 585 590

Ser Asn Lys Leu Gln Ile Val Phe Asp Phe Val Ala Ser Lys Gly Phe
 595 600 605

Pro Trp Asp Glu Tyr Lys Leu Leu Ser Thr Phe Pro Arg Arg Asp Val
 610 615 620

Thr Gln Leu Asp Pro Asn Lys Ser Leu Leu Glu Val Lys Leu Phe Pro
 625 630 635 640

Gln Glu Thr Leu Phe Leu Glu Ala Lys Glu
 645 650

<210> 3

<211> 1529

<212> ADN

5 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

<222> (39)..(1428)

<223>

10 <400> 3

gacagcgtga ggtgacccat ctggcccgcc gcg atg ctg gca aca cgg cgg ctg
 Met Leu Ala Thr Arg Arg Leu

54

ES 2 365 749 T3

														1															5
ctc	ggc	tgg	tcg	ctt	ccc	gcg	cgg	gta	tct	gtg	cgt	ttc	agc	ggc	gac		102												
Leu	Gly	Trp	Ser	Leu	Pro	Ala	Arg	Val	Ser	Val	Arg	Phe	Ser	Gly	Asp														
		10					15					20																	
acg	aca	gca	ccc	aag	aaa	acc	tca	ttt	ggc	tcg	ctg	aag	gat	gaa	gac		150												
Thr	Thr	Ala	Pro	Lys	Lys	Thr	Ser	Phe	Gly	Ser	Leu	Lys	Asp	Glu	Asp														
	25					30					35																		
cgg	att	ttc	acc	aac	ctg	tac	ggc	cgc	cat	gac	tgg	agg	ctg	aaa	ggt		198												
Arg	Ile	Phe	Thr	Asn	Leu	Tyr	Gly	Arg	His	Asp	Trp	Arg	Leu	Lys	Gly														
40				45						50				55															
tcc	ctg	agt	cga	ggt	gac	tgg	tac	aag	aca	aag	gag	atc	ctg	ctg	aag		246												
Ser	Leu	Ser	Arg	Gly	Asp	Trp	Tyr	Lys	Thr	Lys	Glu	Ile	Leu	Leu	Lys														
				60					65					70															
ggg	ccc	gac	tgg	atc	ctg	ggc	gag	atc	aag	aca	tcg	ggt	ttg	agg	ggc		294												
Gly	Pro	Asp	Trp	Ile	Leu	Gly	Glu	Ile	Lys	Thr	Ser	Gly	Leu	Arg	Gly														
		75						80					85																
cgt	gga	ggc	gct	ggc	ttc	ccc	act	ggc	ctc	aag	tgg	agc	ttc	atg	aat		342												
Arg	Gly	Gly	Ala	Gly	Phe	Pro	Thr	Gly	Leu	Lys	Trp	Ser	Phe	Met	Asn														
		90					95					100																	
aag	ccc	tca	gat	ggc	agg	ccc	aag	tat	ctg	gtg	gtg	aac	gca	gac	gag		390												
Lys	Pro	Ser	Asp	Gly	Arg	Pro	Lys	Tyr	Leu	Val	Val	Asn	Ala	Asp	Glu														
	105					110					115																		
ggg	gag	ccg	ggc	acc	tgc	aag	gac	cgg	gag	atc	tta	cgc	cat	gat	cct		438												
Gly	Glu	Pro	Gly	Thr	Cys	Lys	Asp	Arg	Glu	Ile	Leu	Arg	His	Asp	Pro														
120					125					130					135														
cac	aag	ctg	ctg	gaa	ggc	tgc	ctg	gtg	ggg	ggc	cgg	gcc	atg	ggc	gcc		486												
His	Lys	Leu	Leu	Glu	Gly	Cys	Leu	Val	Gly	Gly	Arg	Ala	Met	Gly	Ala														
				140					145					150															
cgc	gct	gcc	tat	atc	tac	atc	cga	ggg	gaa	ttc	tac	aat	gag	gcc	tcc		534												
Arg	Ala	Ala	Tyr	Ile	Tyr	Ile	Arg	Gly	Glu	Phe	Tyr	Asn	Glu	Ala	Ser														
			155					160					165																
aat	ctg	cag	gtg	gcc	atc	cga	gag	gcc	tat	gag	gca	ggt	ctg	att	ggc		582												
Asn	Leu	Gln	Val	Ala	Ile	Arg	Glu	Ala	Tyr	Glu	Ala	Gly	Leu	Ile	Gly														
		170					175					180																	
aag	aat	gct	tgt	ggc	tct	ggc	tat	gat	ttt	gac	gtg	ttt	gtg	gtg	cgc		630												
Lys	Asn	Ala	Cys	Gly	Ser	Gly	Tyr	Asp	Phe	Asp	Val	Phe	Val	Val	Arg														
	185					190					195																		
ggg	gct	ggg	gcc	tac	atc	tgt	gga	gag	gag	aca	gcg	ctc	atc	gag	tcc		678												
Gly	Ala	Gly	Ala	Tyr	Ile	Cys	Gly	Glu	Glu	Thr	Ala	Leu	Ile	Glu	Ser														
200					205					210					215														
att	gag	ggc	aag	cag	ggc	aag	ccc	cgc	ctg	aag	ccc	ccc	ttc	ccc	gca		726												
Ile	Glu	Gly	Lys	Gln	Gly	Lys	Pro	Arg	Leu	Lys	Pro	Pro	Phe	Pro	Ala														
				220					225					230															

gac	gtg	gga	gtg	ttt	ggc	tgc	ccc	aca	act	gtg	gcc	aac	gtg	gag	aca	774
Asp	Val	Gly	Val	Phe	Gly	Cys	Pro	Thr	Thr	Val	Ala	Asn	Val	Glu	Thr	
			235					240					245			
gtg	gca	gtg	tcc	ccc	aca	atc	tgc	cgc	cgt	gga	ggt	acc	tgg	ttt	gct	822
Val	Ala	Val	Ser	Pro	Thr	Ile	Cys	Arg	Arg	Gly	Gly	Thr	Trp	Phe	Ala	
		250					255					260				
ggc	ttt	ggc	aga	gaa	cgc	aac	tca	ggc	acc	aaa	cta	ttc	aac	atc	tct	870
Gly	Phe	Gly	Arg	Glu	Arg	Asn	Ser	Gly	Thr	Lys	Leu	Phe	Asn	Ile	Ser	
	265					270					275					
ggc	cat	gtc	aac	cac	cct	tgc	act	gtg	gag	gag	gag	atg	tct	gtg	ccc	918
Gly	His	Val	Asn	His	Pro	Cys	Thr	Val	Glu	Glu	Glu	Met	Ser	Val	Pro	
280					285				290						295	
ttg	aaa	gaa	ctg	att	gag	aag	cat	gct	ggg	ggt	gtc	acg	ggc	ggc	tgg	966
Leu	Lys	Glu	Leu	Ile	Glu	Lys	His	Ala	Gly	Gly	Val	Thr	Gly	Gly	Trp	
				300					305					310		
gac	aac	ctc	ctt	gct	gtg	atc	cct	ggc	ggc	tcg	tct	acc	cca	ctg	atc	1014
Asp	Asn	Leu	Leu	Ala	Val	Ile	Pro	Gly	Gly	Ser	Ser	Thr	Pro	Leu	Ile	
			315					320					325			
ccc	aag	tct	gtg	tgt	gag	acg	gtg	ctg	atg	gac	ttc	gat	gcg	ctg	gtg	1062
Pro	Lys	Ser	Val	Cys	Glu	Thr	Val	Leu	Met	Asp	Phe	Asp	Ala	Leu	Val	
		330					335					340				
cag	gca	cag	aca	ggc	ctg	ggc	aca	gct	gcg	gtg	atc	gtc	atg	gac	cgc	1110
Gln	Ala	Gln	Thr	Gly	Leu	Gly	Thr	Ala	Ala	Val	Ile	Val	Met	Asp	Arg	
	345					350					355					
tcg	acg	gac	atc	gtg	aaa	gcc	atc	gcc	cgc	ctc	att	gag	ttc	tat	aag	1158
Ser	Thr	Asp	Ile	Val	Lys	Ala	Ile	Ala	Arg	Leu	Ile	Glu	Phe	Tyr	Lys	
360					365					370					375	
cac	gag	agc	tgt	ggc	cag	tgt	acc	cca	tgc	cgt	gag	ggt	gtg	gac	tgg	1206
His	Glu	Ser	Cys	Gly	Gln	Cys	Thr	Pro	Cys	Arg	Glu	Gly	Val	Asp	Trp	
			380						385					390		
atg	aac	aag	gtg	atg	gca	cgt	ttc	gtg	agg	ggg	gat	gcc	cgg	ccg	gcc	1254
Met	Asn	Lys	Val	Met	Ala	Arg	Phe	Val	Arg	Gly	Asp	Ala	Arg	Pro	Ala	
			395					400					405			
gag	atc	gac	tcc	ctg	tgg	gag	atc	agc	aag	cag	ata	gaa	ggc	cat	acg	1302
Glu	Ile	Asp	Ser	Leu	Trp	Glu	Ile	Ser	Lys	Gln	Ile	Glu	Gly	His	Thr	
		410					415					420				
att	tgt	gct	ctg	ggt	gac	ggg	gcc	gcc	tgg	cct	gtg	cag	ggt	ctg	atc	1350
Ile	Cys	Ala	Leu	Gly	Asp	Gly	Ala	Ala	Trp	Pro	Val	Gln	Gly	Leu	Ile	
	425					430					435					
cgc	cac	ttt	cgg	ccg	gag	ctc	gag	gag	cgg	atg	cag	cgg	ttt	gcc	cag	1398
Arg	His	Phe	Arg	Pro	Glu	Leu	Glu	Glu	Arg	Met	Gln	Arg	Phe	Ala	Gln	
440					445					450					455	

cag cat cag gcc cgg cag gct gcc tct tag cccaccaccc tggcctgctg 1448
 Gln His Gln Ala Arg Gln Ala Ala Ser
 460

tcctgcgtct atccatgtgg aatgctggac aataaagega gtgctgcccc ccctccaaaa 1508

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa a 1529

<210> 4

<211> 464

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 4

Met Leu Ala Thr Arg Arg Leu Leu Gly Trp Ser Leu Pro Ala Arg Val
 1 5 10 15

Ser Val Arg Phe Ser Gly Asp Thr Thr Ala Pro Lys Lys Thr Ser Phe
 20 25 30

Gly Ser Leu Lys Asp Glu Asp Arg Ile Phe Thr Asn Leu Tyr Gly Arg
 35 40 45

His Asp Trp Arg Leu Lys Gly Ser Leu Ser Arg Gly Asp Trp Tyr Lys
 50 55 60

Thr Lys Glu Ile Leu Leu Lys Gly Pro Asp Trp Ile Leu Gly Glu Ile
 65 70 75 80

Lys Thr Ser Gly Leu Arg Gly Arg Gly Gly Ala Gly Phe Pro Thr Gly
 85 90 95

Leu Lys Trp Ser Phe Met Asn Lys Pro Ser Asp Gly Arg Pro Lys Tyr
 100 105 110

Leu Val Val Asn Ala Asp Glu Gly Glu Pro Gly Thr Cys Lys Asp Arg
 115 120 125

Glu Ile Leu Arg His Asp Pro His Lys Leu Leu Glu Gly Cys Leu Val
 130 135 140

Gly Gly Arg Ala Met Gly Ala Arg Ala Ala Tyr Ile Tyr Ile Arg Gly
 145 150 155 160

Glu Phe Tyr Asn Glu Ala Ser Asn Leu Gln Val Ala Ile Arg Glu Ala
 165 170 175

Tyr Glu Ala Gly Leu Ile Gly Lys Asn Ala Cys Gly Ser Gly Tyr Asp
 180 185 190

Phe Asp Val Phe Val Val Arg Gly Ala Gly Ala Tyr Ile Cys Gly Glu
 195 200 205

Glu Thr Ala Leu Ile Glu Ser Ile Glu Gly Lys Gln Gly Lys Pro Arg
 210 215 220

Leu Lys Pro Pro Phe Pro Ala Asp Val Gly Val Phe Gly Cys Pro Thr
 225 230 235 240

Thr Val Ala Asn Val Glu Thr Val Ala Val Ser Pro Thr Ile Cys Arg
 245 250 255

Arg Gly Gly Thr Trp Phe Ala Gly Phe Gly Arg Glu Arg Asn Ser Gly
 260 265 270

Thr Lys Leu Phe Asn Ile Ser Gly His Val Asn His Pro Cys Thr Val
 275 280 285

Glu Glu Glu Met Ser Val Pro Leu Lys Glu Leu Ile Glu Lys His Ala
 290 295 300

Gly Gly Val Thr Gly Gly Trp Asp Asn Leu Leu Ala Val Ile Pro Gly
 305 310 315 320

Gly Ser Ser Thr Pro Leu Ile Pro Lys Ser Val Cys Glu Thr Val Leu
 325 330 335

Met Asp Phe Asp Ala Leu Val Gln Ala Gln Thr Gly Leu Gly Thr Ala
 340 345 350

Ala Val Ile Val Met Asp Arg Ser Thr Asp Ile Val Lys Ala Ile Ala
 355 360 365

Arg Leu Ile Glu Phe Tyr Lys His Glu Ser Cys Gly Gln Cys Thr Pro

370

375

380

Cys Arg Glu Gly Val Asp Trp Met Asn Lys Val Met Ala Arg Phe Val
 385 390 395 400

Arg Gly Asp Ala Arg Pro Ala Glu Ile Asp Ser Leu Trp Glu Ile Ser
 405 410 415

Lys Gln Ile Glu Gly His Thr Ile Cys Ala Leu Gly Asp Gly Ala Ala
 420 425 430

Trp Pro Val Gln Gly Leu Ile Arg His Phe Arg Pro Glu Leu Glu Glu
 435 440 445

Arg Met Gln Arg Phe Ala Gln Gln His Gln Ala Arg Gln Ala Ala Ser
 450 455 460

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> HCDR3

<400> 5

Asp Lys Ser Tyr Tyr Tyr Gly Ser Gly Thr Ser Gly Gly Trp Phe Asp
 1 5 10 15

Pro

10 <210> 6

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> HCDR3

<400> 6

Asp Trp Gly Ser Asn Tyr Val Trp Gly Ser Tyr Pro Lys Tyr
 1 5 10

<210> 7

<211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> HCDR1
 <400> 7
 Asp Tyr Ala Met His
 1 5

 <210> 8
 <211> 17
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> HCDR2
 <400> 8
 Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Asn Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

 Gly
 15
 <210> 9
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> LCDR1
 <400> 9
 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
 1 5 10

 <210> 10
 25 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> LCDR2
 30 <400> 10

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> LCDR3

<400> 11

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Arg Thr
1 5

10 <210> 12

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> HCDR1

<400> 12

His Tyr Tyr Met His
1 5

<210> 13

<211> 17

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> HCDR2

<400> 13

Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Thr Tyr Ala Gln Lys Leu Gln
1 5 10 15

Gly

25

<210> 14

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> LCDR1
 <400> 14

 Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val Asn
 1 5 10
 5
 <210> 15
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> LCDR2
 <400> 15

 Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser
 1 5

 <210> 16
 15 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> LCDR3
 20 <400> 16

 Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Pro Val
 1 5 10

 <210> 17
 <211> 372
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Región variable de cadena pesada 348
 <220>
 <221> CDS
 30 <222> (1)..(372)
 <223>
 <400> 17

ES 2 365 749 T3

gag	gtg	cag	ctg	gtg	gag	tct	ggg	gga	ggc	ttg	gta	cag	cct	ggc	agg	48
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Arg	
1				5					10					15		
tcc	ctg	aga	ctc	tcc	tgt	gca	gcc	tct	gga	ttc	acc	ttt	gat	gat	tat	96
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Asp	Asp	Tyr	
			20					25					30			
gcc	atg	cac	tgg	gtc	cgg	caa	gct	cca	ggg	aag	ggc	ctg	gag	tgg	gtc	144
Ala	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
		35					40					45				
tca	ggt	att	agt	tgg	aat	agt	ggt	aac	ata	ggc	tat	gcg	gac	tct	gtg	192
Ser	Gly	Ile	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Asn	Ile	Gly	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	
	50					55					60					
aag	ggc	cga	ttc	acc	atc	tcc	aga	gac	aac	gcc	aag	aac	tcc	ctg	tat	240
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr	
65					70				75					80		
ctg	caa	atg	aac	agt	ctg	aga	gct	gag	gac	acg	gcc	ttg	tat	tac	tgt	288
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Leu	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90					95		
gca	aaa	gat	aaa	tcg	tat	tat	tat	ggt	tcg	ggg	acc	tcg	gga	ggc	tgg	336
Ala	Lys	Asp	Lys	Ser	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Gly	Gly	Trp	
			100					105					110			
ttc	gac	ccc	tgg	ggc	cag	ggc	acc	ctg	gtg	acc	gtc					372
Phe	Asp	Pro	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val					
		115					120									

<210> 18

<211> 124

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región variable de cadena pesada 348

<400> 18

ES 2 365 749 T3

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Asn Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Lys Asp Lys Ser Tyr Tyr Tyr Gly Ser Gly Thr Ser Gly Gly Trp
 100 105 110

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

<210> 19

<211> 363

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región variable de cadena pesada 354

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(363)

<223>

<400> 19

ES 2 365 749 T3

cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg agg aag cct ggg gcc 48
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Arg Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

tca gtg aag gtt tcc tgc aag gca tct gga tac acc ttc acc cac tat 96
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr
 20 25 30

tat atg cac tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg 144
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

gga ata atc aac cct agt ggt ggt agc aca acc tac gca cag aag ctc 192
 Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Thr Tyr Ala Gln Lys Leu
 50 55 60

cag ggc aga gtc acc atg acc agg gac acg tcc acg agc aca gtc tac 240
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80

atg gag ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg tat tac tgt 288
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

gcg aga gat tgg ggc tcc aat tac gtt tgg ggg agt tat ccc aag tac 336
 Ala Arg Asp Trp Gly Ser Asn Tyr Val Trp Gly Ser Tyr Pro Lys Tyr
 100 105 110

tgg ggc cag ggc acc ctg gtc acc gtc 363
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 115 120

<210> 20

<211> 121

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región variable de cadena pesada 354

<400> 20

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

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

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Thr Tyr Ala Gln Lys Leu
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Trp Gly Ser Asn Tyr Val Trp Gly Ser Tyr Pro Lys Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 115 120

<210> 21

<211> 330

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región variable de cadena ligera 348

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(330)

<223>

<400> 21

ES 2 365 749 T3

tcg acg gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct	48
Ser Thr Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser	
1 5 10 15	
gta gga gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc att agc	96
Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser	
20 25 30	
agc tat tta aat tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc	144
Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu	
35 40 45	
ctg atc tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc	192
Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe	
50 55 60	
agt ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg	240
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu	
65 70 75 80	
caa cct gaa gat ttt gca act tac tac tgt caa cag agt tac agt acc	288
Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr	
85 90 95	
cct cgg acg ttc ggc caa ggg acc aag ctg gag atc aaa cgt	330
Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg	
100 105 110	

<210> 22

<211> 110

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región variable de cadena ligera 348

<400> 22

Ser Thr Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
1 5 10 15
Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser
20 25 30
Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu

ES 2 365 749 T3

35

40

45

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

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

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

Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

<210> 23

<211> 333

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región variable de cadena ligera 354

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(333)

<223>

<400> 23

cag tct gtg ttg acg cag ccg ccc tca gtg tct gcg gcc ccc gga cag 48
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

aag gtc acc atc tcc tgt tct gga agc agc tcc aac atc gga agt aat 96
Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

act gta aac tgg tac cag cag ctc cca gga acg gcc ccc aaa ctc ctc 144
Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

atc tat agt aat aat cag cgg ccc tca ggg atc cct gac cga ttc tct 192

ES 2 365 749 T3

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

ggc tcc aag tct ggc acc tca gcc tcc ctg gcc atc agt ggg ctc caa 240
 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
 65 70 75 80

tct gaa gat gag gct gat tat tac tgt gca gca tgg gat gac agc ctg 288
 Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
 85 90 95

aat ggt ccg gtg ttc ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc cta ggt 333
 Asn Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

<210> 24

<211> 111

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región variable de cadena ligera 354

<400> 24

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

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30

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

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

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
 65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
 85 90 95

Asn Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly

10 <210> 25

<211> 750

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> SC04-348

<220>

<221> CDS

5 <222> (1)..(750)

<223>

<400> 25

gag	gtg	cag	ctg	gtg	cag	tct	ggg	gga	ggc	ttg	gta	cag	cct	ggc	agg	48
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Arg	
1				5					10					15		
tcc	ctg	aga	ctc	tcc	tgt	gca	gcc	tct	gga	ttc	acc	ttt	gat	gat	tat	96
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Asp	Asp	Tyr	
			20					25					30			
gcc	atg	cac	tgg	gtc	cgg	caa	gct	cca	ggg	aag	ggc	ctg	gag	tgg	gtc	144
Ala	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
		35					40					45				
tca	ggt	att	agt	tgg	aat	agt	ggt	aac	ata	ggc	tat	gcg	gac	tct	gtg	192
Ser	Gly	Ile	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Asn	Ile	Gly	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	
	50					55				60						
aag	ggc	cga	ttc	acc	atc	tcc	aga	gac	aac	gcc	aag	aac	tcc	ctg	tat	240
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr	
65					70					75					80	
ctg	caa	atg	aac	agt	ctg	aga	gct	gag	gac	acg	gcc	ttg	tat	tac	tgt	288
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Leu	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90					95		
gca	aaa	gat	aaa	tcg	tat	tat	tat	ggt	tcg	ggg	acc	tcg	gga	ggc	tgg	336
Ala	Lys	Asp	Lys	Ser	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Gly	Gly	Trp	
			100					105					110			
ttc	gac	ccc	tgg	ggc	cag	ggc	acc	ctg	gtc	acc	gtc	tcg	agc	ggt	acg	384

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

ggc ggt tca ggc gga acc ggc agc ggc act ggc ggg tcg acg gac atc 432
 Gly Gly Ser Gly Gly Thr Gly Ser Gly Thr Gly Gly Ser Thr Asp Ile
 130 135 140

cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga gac aga 480
 Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
 145 150 155 160

gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc att agc agc tat tta aat 528
 Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
 165 170 175

tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc tat gct 576
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala
 180 185 190

gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agt ggc agt gga 624
 Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
 195 200 205

tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct gaa gat 672
 Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
 210 215 220

ttt gca act tac tac tgt caa cag agt tac agt acc cct cgg acg ttc 720
 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Arg Thr Phe
 225 230 235 240

ggc caa ggg acc aag ctg gag atc aaa cgt 750
 Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 245 250

<210> 26

<211> 250

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> SC04-348

<400> 26

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr

ES 2 365 749 T3

20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Asn Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Lys Asp Lys Ser Tyr Tyr Tyr Gly Ser Gly Thr Ser Gly Gly Trp
100 105 110

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

Gly Gly Ser Gly Gly Thr Gly Ser Gly Thr Gly Gly Ser Thr Asp Ile
130 135 140

Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
145 150 155 160

Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
165 170 175

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala
180 185 190

Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
195 200 205

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
210 215 220

Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Arg Thr Phe
225 230 235 240

Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
245 250

<210> 27

<211> 750

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> SC04-354

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(750)

10 <223>

<400> 27

gag	gtg	cag	ctg	gtg	cag	tct	ggg	gct	gag	gtg	agg	aag	cct	ggg	gcc	48
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Arg	Lys	Pro	Gly	Ala	
1				5					10					15		
tca	gtg	aag	ggt	tcc	tgc	aag	gca	tct	gga	tac	acc	ttc	acc	cac	tat	96
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	His	Tyr	
			20					25					30			
tat	atg	cac	tgg	gtg	cga	cag	gcc	cct	gga	caa	ggg	ctt	gag	tgg	atg	144
Tyr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
		35					40					45				
gga	ata	atc	aac	cct	agt	ggt	ggt	agc	aca	acc	tac	gca	cag	aag	ctc	192
Gly	Ile	Ile	Asn	Pro	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Thr	Tyr	Ala	Gln	Lys	Leu	
	50					55					60					
cag	ggc	aga	gtc	acc	atg	acc	agg	gac	acg	tcc	acg	agc	aca	gtc	tac	240
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Val	Tyr	
65					70					75				80		
atg	gag	ctg	agc	agc	ctg	aga	tct	gag	gac	acg	gcc	gtg	tat	tac	tgt	288
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90					95		
gcg	aga	gat	tgg	ggc	tcc	aat	tac	ggt	tgg	ggg	agt	tat	ccc	aag	tac	336
Ala	Arg	Asp	Trp	Gly	Ser	Asn	Tyr	Val	Trp	Gly	Ser	Tyr	Pro	Lys	Tyr	
			100					105					110			
tgg	ggc	cag	ggc	acc	ctg	gtc	acc	gtc	tcg	agc	ggt	acg	ggc	ggt	tca	384
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Thr	Gly	Gly	Ser	

ES 2 365 749 T3

115	120	125	
ggc gga acc ggc agc ggc act ggc ggg tcg acg cag tct gtg ttg acg			432
Gly Gly Thr Gly Ser Gly Thr Gly Gly Ser Thr Gln Ser Val Leu Thr			
130	135	140	
cag ccg ccc tca gtg tct gcg gcc ccc gga cag aag gtc acc atc tcc			480
Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln Lys Val Thr Ile Ser			
145	150	155	160
tgt tct gga agc agc tcc aac atc gga agt aat act gta aac tgg tac			528
Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val Asn Trp Tyr			
165	170	175	
cag cag ctc cca gga acg gcc ccc aaa ctc ctc atc tat agt aat aat			576
Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Asn Asn			
180	185	190	
cag cgg ccc tca ggg atc cct gac cga ttc tct ggc tcc aag tct ggc			624
Gln Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly			
195	200	205	
acc tca gcc tcc ctg gcc atc agt ggg ctc caa tct gaa gat gag gct			672
Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala			
210	215	220	
gat tat tac tgt gca gca tgg gat gac agc ctg aat ggt ccg gtg ttc			720
Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Pro Val Phe			
225	230	235	240
ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc cta ggt			750
Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly			
245	250		

<210> 28

<211> 250

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> SC04-354

<400> 28

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

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

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Thr Tyr Ala Gln Lys Leu
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Trp Gly Ser Asn Tyr Val Trp Gly Ser Tyr Pro Lys Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Thr Gly Gly Ser
 115 120 125
 Gly Gly Thr Gly Ser Gly Thr Gly Gly Ser Thr Gln Ser Val Leu Thr
 130 135 140
 Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln Lys Val Thr Ile Ser
 145 150 155 160
 Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val Asn Trp Tyr
 165 170 175
 Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Asn Asn
 180 185 190
 Gln Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly
 195 200 205
 Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala
 210 215 220
 Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Pro Val Phe
 225 230 235 240
 Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 245 250

<210> 29
 <211> 1368
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Cadena pesada CR4348
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1368)
 10 <223>
 <400> 29

gag	gtg	cag	ctg	gtg	gag	tct	ggg	gga	ggc	ttg	gta	cag	cct	ggc	agg		48
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Arg		
1				5					10					15			
tcc	ctg	aga	ctc	tcc	tgt	gca	gcc	tct	gga	ttc	acc	ttt	gat	gat	tat		96
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Asp	Asp	Tyr		
			20					25					30				
gcc	atg	cac	tgg	gtc	cgg	caa	gct	cca	ggg	aag	ggc	ctg	gag	tgg	gtc		144
Ala	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val		
		35					40					45					
tca	ggt	att	agt	tgg	aat	agt	ggt	aac	ata	ggc	tat	gcg	gac	tct	gtg		192
Ser	Gly	Ile	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Asn	Ile	Gly	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val		
	50					55					60						
aag	ggc	cga	ttc	acc	atc	tcc	aga	gac	aac	gcc	aag	aac	tcc	ctg	tat		240
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr		
65					70				75					80			
ctg	caa	atg	aac	agt	ctg	aga	gct	gag	gac	acg	gcc	ttg	tat	tac	tgt		288
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Leu	Tyr	Tyr	Cys		
				85					90					95			
gca	aaa	gat	aaa	tcg	tat	tat	tat	ggt	tcg	ggg	acc	tcg	gga	ggc	tgg		336
Ala	Lys	Asp	Lys	Ser	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Gly	Gly	Trp		
			100					105					110				
ttc	gac	ccc	tgg	ggc	cag	ggc	acc	ctg	gtg	acc	gtc	tcc	agc	gct	agc		384
Phe	Asp	Pro	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser		
		115					120					125					

ES 2 365 749 T3

acc aag ggc ccc agc gtg ttc ccc ctg gcc ccc agc agc aag agc acc	432
Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr	
130 135 140	
agc ggc ggc aca gcc gcc ctg ggc tgc ctg gtg aag gac tac ttc ccc	480
Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro	
145 150 155 160	
gag ccc gtg acc gtg agc tgg aac agc ggc gcc ttg acc agc ggc gtg	528
Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val	
165 170 175	
cac acc ttc ccc gcc gtg ctg cag agc agc ggc ctg tac agc ctg agc	576
His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser	
180 185 190	
agc gtg gtg acc gtg ccc agc agc agc ctg ggc acc cag acc tac atc	624
Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile	
195 200 205	
tgc aac gtg aac cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aaa cgc gtg	672
Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val	
210 215 220	
gag ccc aag agc tgc gac aag acc cac acc tgc ccc ccc tgc cct gcc	720
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala	
225 230 235 240	
ccc gag ctg ctg ggc gga ccc tcc gtg ttc ctg ttc ccc ccc aag ccc	768
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro	
245 250 255	
aag gac acc ctc atg atc agc cgg acc ccc gag gtg acc tgc gtg gtg	816
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val	
260 265 270	
gtg gac gtg agc cac gag gac ccc gag gtg aag ttc aac tgg tac gtg	864
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val	
275 280 285	
gac ggc gtg gag gtg cac aac gcc aag acc aag ccc cgg gag gag cag	912
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln	
290 295 300	
tac aac agc acc tac cgg gtg gtg agc gtg ctc acc gtg ctg cac cag	960
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln	
305 310 315 320	
gac tgg ctg aac ggc aag gag tac aag tgc aag gtg agc aac aag gcc	1008
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala	
325 330 335	
ctg cct gcc ccc atc gag aag acc atc agc aag gcc aag ggc cag ccc	1056
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro	
340 345 350	

ES 2 365 749 T3

cgg gag ccc cag gtg tac acc ctg ccc ccc agc cgg gag gag atg acc 1104
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 355 360 365

 aag aac cag gtg tcc ctc acc tgt ctg gtg aag ggc ttc tac ccc agc 1152
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 370 375 380

 gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aac ggc cag ccc gag aac aac tac 1200
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 385 390 395 400

 aag acc acc ccc cct gtg ctg gac agc gac ggc agc ttc ttc ctg tac 1248
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 405 410 415

 agc aag ctc acc gtg gac aag agc cgg tgg cag cag ggc aac gtg ttc 1296
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 420 425 430

 agc tgc agc gtg atg cac gag gcc ctg cac aac cac tac acc cag aag 1344
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 435 440 445

 agc ctg agc ctg agc ccc ggc aag 1368
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455

<210> 30

<211> 456

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada CR4348

<400> 30

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

 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30

 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

ES 2 365 749 T3

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Asn Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Lys Asp Lys Ser Tyr Tyr Tyr Gly Ser Gly Thr Ser Gly Gly Trp
100 105 110

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

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
130 135 140

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
145 150 155 160

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
165 170 175

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
180 185 190

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
195 200 205

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val
210 215 220

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
225 230 235 240

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
245 250 255

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
260 265 270

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val

ES 2 365 749 T3

275 280 285

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 290 295 300

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 305 310 315 320

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 325 330 335

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 340 345 350

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 355 360 365

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 370 375 380

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 385 390 395 400

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 405 410 415

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 420 425 430

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 435 440 445

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455

<210> 31

<211> 1359

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada CR4354

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1359)

<223>

<400> 31

cag	gtg	cag	ctg	gtg	cag	tct	ggg	gct	gag	gtg	agg	aag	cct	ggg	gcc	48
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Arg	Lys	Pro	Gly	Ala	
1				5					10					15		
tca	gtg	aag	ggt	tcc	tgc	aag	gca	tct	gga	tac	acc	ttc	acc	cac	tat	96
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	His	Tyr	
			20					25						30		
tat	atg	cac	tgg	gtg	cga	cag	gcc	cct	gga	caa	ggg	ctt	gag	tgg	atg	144
Tyr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
		35					40					45				
gga	ata	atc	aac	cct	agt	ggt	ggt	agc	aca	acc	tac	gca	cag	aag	ctc	192
Gly	Ile	Ile	Asn	Pro	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Thr	Tyr	Ala	Gln	Lys	Leu	
	50					55					60					
cag	ggc	aga	gtc	acc	atg	acc	agg	gac	acg	tcc	acg	agc	aca	gtc	tac	240
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Val	Tyr	
65					70					75					80	
atg	gag	ctg	agc	agc	ctg	aga	tct	gag	gac	acg	gcc	gtg	tat	tac	tgt	288
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90					95		
gcg	aga	gat	tgg	ggc	tcc	aat	tac	gtt	tgg	ggg	agt	tat	ccc	aag	tac	336
Ala	Arg	Asp	Trp	Gly	Ser	Asn	Tyr	Val	Trp	Gly	Ser	Tyr	Pro	Lys	Tyr	
			100					105					110			
tgg	ggc	cag	ggc	acc	ctg	gtg	acc	gtc	tcc	agc	gct	agc	acc	aag	ggc	384
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	
		115					120					125				
ccc	agc	gtg	ttc	ccc	ctg	gcc	ccc	agc	agc	aag	agc	acc	agc	ggc	ggc	432
Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	
		130				135					140					
aca	gcc	gcc	ctg	ggc	tgc	ctg	gtg	aag	gac	tac	ttc	ccc	gag	ccc	gtg	480
Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	
145					150					155					160	
acc	gtg	agc	tgg	aac	agc	ggc	gcc	ttg	acc	agc	ggc	gtg	cac	acc	ttc	528
Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	

ES 2 365 749 T3

	165	170	175	
ccc gcc gtg ctg cag agc agc ggc ctg tac agc ctg agc agc gtg gtg				576
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val	180	185	190	
acc gtg ccc agc agc agc ctg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg				624
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val	195	200	205	
aac cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aaa cgc gtg gag ccc aag				672
Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys	210	215	220	
agc tgc gac aag acc cac acc tgc ccc ccc tgc cct gcc ccc gag ctg				720
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu	225	230	235	240
ctg ggc gga ccc tcc gtg ttc ctg ttc ccc ccc aag ccc aag gac acc				768
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr	245	250	255	
ctc atg atc agc cgg acc ccc gag gtg acc tgc gtg gtg gtg gac gtg				816
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val	260	265	270	
agc cac gag gac ccc gag gtg aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg				864
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val	275	280	285	
gag gtg cac aac gcc aag acc aag ccc cgg gag gag cag tac aac agc				912
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser	290	295	300	
acc tac cgg gtg gtg agc gtg ctc acc gtg ctg cac cag gac tgg ctg				960
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu	305	310	315	320
aac ggc aag gag tac aag tgc aag gtg agc aac aag gcc ctg cct gcc				1008
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala	325	330	335	
ccc atc gag aag acc atc agc aag gcc aag ggc cag ccc cgg gag ccc				1056
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro	340	345	350	
cag gtg tac acc ctg ccc ccc agc cgg gag gag atg acc aag aac cag				1104
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln	355	360	365	
gtg tcc ctc acc tgt ctg gtg aag ggc ttc tac ccc agc gac atc gcc				1152
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala	370	375	380	
gtg gag tgg gag agc aac ggc cag ccc gag aac aac tac aag acc acc				1200
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr	385	390	395	400

ccc cct gtg ctg gac agc gac ggc agc ttc ttc ctg tac agc aag ctc 1248
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415

acc gtg gac aag agc cgg tgg cag cag ggc aac gtg ttc agc tgc agc 1296
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430

gtg atg cac gag gcc ctg cac aac cac tac acc cag aag agc ctg agc 1344
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 435 440 445

ctg agc ccc ggc aag 1359
 Leu Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 32

<211> 453

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada CR4354

<400> 32

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

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

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Thr Tyr Ala Gln Lys Leu
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Trp Gly Ser Asn Tyr Val Trp Gly Ser Tyr Pro Lys Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys
 210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320

ES 2 365 749 T3

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 33

<211> 645

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera CR4348

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(645)

<223>

<400> 33

tcg acg gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct	48
Ser Thr Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser	
1 5 10 15	
gta gga gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc att agc	96
Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser	
20 25 30	
agc tat tta aat tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc	144
Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu	
35 40 45	
ctg atc tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc	192
Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe	
50 55 60	
agt ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg	240
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu	
65 70 75 80	
caa cct gaa gat ttt gca act tac tac tgt caa cag agt tac agt acc	288
Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr	
85 90 95	
cct cgg acg ttc ggc caa ggg acc aag ctg gag atc aaa cgt gcg gcc	336
Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Ala	
100 105 110	
gca ccc agc gtg ttc atc ttc ccc ccc tcc gac gag cag ctg aag agc	384
Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser	
115 120 125	
ggc acc gcc agc gtg gtg tgc ctg ctg aac aac ttc tac ccc cgg gag	432
Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu	
130 135 140	
gcc aag gtg cag tgg aag gtg gac aac gcc ctg cag agc ggc aac agc	480
Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser	
145 150 155 160	
cag gag agc gtg acc gag cag gac agc aag gac tcc acc tac agc ctg	528
Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu	
165 170 175	
agc agc acc ctc acc ctg agc aag gcc gac tac gag aag cac aag gtg	576
Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val	
180 185 190	
tac gcc tgc gag gtg acc cac cag ggc ctg agc agc ccc gtg acc aag	624
Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys	
195 200 205	
agc ttc aac cgg ggc gag tgt	645
Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys	
210 215	

<210> 34

<211> 215

ES 2 365 749 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera CR4348

5 <400> 34

Ser Thr Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
1 5 10 15

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

Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

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

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

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

Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser

ES 2 365 749 T3

145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 35

<211> 648

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera CR4354

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(648)

<223>

<400> 35

cag tcc gtg ctg acc cag cct ccc tca gtg tct gcg gcc ccc gga cag 48
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15

aag gtc acc atc tcc tgt tct gga agc agc tcc aac atc gga agt aat 96
 Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30

act gta aac tgg tac cag cag ctc cca gga acg gcc ccc aaa ctc ctc 144
 Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

atc tat agt aat aat cag cgg ccc tca ggg atc cct gac cga ttc tct 192

Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser	
50	55 60
ggc tcc aag tct ggc acc tca gcc tcc ctg gcc atc agt ggg ctc caa	240
Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln	
65	70 75 80
tct gaa gat gag gct gat tat tac tgt gca gca tgg gat gac agc ctg	288
Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu	
	85 90 95
aat ggt ccg gtg ttc ggc gga ggc acc aag ctt acc gtg ctg ggc cag	336
Asn Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln	
	100 105 110
ccc aag gcc gct ccc agc gtg acc ctg ttc ccc ccc tcc tcc gag gag	384
Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu	
	115 120 125
ctg cag gcc aac aag gcc acc ctg gtg tgc ctc atc agc gac ttc tac	432
Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr	
	130 135 140
cct ggc gcc gtg acc gtg gcc tgg aag gcc gac agc agc ccc gtg aag	480
Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys	
	145 150 155 160
gcc ggc gtg gag acc acc acc ccc agc aag cag agc aac aac aag tac	528
Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr	
	165 170 175
gcc gcc agc agc tac ctg agc ctc acc ccc gag cag tgg aag agc cac	576
Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His	
	180 185 190
cgg agc tac agc tgc cag gtg acc cac gag ggc agc acc gtg gag aag	624
Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys	
	195 200 205
acc gtg gcc ccc acc gag tgc agc	648
Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser	
	210 215

<210> 36

<211> 216

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera CR4354

<400> 36

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

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30

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

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

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
 65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
 85 90 95

Asn Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
 115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
 130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
 145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
 165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
 180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
 195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215

	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Cebador antisentido HuCkappa	
	<400> 37	
	acactctccc ctgttgaagc tctt	24
	<210> 38	
	<211> 23	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador antisentido HuClambda2	
	<400> 38	
15	tgaacattct gtaggggcca ctg	23
	<210> 39	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Cebador antisentido HuClambda7	
	<400> 39	
	agagcattct gcaggggcca ctg	23
	<210> 40	
25	<211> 4941	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Vector PDV-C06	
30	<400> 40	

ES 2 365 749 T3

aagcttgcat gcaaattcta tttcaaggag acagtcataa tgaataacct attgcctacg 60
gcagccgctg gattgttatt actcgcggcc cagccggcca tggccgaggt gtttgactaa 120
tggggcgcgc ctcaaggaaac cctggtcacc gtctcgagcg gtacgggcgg ttcaggcggg 180
accggcagcg gcactggcgg gtcgacggaa attgtgctca cacagtctcc agccaccctg 240
tctttgtctc caggggaaag agccaccctc tcctgcaggg ccagtcagag tgtagcagc 300
tacttagcct ggtaccaaca gaaacctggc caggctccca ggctcctcat ctatgatgca 360
tccaacaggg ccactggcat cccagccagg ttcagtggca gtgggtctgg gacagacttc 420
actctacca tcagcagcct agagcctgaa gattttgcag tttattactg tcagcagcgt 480
agcaactggc ctccggcttt cggcggaggg accaaggtgg agatcaaacg tgcggccgca 540
catcatcatc accatcacgg ggccgcatat accgatattg aatgaaccg cctgggcaaa 600
ggggccgcat agactgttga aagtgttta gcaaacctc atacagaaaa ttcatttact 660
aacgtctgga aagacgacaa aactttagat cgttacgcta actatgaggg ctgtctgtgg 720
aatgctacag gcgttgtggt ttgtactggt gacgaaactc agtgttacgg tacatgggtt 780
cctattgggc ttgctatccc tgaaaatgag ggtggtggct ctgaggggtg cggttctgag 840
ggtggcgggt ctgaggggtg cggtaactaaa cctcctgagt acggtgatac acctattccg 900
ggctatactt atatcaacc tctcgacggc acttatccgc ctggtactga gcaaaacccc 960
gctaatecta atccttctct tgaggagtct cagectctta atactttcat gtttcagaat 1020
aataggttcc gaaataggca ggggtcatta actgtttata cgggcactgt tactcaaggc 1080
actgaccccg ttaaaactta ttaccagtac actcctgtat catcaaaagc catgtatgac 1140
gcttactgga acggtaaatt cagagactgc gctttccatt ctggctttaa tgaggatcca 1200
ttcgtttgag aatatcaagg ccaatcgtct gacctgcctc aacctcctgt caatgctggc 1260

ggcggctctg gtggtggttc tggtaggggc tctgaggggtg gcggctctga gggtagggcgt 1320
 tctgaggggtg gcggctctga gggtagggcgt tccggtagggc gctccgggttc cggtagatatt 1380
 gattatgaaa aaatggcaaa cgctaataag ggggctatga ccgaaaatgc cgatgaaaac 1440
 gcgctacagt ctgacgctaa aggcaaacctt gattctgtcg ctactgatta cggtagctgct 1500
 atcgatgggtt tcattgggtga cgtttccggc cttgctaattg gtaatgggtgc tactgggtgat 1560
 tttgctggct ctaattccca aatggctcaa gtcggtagcgt gtgataattc acctttaatg 1620
 aataatttcc gtcaatattt accttctttg cctcagtcgg ttgaatgtcg cccttatgtc 1680
 tttggcgtg gtaaaccata tgaattttct attgattgtg acaaaaataaa cttattccgt 1740
 ggtgtctttg cgtttctttt atatggtgcc accttatgt atgtattttc gacgtttgct 1800
 aacatactgc gtaataagga gtcttaataa gaattcactg gccgtcgttt tacaacgctg 1860
 tgactgggaa aacctggcg ttaccaact taatgcctt gcagcacatc cccctttcgc 1920
 cagctggcgt aatagcgaag aggcccgac cgatgcctt tccaacagt tgcgcagcct 1980
 gaatggcgaa tggcgctga tggggtattt tctccttac catctgtgcg gtatttcaca 2040
 ccgcatacgt caaagcaacc atagtacgcg cctgtagcg gcgcattaag cgcggcgggt 2100
 gtggtggtta cgcgcagcgt gaccgctaca cttgccagcg ccttagcgc cgtcctttc 2160
 gtttcttcc cttcctttct cgccagttc gccggctttc cccgtcaagc tctaaatcgg 2220
 gggctccctt tagggttccg atttagtgt ttacggcacc tgcacccaa aaaacttgat 2280
 ttgggtgatg gttcacgtag tgggcatcg cctgataga cggtttttcg ccctttgacg 2340
 ttggagtcca cgttctttaa tagtggactc ttgttccaaa ctggaacaac actcaaccct 2400
 atctcgggct attcttttga tttataaggg attttgccga tttcggccta ttggttaaaa 2460
 aatgagctga tttacaataa atttaacgcg aattttaaca aaatattaac gtttacaatt 2520
 ttatgggtgca ctctcagtac aatctgetct gatgccgat agttaagcca gccccgacac 2580
 ccgccaacac ccgctgacgc gccctgacgg gcttgtctgc tcccggcatc cgtttacaga 2640
 caagctgtga ccgtctccgg gagctgcattg tctcagaggt tttcacgctc atcacgaaa 2700
 cgcgcgagac gaaagggcct cgtgatacgc ctatttttat aggttaatgt catgataata 2760
 atggtttctt agacgtcagg tggcactttt cggggaaatg tgcgcggaac ccctatttgt 2820
 ttatttttct aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg 2880
 cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac atttccgtgt cgccttatt 2940
 cccttttttg cggcattttg ccttctgtt tttgctcacc cagaaacgct ggtgaaaagta 3000

aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga gtggggttaca tcgaactgga tctcaacagc 3060
 ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc caatgatgag cactttttaa 3120
 gttctgctat gtggcgcggt attatcccgt attgacgccg ggcaagagca actcggtcgc 3180
 cgatacact attctcagaa tgacttggtt gagtactcac cagtcacaga aaagcatctt 3240
 acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca taacatgag tgataacact 3300
 gcggccaact tacttctgac aacgatcggg ggaccgaagg agctaaccgc ttttttgac 3360
 aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac cggagctgaa tgaagccata 3420
 ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg caacaacggt gcgcaacta 3480
 ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat taatagactg gatggaggcg 3540
 gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg ctggctggtt tattgctgat 3600
 aatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg cagcactggg gccagatggt 3660
 aagcctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc aggcaactat ggatgaacga 3720
 aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc attggtaact gtcagaccaa 3780
 gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt ttaatttaa aaggatctag 3840
 gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt ttcgttccac 3900
 tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt tttctgcgc 3960
 gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaacca ccgctaccag cggtggtttg tttgccgat 4020
 caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgca gataccaaat 4080
 actgtccttc tagtgtagcc gtagttagge caccacttca agaactctgt agcaccgcct 4140
 acatacctcg ctctgctaata cctgttacca gtggctgctg ccagtggcga taagtcgtgt 4200
 cttaccgggt tggactcaag acgatagtta ccggataagg cgcagcggtc gggctgaacg 4260
 gggggttcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct acaccgaact gagataccta 4320
 cagcgtgagc tatgagaaaag cgccacgctt cccgaaggga gaaaggcggg caggatccg 4380
 gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg aaacgcctgg 4440
 tatctttata gtccctgctgg gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc 4500
 tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg cggccttttt acggttctctg 4560
 gccttttgct ggccttttgc tcacatgttc tttcctgcgt tateccctga ttctgtggat 4620
 aaccgtatta ccgccttga gtgagctgat accgctcgcc gcagccgaac gaccgagcgc 4680

agcgagtcag tgagcgagga agcggaagag cgcccaatac gcaaaccgcc tctccccgcg 4740
 cgttggccga ttcattaatg cagctggcac gacaggtttc ccgactggaa agcggggcagt 4800
 gagcgcaacg caattaatgt gagttagctc actcattagg caccccaggc tttacacttt 4860
 atgcttccgg ctcgatggtt gtgtggaatt gtgagcggat aacaatttca cacaggaaac 4920
 agctatgacc atgattacgc c 4941

<210> 41

<211> 24

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador antisentido HuClgG

<400> 41

gtccaccttg gtgtgctgg gctt

24

10 <210> 42

<211> 669

<212> PRT

<213> Virus del nilo occidental

<400> 42

Met Val Thr Leu Ser Asn Phe Gln Gly Lys Val Met Met Thr Val Asn
 1 5 10 15

Ala Thr Asp Val Thr Asp Val Ile Thr Ile Pro Thr Ala Ala Gly Lys
 20 25 30

Asn Leu Cys Ile Val Arg Ala Met Asp Val Gly Tyr Met Cys Asp Asp
 35 40 45

Thr Ile Thr Tyr Glu Cys Pro Val Leu Ser Ala Gly Asn Asp Pro Glu
 50 55 60

15

ES 2 365 749 T3

Asp Ile Asp Cys Trp Cys Thr Lys Ser Ala Val Tyr Val Arg Tyr Gly
 65 70 75 80
 Arg Cys Thr Lys Thr Arg His Ser Arg Arg Ser Arg Arg Ser Leu Thr
 85 90 95
 Val Gln Thr His Gly Glu Ser Thr Leu Ala Asn Lys Lys Gly Ala Trp
 100 105 110
 Met Asp Ser Thr Lys Ala Thr Arg Tyr Leu Val Lys Thr Glu Ser Trp
 115 120 125
 Ile Leu Arg Asn Pro Gly Tyr Ala Leu Val Ala Ala Val Ile Gly Trp
 130 135 140
 Met Leu Gly Ser Asn Thr Met Gln Arg Val Val Phe Val Val Leu Leu
 145 150 155 160
 Leu Leu Val Ala Pro Ala Tyr Ser Phe Asn Cys Leu Gly Met Ser Asn
 165 170 175
 Arg Asp Phe Leu Glu Gly Val Ser Gly Ala Thr Trp Val Asp Leu Val
 180 185 190
 Leu Glu Gly Asp Ser Cys Val Thr Ile Met Ser Lys Asp Lys Pro Thr
 195 200 205
 Ile Asp Val Lys Met Met Asn Met Glu Ala Ala Asn Leu Ala Glu Val
 210 215 220
 Arg Ser Tyr Cys Tyr Leu Ala Thr Val Ser Asp Leu Ser Thr Lys Ala
 225 230 235 240
 Ala Cys Pro Thr Met Gly Glu Ala His Asn Asp Lys Arg Ala Asp Pro
 245 250 255
 Ala Phe Val Cys Arg Gln Gly Val Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly
 260 265 270
 Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Ser Ile Asp Thr Cys Ala Lys Phe Ala
 275 280 285
 Cys Ser Thr Lys Ala Ile Gly Arg Thr Ile Leu Lys Glu Asn Ile Lys

ES 2 365 749 T3

290						295						300					
Tyr	Glu	Val	Ala	Ile	Phe	Val	His	Gly	Pro	Thr	Thr	Val	Glu	Ser	His		
305					310					315					320		
Gly	Asn	Tyr	Ser	Thr	Gln	Val	Gly	Ala	Thr	Gln	Ala	Gly	Arg	Phe	Ser		
				325					330					335			
Ile	Thr	Pro	Ala	Ala	Pro	Ser	Tyr	Thr	Leu	Lys	Leu	Gly	Glu	Tyr	Gly		
			340					345					350				
Glu	Val	Thr	Val	Asp	Cys	Glu	Pro	Arg	Ser	Gly	Ile	Asp	Thr	Asn	Ala		
		355					360					365					
Tyr	Tyr	Val	Met	Thr	Val	Gly	Thr	Lys	Thr	Phe	Leu	Val	His	Arg	Glu		
	370					375					380						
Trp	Phe	Met	Asp	Leu	Asn	Leu	Pro	Trp	Ser	Ser	Ala	Gly	Ser	Thr	Val		
385					390					395					400		
Trp	Arg	Asn	Arg	Glu	Thr	Leu	Met	Glu	Phe	Glu	Glu	Pro	His	Ala	Thr		
				405					410					415			
Lys	Gln	Ser	Val	Ile	Ala	Leu	Gly	Ser	Gln	Glu	Gly	Ala	Leu	His	Gln		
			420					425					430				
Ala	Leu	Ala	Gly	Ala	Ile	Pro	Val	Glu	Phe	Ser	Ser	Asn	Thr	Val	Lys		
		435					440					445					
Leu	Thr	Ser	Gly	His	Leu	Lys	Cys	Arg	Val	Lys	Met	Glu	Lys	Leu	Gln		
	450					455					460						
Leu	Lys	Gly	Thr	Thr	Tyr	Gly	Val	Cys	Ser	Lys	Ala	Phe	Lys	Phe	Leu		
465					470					475					480		
Gly	Thr	Pro	Ala	Asp	Thr	Gly	His	Gly	Thr	Val	Val	Leu	Glu	Leu	Gln		
				485					490					495			
Tyr	Thr	Gly	Thr	Asp	Gly	Pro	Cys	Lys	Val	Pro	Ile	Ser	Ser	Val	Ala		
			500					505					510				
Ser	Leu	Asn	Asp	Leu	Thr	Pro	Val	Gly	Arg	Leu	Val	Thr	Val	Asn	Pro		
		515					520					525					

Phe Val Ser Val Ala Thr Ala Asn Ala Lys Val Leu Ile Glu Leu Glu
 530 535 540

Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Val Val Gly Arg Gly Glu Gln Gln
 545 550 555 560 565 566

Ile Asn His His Trp His Lys Ser Gly Ser Ser Ile Gly Lys Ala Phe
 565 570 575

Thr Thr Thr Leu Lys Gly Ala Gln Arg Leu Ala Ala Leu Gly Asp Thr
 580 585 590

Ala Trp Asp Phe Gly Ser Val Gly Gly Val Phe Thr Ser Val Gly Lys
 595 600 605

Ala Val His Gln Val Phe Gly Gly Ala Phe Arg Ser Leu Phe Gly Gly
 610 615 620

Met Ser Trp Ile Thr Gln Gly Leu Leu Gly Ala Leu Leu Leu Trp Met
 625 630 635 640

Gly Ile Asn Ala Arg Asp Arg Ser Ile Ala Leu Thr Phe Leu Ala Val
 645 650 655

Gly Gly Val Leu Leu Phe Leu Ser Val Asn Val His Ala
 660 665

<210> 43

<211> 23

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador CMV-Spe

<400> 43

ccatgttgac atgattatt gac

23

10 <210> 44

<211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Cebador WNV-E-95 REV

	<400> 44	
	gctctagact tgccgatgct gctgcc	26
	<210> 45	
	<211> 40	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador clefsmaquwnv	
	<400> 45	
10	ggaattcagc atggcccagg tgaccctgag caactccag	40
	<210> 46	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador inverso WNVmychis	
	<400> 46	
	gactagtcaa ctcaatgggtg atgggtg	26
	<210> 47	
20	<211> 6760	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Vector pSyn-C18-HCgammal	
25	<400> 47	

ES 2 365 749 T3

ctagcaccaa gggccccagc gtgttcccc tggccccag cagcaagagc accagcggcg 60
 gcacagccgc cctgggctgc ctggtgaagg actacttccc cgagcccgtg accgtgagct 120
 ggaacagcgg cgccttgacc agcggcgtgc acaccttccc cgccgtgctg cagagcagcg 180
 gcctgtacag cctgagcagc gtggtgaccg tgcccagcag cagcctgggc acccagacct 240
 acatctgcaa cgtgaaccac aagcccagca acaccaaggt ggacaaacgc gtggagccca 300
 agagctgcga caagaccac acctgcccc cctgccctgc ccccgagctg ctgggcggac 360
 cctccgtgtt cctgttcccc cccaagccca aggacacct catgatcagc cggacccccg 420
 aggtgacctg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaggacce cgaggtgaag ttcaactggt 480
 acgtggacgg cgtggagggtg cacaacgcca agaccaagcc ccgggaggag cagtacaaca 540
 gcacctaccg ggtggtgagc gtgctcaccg tgctgcacca ggactggctg aacggcaagg 600
 agtacaagtg caaggtgagc aacaaggccc tgctgcccc catcgagaag accatcagca 660
 aggccaaggg ccagccccgg gagccccagg tgtacacct gccccccagc cgggaggaga 720
 tgaccaagaa ccaggtgtcc ctcacctgtc tgggtgaaggg cttctacccc agcgacatcg 780
 ccgtggagtg ggagagcaac ggcagcccc agaacaacta caagaccacc ccccctgtgc 840
 tggacagega cggcagcttc ttctgtaca gcaagctcac cgtggacaag agccggtggc 900
 agcagggcaa cgtgttcagc tgcagcgtga tgcacgaggc cctgcacaac cactacacce 960
 agaagagcct gagcctgagc cccggcaagt gataatctag agggcccgtt taaaccgct 1020
 gatcagcctc gactgtgctt tctagttgcc agccatctgt tgtttgcccc tccccctgc 1080
 cttccttgac cctggaaggt gccactccca ctgtcctttc ctaataaaat gaggaaattg 1140
 catcgcattg tctgagtagg tgtcattcta ttctgggggg tggggtgggg caggacagca 1200
 agggggagga ttgggaagac aatagcaggc atgctgggga tgcggtgggc tctatggctt 1260
 ctgaggcggg aagaaccagc tggggctcta ggggtatcc ccacgcgccc tgtagcggcg 1320

cattaagcgc ggcgggtgtg gtggttacgc gcagcgtgac cgctacactt gccagcgc 1380
tagcgcgccgc tccttctcgt ttcttccctt cctttctcgc cacgttcgcc ggctttcccc 1440
gtcaagctct aaatcggggg ctccctttag ggttccgatt tagtgcttta cggcacctcg 1500
accccaaaaa acttgattag ggtgatgggt cacgtagtgg gccatcgccc tgatagacgg 1560
tttttcgccc tttgacgttg gagtccacgt tctttaatag tggactcttg ttccaaactg 1620
gaacaacact caaccctatc tcggtctatt cttttgattt ataagggatt ttgccgattt 1680
cggcctattg gttaaaaaat gagctgattt aacaaaaatt taacgcgaat taattctgtg 1740
gaatgtgtgt cagttagggg gtggaaagtc cccaggtccc ccagcaggca gaagtatgca 1800
aagcatgcat ctcaattagt cagcaaccag gtgtggaaag tccccaggct ccccagcagg 1860
cagaagtatg caaagcatgc atctcaatta gtcagcaacc atagtcccgc ccctaactcc 1920
gcccattccc cccctaactc cgcccagttc cgcccattct ccgcccctatg gctgactaat 1980
tttttttatt tatgcagagg ccgaggccgc ctctgcctct gagctattcc agaagtagtg 2040
aggaggcttt tttggaggcc taggcttttg caaaaagctc ccgggagctt gtatatccat 2100
tttcggatct gatcaagaga caggatgagg atcgtttcgc atgattgaac aagatggatt 2160
gcacgcaggt tctccggccg cttgggtgga gaggtattc ggctatgact gggcacaaca 2220
gacaatcggc tgctctgatg ccgccgtggt ccggctgtca gcgcaggggc gcccggttct 2280
ttttgtcaag accgacctgt ccggtgccct gaatgaactg caggacgagg cagcgcggct 2340
atcgtggctg gccacgacgg gcgttccttg cgcagctgtg ctcgacgttg tcaactgaagc 2400
gggaagggac tggctgctat tgggcgaagt gccggggcag gatctcctgt catctcacct 2460
tgctcctgcc gagaaagtat ccatcatggc tgatgcaatg cggcggctgc atacgcttga 2520
tcgggtacc tgcccattcg accaccaagc gaaacatcgc atcgagcgag cacgtactcg 2580
gatggaagcc ggtcttgctg atcaggatga tctggacgaa gagcatcagg ggctcgcgcc 2640
agccgaactg ttcgccaggc tcaaggcgcg catgcccgcg ggcgaggatc tcgtcgtgac 2700
ccatggcgat gcctgcttgc cgaatatcat ggtggaaaat ggccgctttt ctggattcat 2760
cgactgtggc cggctgggtg tggcggaccg ctatcaggac atagcgttgg ctaccctga 2820
tattgctgaa gagcttggcg gcgaatgggc tgaccgcttc ctctgctttt acggtatcgc 2880
cgctcccgat tcgcagcgcg tcgccttcta tcgccttctt gacgagttct tetgagcggg 2940
actctggggg tcgaaatgac cgaccaagcg acgccaacc tgccatcacg agatttcgat 3000
tccaccgccc ccttctatga aaggttgggc ttcggaatcg ttttccggga cgccggctgg 3060

atgatcctcc agcgcgggga tctcatgctg gagttcttcg cccaccccaa cttgtttatt 3120
gcagcttata atggttacaa ataaagcaat agcatcacia atttcacaaa taaagcattt 3180
ttttcactgc attctagttg tggtttgtcc aaactcatca atgtatctta tcatgtctgt 3240
ataccgtcga cctctagcta gagcttggcg taatcatggt catagctggt tctgtgtga 3300
aattgttatc cgctcacaat tccacacaac atacgagccg gaagcataaa gtgtaaagcc 3360
tggggtgctt aatgagttag ctaactcaca ttaattgctg tgcgctcact gcccgcttcc 3420
cagtcgggaa acctgtcgtg ccagctgcat taatgaatcg gccaacgcgc ggggagaggc 3480
ggtttgcgta ttgggcgctc ttccgcttcc tcgctcactg actcgtcgtg ctcggtcgtt 3540
cggctgcggc gagcggatc agctcactca aaggcggtaa tacggttacc cacagaatca 3600
ggggataacg caggaaagaa catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa 3660
aaggccgctg tgctggcgtt tttccatagg ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat 3720
cgacgctcaa gtcagaggtg gcgaaaccgc acaggactat aaagatacca ggcgtttccc 3780
cctggaagct cctcgtcgtg ctctcctggt ccgaccctgc cgcttaccgg atacctgtcc 3840
gcctttctcc cttegggaag cgtggcgtt tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt 3900
tcggtgtagg tcgttcgctc caagctgggc tgtgtgcacg aacccccctg tcagcccgac 3960
cgctgcgctt tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cggtaaagaca cgacttatcg 4020
ccactggcag cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cgggtctaca 4080
gagttcttga agtggtggcc taactacggc tacactagaa gaacagtatt tggatctctg 4140
gctctgctga agccagttac ctccggaaaa agagttggta gctcttgatc cggcaaacia 4200
accaccgctg gtagcgggtt ttttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaaggga 4260
tctcaagaag atcctttgat cttttctacg gggctctgacg ctcaagtggaa cgaaaactca 4320
cgtaaggga ttttggctcat gagattatca aaaaggatct tcacctagat cttttaaat 4380
taaaaatgaa gttttaaatc aatctaaagt atatatgagt aaacttggtc tgacagttac 4440
caatgcttaa tcagtgaggc acctatctca gcgatctgtc tatttcgttc atccatagtt 4500
gcctgactcc ccgtcgtgta gataactacg atacgggagg gcttaccatc tggccccagt 4560
gctgcaatga taccgcgaga cccacgctca ccggctccag atttalcagc aataaaccag 4620
ccagccggaa gggccgagcg cagaagtggc cctgcaactt tatccgcctc catccagtct 4680
attaattggt gccgggaagc tagagtaagt agttegccag ttaatagttt gcgcaacggt 4740

gttgccattg ctacaggcat cgtgggtgtca cgctcgtcgt ttggtatggc ttcattcagc 4800
 tccggttccc aacgatcaag gcgagttaca tgatccccc a tgttggtgcaa aaaagcggtt 4860
 agctccttcg gtccctccgat cgttggtcaga agtaagttgg ccgcagtggt atcactcatg 4920
 gttatggcag cactgcataa ttctcttact gtcattgccaat ccgtaagatg cttttctgtg 4980
 actggtgagt actcaaccaa gtcattctga gaatagtgtg tgcggcgacc gagttgctct 5040
 tgccccggcg caatacggga taataccgcg ccacatagca gaactttaaa agtgctcatc 5100
 attgaaaaac gttcttcggg gcgaaaactc tcaaggatct taccgctggt gagatccagt 5160
 tcgatgtaac ccaactcgtc acccaactga tcttcagcat cttttacttt caccagcgtt 5220
 tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaaat gccgcaaaaa agggaataag ggcgacacgg 5280
 aatggtgaa tactcatact cttccttttt caatattatt gaagcattta tcagggttat 5340
 tgtctcatga gggatacat atttgaatgt atttagaaaa ataaacaaat aggggttccg 5400
 cgcacatttc cccgaaaagt gccacctgac gtcgacggat cgggagatct cccgatcccc 5460
 tatggtgcac tctcagtaca atctgctctg atgccgcata gttaagccag tatctgctcc 5520
 ctgcttgtgt gttggaggtc gctgagtagt gcgagagcaa aatttaagct acaacaaggc 5580
 aaggcttgac cgacaattgc atgaagaatc tgetttaggt taggcgtttt gcgctgcttc 5640
 gctaggtggt caatattggc cattagccat attattcatt ggttatatag cataaatcaa 5700
 tattggctat tggccattgc atacgttgta lccatatcat aatatgtaca ttatattgg 5760
 ctcatgtcca acattaccgc catggtgaca ttgattattg actagttatt aatagtaatc 5820
 aattacgggg tcattagttc atagcccata tatggagttc cgcgttacat aacttacggt 5880
 aatggcccc cctggctgac cgcccaacga cccccgcca ttgacgtcaa taatgacgta 5940
 tgtteccata gtaacgcaa tagggacttt ccattgacgt caatgggtgg agtatttacg 6000
 gtaaactgcc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg ccaagtacgc cccctattga 6060
 cgtcaatgac ggtaaatggc ccgcctggca ttatgccag tacatgacct tatgggactt 6120
 tctacttgg cagtacatct acgtattagt catcgctatt accatggtga tgcggttttg 6180
 gcagtacatc aatgggcgtg gatagcgggt tgactcacgg ggatttcaa gtctccacc 6240
 cattgacgtc aatgggagtt tgttttggca ccaaaatcaa cgggactttc caaaatgtcg 6300
 taacaactcc gccccattga cgcaaatggg cggtaggcgt gtacgggtgg aggtctatat 6360
 aagcagagct cgtttagtga accgtcagat cgcctggaga cgccatccac gctgttttga 6420
 cctccataga agacaccggg accgatccag cctccgcggc cgggaacggt gcattggaag 6480

ES 2 365 749 T3

ctggcctgga tggcctgact ctcttaggta gccttgcaga agttggtcgt gaggcactgg 6540
 gcaggtaagt atcaaggta caagacaggt ttaaggagat caatagaaac tgggcttgtc 6600
 gagacagaga agactcttgc gtttctgata ggcacctatt ggtcttactg acatccactt 6660
 tgcctttctc tccacaggtg tccactccca gttcaattac agctcgccac catggcctgc 6720
 cccggcttcc tgtgggccct ggtgatcagc acctgectgg 6760

<210> 48

<211> 6283

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Vector pSyn-C04-Clambda

<400> 48

gacggatcgg gagatctccc gateccctat ggtgcactct cagtacaatc tgctctgatg 60
 ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtggt ggaggtcgct gagtagtgcg 120
 cgagcaaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgttaa ttaacatgaa 180
 gaatctgctt agggttagc gttttgcgct gcttcgctag gtggtaata ttggcatta 240
 gccatattat tcattggta tatagcataa atcaatattg gctattggcc attgcatagc 300
 ttgtatccat atcataatat gtacatttat attggctcat gtccaacatt accgcatgt 360
 tgacattgat tattgactag ttattaatag taatcaatta cggggtcatt agttcatagc 420
 ccatatatgg agttccgctg tacataactt acggtaaatg gcccgcctgg ctgaccgccc 480
 aacgaccccc gccattgac gtcaataatg acgtatgttc ccatagtaac gccaataggg 540
 actttccatt gacgtcaatg ggtggagtat ttacggtaaa ctgcccactt ggcagtacat 600
 caagtgtatc atatgccaaag tacgccccct attgacgtca atgacggtaa atggcccgcc 660
 tggcattatg cccagtacat gaccttatgg gactttccta cttggcagta catctacgta 720
 ttagtcatcg ctattaccat ggtgatgcgg ttttggcagt acatcaatgg gcgtggatag 780
 cggtttgact cacggggatt tccaagtctc cacccattg acgtcaatgg gagtttgttt 840
 tggcaccaaaa atcaacggga ctttcaaaa tgtcgtaaca actccgcccc attgacgcaa 900

atgggcgcta ggcgtgtacg gtgggaggtc tatataagca gagctcgttt agtgaaccgt 960
cagatcgctt ggagacgcca tccacgctgt tttgacctcc atagaagaca ccgggaccga 1020
tccagcctcc gcggccggga acggtgcatt ggaatcgatg actctcttag gtagccttgc 1080
agaagttagt cgtgaggcac tgggcaggta agtatcaagg ttacaagaca ggtttaagga 1140
gatcaataga aactgggctt gtcgagacag agaagactct tgcgtttctg ataggcacct 1200
attggtctta ctgacatcca ctttgccttt ctctccacag gtgtccactc ccagttcaat 1260
tacagctcgc caccatggcc tgccccggct tctgtgggc cctggtgatc agcacctgcc 1320
tcgagatccc cggaccgcgg ccgcaagctt accgtgctgg gccagcccaa ggccgctccc 1380
agcgtgacce tgttcccccc ctctccgag gagctgcagg ccaacaaggc caccctgggtg 1440
tgcctcatca gcgacttcta ccctggcgcc gtgaccgtgg cctggaaggc cgacagcagc 1500
cccgtgaagg ccggcgtgga gaccaccacc cccagcaagc agagcaaca caagtacgcc 1560
gccagcagct acctgagcct ccccccgag cagtggaaga gccaccggag ctacagctgc 1620
caggtgacce acgagggcag caccgtggag aagaccgtgg cccccaccga gtgcagctaa 1680
tagacttaag ttaaacccgc tgatcagcct cgactgtgcc ttctagttgc cagccatctg 1740
ttgtttgccc ctcccccggt ccttccttga ccctggaagg tgccactccc actgtccttt 1800
cctaataaaa tgaggaaatt gcatcgcatt gtctgagtag gtgtcattct attctggggg 1860
gtgggggtggg gcaggacagc aagggggagg attgggaaga caatagcagg catgctgggg 1920
atgcggtggg ctctatggct tctgaggcgg aaagaaccag ctggggctct agggggatc 1980
cccacgcgcc ctgtagcggc gcattaagcg cggcgggtgt ggtggttacg cgcagcgtga 2040
ccgctacact tgccagcgcc cttagcggcg ctcttttcgc tttcttcctt tcctttctcg 2100
ccacgttcgc cggtttccc cgtcaagctc taaatcgggg gctcccttta gggttccgat 2160
ttagtgcttt acggcacctc gaccccaaaa aacttgatta gggatgatgg tcaagtagtg 2220
ggccatcgcc ctgatagacg gtttttcgcc ctttgacgtt ggagtccacg ttctttaata 2280
gtggactctt gttccaaact ggaacaacac tcaaccctat ctcggtctat tcttttgatt 2340
tataagggat tttggccatt tcggcctatt ggttaaaaaa tgagctgatt taacaaaaat 2400
ttaacgcgaa ttaattctgt ggaatgtgtg tcagttaggg tgtggaaagt ccccaggctc 2460
cccagcaggc agaagtatgc aaagcatgca tctcaattag tcagcaacca ggtgtggaaa 2520
gtccccaggc tccccagcag gcagaagtat gcaaagcatg catctcaatt agtcagcaac 2580
catagteccg ccctaactc cgccatccc gccctaact ccgcccagtt ccgcccattc 2640

tccgccccat	ggctgactaa	tttttttat	ttatgcagag	gccgaggccg	cctctgcctc	2700
tgagctattc	cagaagtagt	gaggaggctt	ttttggaggc	ctaggctttt	gcaaaaagct	2760
cccgggagct	tgtatatcca	ttttcggatc	tgatcagcac	gtgatgaaaa	agcctgaact	2820
caccgcgacg	tctgtcgaga	agtttctgat	cgaaaagttc	gacagcgtct	ccgacctgat	2880
gcagctctcg	gagggcgaag	aatctcgtgc	tttcagcttc	gatgtaggag	ggcgtggata	2940
tgtcctgcgg	gtaaatagct	gcgccgatgg	tttctacaaa	gatcgttatg	tttatcggca	3000
ctttgcatcg	gccgcgctcc	cgattccgga	agtgtttgac	attggggaat	tcagcgagag	3060
cctgacctat	tgcatctccc	gccgtgcaca	gggtgtcacg	ttgcaagacc	tgctgaaac	3120
cgaactgccc	gctgttctgc	agccggtcgc	ggaggccatg	gatgcgatcg	ctgcggccga	3180
tcttagccag	acgagcgggt	tcggccccatt	cggaccgcaa	ggaatcggtc	aatacactac	3240
atggcgtgat	ttcatatgcg	cgattgctga	tccccatgtg	tatcactggc	aaactgtgat	3300
ggacgacacc	gtcagtgctg	ccgtcgcgca	ggctctcgat	gagctgatgc	tttgggccga	3360
ggactgcccc	gaagtccggc	acctcgtgca	cgcggatttc	ggctccaaca	atgtcctgac	3420
ggacaatggc	cgcataacag	cggtcattga	ctggagcgag	gcgatgttcg	gggattccca	3480
atacgaggtc	gccaacatct	tcttctggag	gccgtggttg	gcttgtatgg	agcagcagac	3540
gcgctacttc	gagcggaggc	atccggagct	tgcaaggatcg	ccgcggctcc	ggcgtatat	3600
gctccgcatt	ggtcttgacc	aactctatca	gagcttgggt	gacggcaatt	tcgatgatgc	3660
agcttggggc	cagggctgat	gcgacgcaat	cgtccgatcc	ggagccggga	ctgtcggggc	3720
tacacaaatc	gcccgcagaa	gcgcggccgt	ctggaccgat	ggctgtgtag	aagtactcgc	3780
cgatagtgga	aaccgacgcc	ccagcactcg	tccgagggca	aaggaatagc	acgtgctacg	3840
agatttcgat	tccaccgccg	ccttctatga	aaggttgggc	ttcggaatcg	ttttccggga	3900
cgcggctgg	atgatcctcc	agcgcgggga	tctcatgctg	gagttcttcg	cccaccccaa	3960
cttgtttatt	gcagcttata	atggttacia	ataaagcaat	agcatcacia	atttacaaaa	4020
taaagcattt	ttttcactgc	attctagttg	tggtttgtcc	aaactcatca	atgtatctta	4080
tcatgtctgt	ataccgtcga	cctctagcta	gagcttggcg	taatcatggt	catagetgtt	4140
tcctgtgtga	aattgttatc	cgctcacaat	tccacacaac	atagagccg	gaagcataaa	4200
gtgtaaagcc	tggggtgcct	aatgagtgag	ctaactcaca	ttaattgcgt	tgcgctcaet	4260
gcccgccttc	cagtcgggaa	acctgtcgtg	ccagctgcat	taatgaatcg	gccaacgcgc	4320

ES 2 365 749 T3

ggggagaggc ggtttgcgta ttgggcgctc ttccgcttcc tcgctcactg actcgctgcg 4380
 ctcggtcggt cggtgcggc gagcggatc agctcactca aaggcggtaa tacggttacc 4440
 cacagaatca ggggataacg caggaaagaa catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag 4500
 gaaccgtaaa aaggccgcgt tgctggcggt tttccatagg ctccgcccc ctgacgagca 4560
 tcacaaaaat cgacgtcaa gtcagaggtg gcgaaacccg acaggactat aaagatacca 4620
 ggcgtttccc cctggaagct cctcgtgcg ctctcctggt cgcacctgc cgcttaccgg 4680
 atacctgtcc gcctttctcc cttcgggaag cgtggcgctt tctcatagct cacgctgtag 4740
 gtatctcagt tcggtgtagg tcgttcgctc caagctgggc tgtgtgcacg aacccccgt 4800
 tcagcccagc cgtgcgcct tatccggtaa ctatcgtctt gaggccaacc cggtaaagaca 4860
 cgacttateg cactggcag cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg 4920
 cggtgctaca gagttctga agtggggcc taactacggc tacactagaa gaacagtatt 4980
 tggtatctgc gctctgctga agccagttac cttcggaaaa agagttggta gctcttgatc 5040
 cggcaaaaa accaccgctg gtagcggttt ttttgtttgc aagcagcaga ttacgcgag 5100
 aaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg gggctctgacg ctcagtggaa 5160
 cgaaaactca cgtaaggga ttttggcat gagattatca aaaaggatct tcacctagat 5220
 ctttttaaat taaaaatgaa gttttaaate aatctaaagt atatatgagt aaacttggtc 5280
 tgacagttac caatgcttaa tcagtgaggc acctatctca gcgatctgct tatttcgctc 5340
 atccatagtt gcctgactcc ccgtcgtgta gataactacg atacgggagg gcttaccatc 5400
 tggccccagt gctgcaatga taccgcgaga cccacgctca ccggctccag atttatcagc 5460
 aataaaccag ccagccggaa gggccgagcg cagaagtggc cctgcaactt tatccgctc 5520
 catccagtct attaattggt gccgggaagc tagagtaagt agttcgccag ttaatagttt 5580
 gcgcaacggt gttgccattg ctacaggcat cgtgggtgca cgctcgtcgt ttggtatggc 5640
 ttcattcagc tccggttccc aacgatcaag gcgagttaca tgatcccca tgttggtgcaa 5700
 aaaagcgggt agctccttcg gtctctcgat cgttgcaga agtaagttgg ccgcagtgtt 5760
 atcactcatg gttatggcag cactgcataa ttctcttact gtcatgcat ccgtaagatg 5820
 cttttctgtg actggtgagt actcaaccaa gtcattctga gaatagtgtg tgccggcagc 5880
 gaggctctct tgcccggcgt caatacggga taataccgcg ccacatagca gaactttaa 5940
 agtgctcatc attggaaaac gttcttcggg gcgaaaactc tcaaggatct taccgctgtt 6000
 gagatccagt tcgatgtaac cactcgtgc acccaactga tcttcagcat cttttacttt 6060

caccagcgtt tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaat gccgcaaaa agggaataag 6120
 ggcgacacgg aatggtgaa tactcact cttcctttt caatattatt gaagcattta 6180
 tcagggttat tgtctcatga gcggatacat atttgaatgt atttagaaaa ataaacaaat 6240
 aggggttccg cgcacatttc cccgaaaagt gccacctgac gtc 6283

<210> 49

<211> 52

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido 5L-C

<400> 49

acctgtctcg agtttccat ggctcagtc gtgctgacct agcctccctc ag 52

10 <210> 50

<211> 28

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Oligonucleótido sy3L-Cmod

<400> 50

ccagcacggt aagcttggtg cctccgcc 28

<210> 51

<211> 47

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido 5H-A

<400> 51

25 acctgtcttg aatttccat ggcccaggtg cagctggtgc agtctgg 47

<210> 52

<211> 47

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Oligonucleótido sy3H-A

<400> 52
 gcccttggtg ctagcgctgg agacggtcac cagggtgcc tggcccc 47

<210> 53
 <211> 10515

5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Vector plg-C911-HCgammal
 <220>

10 <221> misc_feature
 <222> (1326)..(5076)
 <223> Relleno
 <400> 53

tcgacggatc gggagatctc ccgatcccct atggtgcaact ctcagtacaa tctgctctga 60
 tgccgcatag ttaagccagt atctgctccc tgcttggtgtg ttggagggtcg ctgagtagtg 120
 cgcgagcaaa atttaagcta caacaaggca aggcttgacc gacaattgca tgaagaatct 180

gcttagggtt aggcgttttg cgctgcttcg ctaggtggtc aatattggcc attagccata 240
ttattcattg gttatatagc ataaatcaat attggctatt ggccattgca tacgttgtat 300
ccatatcata atatgtacat ttatattggc tcatgtccaa cattaccgcc atggtgacat 360
tgattattga ctagttatta atagtaatca attacggggc cattagttca tagcccatat 420
atggagtcc gcgttacata acttacggta aatggcccgc ctggctgacc gcccacacgac 480
ccccgccat tgacgtcaat aatgacgtat gttcccatag taacgccaat agggactttc 540
cattgacgtc aatgggtgga gtatctacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagtg 600
tatcatatgc caagtacgcc ccctattgac gtcaatgacg gtaaattggcc cgcctggcat 660
tatgccagc acatgacctt atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc 720
atcgctatta ccatggtgat gcggttttgg cagtacatca atgggcgtgg atagcggttt 780
gactcacggg gatttccaag tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac 840
caaatcaac gggactttcc aaaatgtcgt aacaactccg cccattgac gcaaatgggc 900
ggtagggcgtg tacgggtgga ggtctatata agcagagctc gtttagtgaa ccgtcagatc 960
gcctggagac gccatccacg ctgttttgac ctccatagaa gacaccggga ccgatccagc 1020
ctccgcggcc gggaacggtg cattggaagc tggcctggat atcctgactc tcttaggtag 1080
ccttgcagaa gttggtcgtg aggcaactggg caggtaagta tcaaggttac aagacaggtt 1140
taaggagatc aatagaaact gggcttctcg agacagagaa gactcttgcg tttctgatag 1200
gcacctattg gtcttactga catccacttt gcctttctct ccacaggtgt cactcccag 1260
ttcaattaca gctcgcacc atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtactgctgc 1320
tggcccagcc ggccagtgac cttgaccggt gcaccacttt tgatgatgtt caagctceta 1380
attacactca acatacttca tctatgaggg gggtttacta tctgatgaa atttttagat 1440
cggacactct ttatttaact caggatttat ttcttcatt ttattetaat gttacaggg 1500
ttcatactat taatcatacg tttggcaacc ctgtcatacc ttttaaggat ggtatttatt 1560
ttgctgccac agagaaatca aatggtgtcc gtggttgggt ttttggttct accatgaaca 1620
acaagtcaca gtcggtgatt attattaaca attctactaa tgttgttata cgagcatgta 1680
actttgaatt gtgtgacaac cctttctttg ctgtttctaa acccatgggt acacagacac 1740
atactatgat attcgataat gcatttaatt gcactttcga gtacatatct gatgcctttt 1800
cgcttgatgt ttcagaaaag tcaggtaatt ttaaacactt acgagagttt gtgtttaaaa 1860
ataaagatgg gtttctctat gtttataagg gctatcaacc tatagatgta gttcgtgatc 1920

taccttctgg	ttttaacact	ttgaaaccta	ttttaagtt	gcctcttggg	attaacatta	1980
caaattttag	agccattctt	acagcctttt	cacctgctca	agacatttgg	ggcacgtcag	2040
ctgcagccta	ttttgttggc	tatttaaagc	caactacatt	tatgctcaag	tatgatgaaa	2100
atggtacaat	cacagatgct	gttgattggt	ctcaaatcc	acttgctgaa	ctcaaatgct	2160
ctgttaagag	ctttgagatt	gacaaaggaa	tttaccagac	ctctaatttc	agggttgttc	2220
cctcaggaga	tgttgtgaga	ttcctaata	ttacaaactt	gtgtcctttt	ggagaggttt	2280
ttaatgctac	taaattccct	tctgtctatg	catgggagag	aaaaaaaaatt	tctaattgtg	2340
ttgctgatta	ctctgtgctc	tacaactcaa	catttttttc	aacctttaag	tgctatggcg	2400
tttctgccac	taagttgaat	gatctttgct	tctccaatgt	ctatgcagat	tcttttgtag	2460
tcaagggaga	tgatgtaaga	caaatagcgc	caggacaaac	tggtgttatt	gctgattata	2520
attataaatt	gccagatgat	ttcatgggtt	gtgtccttgc	ttggaatact	aggaacattg	2580
atgctacttc	aactggtaat	tataattata	aatataggta	tcttagacat	ggcaagctta	2640
ggccctttga	gagagacata	tctaattgtc	ctttctcccc	tgatggcaaa	ccttgcaccc	2700
cacctgctct	taattgttat	tggccattaa	atgattatgg	tttttacacc	actactggca	2760
ttggctacca	accttacaga	gttgtagtac	tttcttttga	acttttaaat	gcaccggcca	2820
cggtttgtgg	acaaaatta	tccactgacc	ttattaagaa	ccagtgtgtc	aattttaatt	2880
ttaatggact	cactgg tact	ggtgtgttaa	ctccttcttc	aaagagattt	caaccatttc	2940
aacaatttgg	ccgtgatggt	tctgatttca	ctgattccgt	tcgagatcct	aaaacatctg	3000
aaatattaga	catttcacct	tgctcttttg	ggggtgtaag	tgtaattaca	cctggaacaa	3060
atgcttcac	tgaagttgct	gttctatata	aagatgttaa	ctgcactgat	gtttctacag	3120
caattcatgc	agatcaactc	acaccagctt	ggcgcataata	ttctactgga	aacaatgtat	3180
tccagactca	ggcaggctgt	cttataggag	ctgagcatgt	cgacacttct	tatgagtgcg	3240
acattcctat	tggagctggc	atttgtgcta	gttaccatac	agtttcttta	ttacgtagta	3300
ctagccaaaa	atctattgtg	gcttatacta	tgtcttttagg	tgctgatagt	tcaattgctt	3360
actctaataa	caccattgct	atacctaata	acttttcaat	tagcattact	acagaagtaa	3420
tgctgtttc	tatggctaaa	acctccgtag	attgtaatat	gtacatctgc	ggagattcta	3480
ctgaatgtgc	taatttgcct	ctccaatatg	gtagcttttg	cacacaacta	aategtgcac	3540
tctcaggtat	tgctgctgaa	caggatcgca	acacacgtga	agtgttcgct	caagtcaaac	3600

aatgtacaa	aacccaact	ttgaaatatt	ttggtggttt	taatTTTTca	caaatattac	3660
ctgaccctct	aaagccaact	aagaggctct	ttattgagga	cttgctcttt	aataaggatga	3720
cactcgctga	tgctggcttc	atgaagcaat	atggcgaatg	cctaggtgat	attaatgcta	3780
gagatctcat	ttgtgcgcag	aagttcaatg	gacttacagt	gttgccacct	ctgctcactg	3840
atgatatgat	tgctgcctac	actgctgctc	tagttagtgg	tactgccact	gctggatgga	3900
catttggtgc	tggcgctgct	cttcaaatac	cttttgctat	gcaaatggca	tataggttca	3960
atggcattgg	agttaccaa	aatggtctct	atgagaacca	aaaacaaatc	gccaaccaat	4020
ttaacaaggc	gattagtcaa	attcaagaat	cacttacaac	aacatcaact	gcattgggca	4080
agctgcaaga	cggtgtaac	cagaatgctc	aagcattaa	cacacttggt	aaacaactta	4140
gctctaattt	tggtgcaatt	tcaagtgtgc	taaatgatat	cctttcgcga	cttgataaag	4200
tcgaggcgga	ggtacaaaatt	gacaggttaa	ttacaggcag	acttcaaagc	cttcaaacct	4260
atgtaacaca	acaactaatc	agggctgctg	aaatcagggc	ttctgctaata	cttgctgcta	4320
ctaaaatgtc	tgagtgtgtt	cttggacaat	caaaaagagt	tgacttttgt	ggaaagggct	4380
accaccttat	gtccttccca	caagcagccc	cgcatggtgt	tgtcttccta	catgtcacgt	4440
atgtgccatc	ccaggagag	aacttcacca	cagcgcacgc	aatttgatcat	gaaggcaaag	4500
catacttccc	tcgtgaaggt	gtttttgtgt	ttaatggcac	ttcttggttt	attacacaga	4560
ggaacttctt	ttctccacaa	ataattacta	cagacaatac	atgtgtctca	ggaaattgtg	4620
atgtcgttat	tggcatcatt	aacaacacag	tttatgatcc	tctgcaacct	gagcttgact	4680
cattcaaaga	agagctggac	aagtacttca	aaaatcatac	atcaccagat	gttgattttg	4740
gcgacatttc	aggcattaac	gcttctgtcg	tcaacattca	aaaagaaatt	gaccgcctca	4800
atgaggtcgc	taaaaattta	aatgaatcac	tcattgacct	tcaagaactg	ggaaaatag	4860
agcaatatat	taaatggcct	ctcgacgaac	aaaaactcat	ctcagaagag	gatctgaatg	4920
ctgtgggcca	ggacacgcag	gaggtcatcg	tggtgccaca	ctccttgccc	tttaaggtgg	4980
tggatgatctc	agccatcctg	gccctggtgg	tgctcaccat	catctccctt	atcatcctca	5040
tcagctttg	gcagaagaag	ccacgttagg	cggccgctcg	agtqctagca	ccaagggccc	5100
cagcgtgttc	cccctggccc	ccagcagcaa	gagcaccagc	ggcggcacag	ccgccctggg	5160
ctgcctggtg	aaggactact	tccccgagcc	cgtgaccgtg	agctggaaca	gcggcgcctt	5220
gaccagcggc	gtgcacacct	tccccgccgt	gctgcagagc	agcggcctgt	acagcctgag	5280
cagcgtggtg	accgtgccc	gcagcagcct	gggcacccag	acctacatct	gcaacgtgaa	5340

ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa acgcgtggag cccaagagct gcgacaagac 5400
ccacacctgc cccccctgcc ctgccccga gctgctgggc ggaccctccg tgttcctggt 5460
ccccccaag cccaaggaca cctcatgat cagccggacc cccgaggtga cctgcgtggt 5520
ggtggacgtg agccacgagg accccgaggt gaagttcaac tggtagctgg acggcgtgga 5580
ggtgcacaac gccaagacca agccccggga ggagcagtac aacagcacct accgggtggt 5640
gagcgtgctc accgtgctgc accaggactg gctgaacggc aaggagtaca agtgcaaggt 5700
gagcaacaag gccctgcctg cccccatcga gaagaccatc agcaaggcca agggccagcc 5760
ccgggagccc caggtgtaca cctgcccc cagccgggag gagatgacca agaaccaggt 5820
gtccctcacc tgtctggtga agggcttcta cccagcgcac atcgccgtgg agtgggagag 5880
caacggccag cccgagaaca actacaagac cccccccct gtgctggaca gcgacggcag 5940
cttcttctg tacagcaagc tcaccgtgga caagagccgg tggcagcagg gcaacgtgtt 6000
cagctgcagc gtgatgcacg aggccctgca caaccactac acccagaaga gcctgagcct 6060
gagccccggc aagtgataat ctagagggcc cgtttaaacc cgctgatcag cctcgactgt 6120
gccttctagt tgccagccat ctgttgtttg cccctcccc gtgccttct taccctgga 6180
aggtgccact cccactgtcc tttcctaata aatgaggaa attgcatcgc attgtctgag 6240
taggtgtcat tctattctgg ggggtgggt ggggcaggac agcaagggg aggattggga 6300
agacaatagc aggcattgctg gggatgcggt gggctctatg gcttctgagg cggaaagaac 6360
cagctggggc tctaggggt atccccacgc gccctgtagc ggcgcattaa gcgcggcggg 6420
tgtggtggtt acgcgcagcg tgaccgctac acttgccagc gccctagcgc ccgctcctt 6480
cgctttcttc ccttcctttc tcgccacgtt cgccggcttt ccccgtaag ctctaaatcg 6540
ggggtccct ttagggttcc gatttagtgc ttacggcac ctcgaccca aaaaactga 6600
ttagggtgat ggttcacgta gtgggccatc gccctgatag acggttttc gcccttgac 6660
gttgagtc acgttcttta atagtggact ctgttccaa actggaacaa cactcaacc 6720
tatctcggtc tattcttttg atttataagg gattttgccg atttcggcct attggttaaa 6780
aatgagctg atttaacaaa aatttaacgc gaattaattc tgtggaatgt gtgtcagtta 6840
gggtgtggaa agtcccagc ctcccagca ggcagaagta tgcaaagcat gcatctcaat 6900
tagtcagcaa ccaggtgtgg aaagtcccca ggctcccag caggcagaag tatgcaaagc 6960
atgcatctca attagtcagc aaccatagtc ccgcccctaa ctccgccc atcccctta 7020

actccgceca gttccgceca ttctccgccc catggctgac taattttttt tatttatgca 7080
gaggccgagg ccgcctctgc ctctgagcta ttccagaagt agtgaggagg cttttttgga 7140
ggcctaggct tttgcaaaaa gctccccggga gcttgatat ccattttcgg atctgatcaa 7200
gagacaggat gaggatcggt tcgcatgatt gaacaagatg gattgcacgc aggttctccg 7260
gccgcttggg tggagaggct attcggctat gactgggcac aacagacaat cggctgctct 7320
gatgccgccc tgttccggct gtcagcgcag gggcgccccg ttctttttgt caagaccgac 7380
ctgtccggtg ccctgaatga actgcaggac gaggcagcgc ggctatcgtg gctggccacg 7440
acgggcgctt cttgcgcagc tgtgctcgac gttgtcactg aagcgggaag ggactggctg 7500
ctattggggc aagtgccggg gcaggatctc ctgtcatctc accttgctcc tgccgagaaa 7560
gtatccatca tggctgatgc aatgcggcgg ctgcatacgc ttgatccggc tacctgceca 7620
ttcgaccacc aagcgaaaca tcgcatcgag cgagcacgta ctcggatgga agccggtctt 7680
gtcgatcagg atgatctgga cgaagagcat caggggctcg cgccagccga actgttcgcc 7740
aggctcaagg cgcgcatgcc cgacggcgag gatctcgctg tgacceatgg cgatgcctgc 7800
ttgccgaata tcatggtgga aaatggccgc ttttctggat tcatcgactg tggccggctg 7860
ggtgtggcgg accgctatca ggacatagcg ttggctaccg gtgatattgc tgaagagctt 7920
ggcggcgaat gggctgaccg ctctctcgtg ctttacggta tcgccgctcc cgattcgcag 7980
cgcategcct tctatcgect tcttgacgag ttcttcfjag cgggactctg gggttcgaaa 8040
tgaccgacca agcgacgcc aacctgcat cacgagattt cgattccacc gccgccttct 8100
atgaaagggt gggcttcgga atcgttttcc gggacgccgg ctggatgatc ctccagcgcg 8160
gggatctcat gctggagttc ttcgcccacc ccaacttggt tattgcagct tataatgggt 8220
acaataaag caatagcatc acaaatcca caataaagc atttttttca ctgcattcta 8280
gttgtggttt gtccaaactc atcaatgtat cttatcatgt ctgtataccg tcgaccteta 8340
gctagagctt ggcgtaatca tggctatagc tgtttcctgt gtgaaattgt tatccgctca 8400
caattccaca caacatacga gccggaagca taaagtgtaa agcctggggg gcctaagag 8460
tgagctaaact cacattaatt gcgttgcgct cactgcccgc tttccagtcg ggaaacctgt 8520
cgtgccagct gcattaatga atcgccaac gcgcggggag aggcggtttg cgtattgggc 8580
gctcttccgc ttctcgcctc actgactcgc tgcgctcggg cgttcggctg cggcgagcgg 8640
tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggg tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa 8700
agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg 8760

cgtttttcca taggctccgc cccctgacg agcatcacia aaatcgacgc tcaagtcaga 8820
 ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcggt tccccctgga agtccctcg 8880
 tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgctta ccggatacct gtccgccttt ctcccttcgg 8940
 gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct cagttcgggtg taggtcgttc 9000
 gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg 9060
 gtaactatcg tcttgagtcc aaccggtaa gacacgactt atcgccactg gcagcagcca 9120
 ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcgggtgc tacagagttc ttgaagtgg 9180
 ggcctaacta cggctacact agaagaacag tatttggtat ctgcgctctg ctgaagccag 9240
 ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg 9300
 gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt 9360
 tgatcttttc tacgggggtct gacgctcagt ggaacgaaaa ctcacgttaa gggattttgg 9420
 tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt aaattaaaaa tgaagtttta 9480
 aatcaatcta aagtatatat gagtaaacctt ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagt 9540
 aggcacctat ctacgcgatc tgtctatttc gttcatccat agttgcctga ctccccgtcg 9600
 tgtagataac tacgatacgg gagggttac catctggccc cagtgcctgca atgataccgc 9660
 gagaccacg ctaccggct ccagatttat cagcaataaa ccagccagcc ggaagggccg 9720
 agcgcagaag tggctctgca actttatccg cctccatcca gtctattaat tgttgccggg 9780
 aagctagagt aagtagttcg ccagttaata gtttgcgcaa cgttggtgcc attgctacag 9840
 gcatcgtggg gtcacgctcg tcgtttggta tggcttcatt cagctccggt tccaacgat 9900
 caaggcgagt tacatgatcc cccatggtgt gcaaaaaagc ggttagctcc ttcggctctc 9960
 cgatcgttgt cagaagtaag ttggccgag tgttatcact catggttatg gcagcactgc 10020
 ataattctct tactgtcatg ccatccgtaa gatgcttttc tgtgactggt gagtactcaa 10080
 ccaagtcatt ctgagaatag tgtatgcggc gaccgagttg ctcttgcccc gcgtcaatac 10140
 gggataatac cgcgccacat agcagaactt taaaagtgct catcattgga aaacgttctt 10200
 cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc tgttgagatc cagttcgatg taaccactc 10260
 gtgcacccaa ctgatcttca gcacttttta ctttcaccag cgtttctggg tgagcaaaaa 10320
 caggaaggca aaatgccgca aaaaagggaa taagggcgac acggaaatgt tgaatactca 10380
 tactcttctt ttttcaatat tattgaagca tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat 10440

acatatttga atgtatttag aaaaataaac aaataggggt tccgcgcaca tttccccgaa 10500
aagtgccacc tgacg 10515

<210> 54

<211> 8777

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Vector plg-C909-Ckappa

<220>

<221> misc_feature

10 <222> (1328)..(3860)

<223> Relleno

<400> 54

tgcacggatc gggagatctc ccgatcccct atggtgcact ctcagtacaa tctgctctga 60
tgccgcatag ttaagccagt atctgctccc tgcttgtgtg ttggaggctg ctgagtagtg 120
cgcgagcaaa atttaagcta caacaaggca aggcttgacc gacaattggt aattaacatg 180
aagaatctgc ttaggggttag gcgttttgcg ctgcttcgct aggtggtcaa tattggccat 240
tagccatatt attcattggt tatatagcat aaatcaatat tggctattgg ccattgcata 300
cgttgtatcc atatcataat atgtacattt atattggctc atgtccaaca ttaccgccat 360
gttgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat tacgggggtca ttagttcata 420
gcccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa tggcccgcct ggctgaccgc 480
ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag 540
ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta aactgcccac ttggcagtac 600
atcaagtgta tcatatgcca agtacgcccc ctattgacgt caatgacggt aaatggccccg 660
cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc tacttggcag tacatctacg 720
tattagtcac cgctattacc atggtgatgc ggttttgcca gtacatcaat gggcgtggat 780
agcggtttga ctcacgggga tttccaagtc tccaccccat tgacgtcaat gggagtttgt 840

ttggtcacca aatcaacgg gactttccaa aatgtcgtaa caactccgcc ccattgacgc 900
 aatggggcgg taggcgtgta cgggtgggagg tctatataag cagagctcgt ttagtgaacc 960
 gtcagatcgc ctggagacgc catccacgct gttttgacct ccatagaaga caccgggacc 1020
 gatccagcct ccgcggcccg gaacggtgca ttggaatcga tgactctctt aggtagcctt 1080
 gcagaagttg gtcgtgagge actgggcagg taagtatcaa ggttacaaga caggtttaag 1140
 gagatcaata gaaactgggc ttgtcgagac agagaagact cttgcgtttc tgataggcac 1200
 ctattggtct tactgacatc cactttgcct ttctctccac aggtgtccac tcccagttca 1260
 attacagctc gccaccatgc ggctgcccgc ccagctgctg ggccttctca tgctgtgggt 1320
 gccgcctcg agatctatcg atgcatgcca tggtagcaag cttgccacca tgagcagcag 1380
 ctcttggtcg ctgctgagcc tgggtggccgt gacagccgcc cagagcacca tcgaggagca 1440
 ggccaagacc ttcttgaca agttcaacca cgaggccgag gacctgttct accagagcag 1500
 cctggccagc tggaactaca acaccaacat caccgaggag aacgtgcaga acatgaacaa 1560
 cgccggcgac aagtggagcg ccttcctgaa ggagcagagc aactggccc agatgtaccc 1620
 cctgcaggag atccagaacc tgaccgtgaa gctgcagctg caggccctgc agcagaacgg 1680
 cagcagcgtg ctgagcaggg acaagagcaa gcggtgaa accatcctga acaccatgtc 1740
 caccatctac agcaccggca aagtgtgcaa ccccgacaac ccccaggagt gcctgctgct 1800
 ggagcccggc ctgaacgaga tcatggccaa cagcctggac tacaacgagc ggctgtgggc 1860
 ctgggagagc tggcggagcg aagtgggcaa gcagctgcgg cccctgtacg aggagtacgt 1920
 ggtgctgaag aacgagatgg ccagggccaa cactacgag gactacggcg actactggag 1980
 aggcgactac gaagtgaacg gcgtggacgg ctacgactac agcagaggcc agctgatcga 2040
 ggacgtggag cacaccttcg aggagatcaa gcctctgtac gagcacctgc acgcctacgt 2100
 gcgggccaag ctgatgaacg cctaccccag ctacatcagc cccatcggct gcctgcccgc 2160
 ccacctgctg ggcgacatgt ggggccggtt ctggaccaac ctgtacagcc tgaccgtgcc 2220
 cttcggccag aagcccaaca tcgacgtgac cgacgccatg gtggaccagg cctgggacgc 2280
 ccagcggatc ttcaaggagg ccgagaagtt cttcgtgagc gtgggcctgc ccaacatgac 2340
 ccagggcttt tgggagaaca gcatgctgac cgaccccggc aatgtgcaga aggccgtgtg 2400
 ccaccccacc gcctgggacc tgggcaaggg cgacttccgg atcctgatgt gcaccaaagt 2460
 gaccatggac gacttctga ccgcccacca cgagatgggc cacatccagt acgacatggc 2520

ctacgccgcc cagcccttcc tgctgcggaa cggcgccaac gagggctttc acgaggccgt 2580
gggcgagatc atgagcctga gcgccgccac cccaagcac ctgaagagca tcggcctgct 2640
gagccccgac ttccaggagg acaacgagac cgagatcaac ttcttctgta agcaggccct 2700
gaccatcgtg ggcaccctgc cttcaccta catgctggag aagtggcggg ggatgggtgtt 2760
taagggcgag atccccaagg accagtggat gaagaagtgg tgggagatga agcgggagat 2820
cgtgggcgtg gtggagcccg tgccccacga cgagacctac tgcgaccccg ccagcctggt 2880
ccacgtgagc aacgactact cttcatccg gtactacacc cggaccctgt accagttcca 2940
gttccaggag gccctgtgcc aggccgcaa gcacgagggc cccctgcaca agtgcgacat 3000
cagcaacagc accgaggccg gacagaaact gttcaacatg ctgcggctgg gcaagagcga 3060
gccctggacc ctggccctgg agaatgtggg gggcgccaag aacatgaatg tgcgccccct 3120
gctgaactac ttcgagcccc tgttcacctg gctgaaggac cagaacaaga acagcttcgt 3180
gggctggagc accgactgga gccctacgc cgaccagagc atcaaagtgc ggatcagcct 3240
gaagagcgcc ctgggcgaca aggcctacga gtggaacgac aacgagatgt acctgttccg 3300
gagcagcgtg gcctatgcca tgcggcagta ctctctgaaa gtgaagaacc agatgatcct 3360
gttcggcgag gaggacgtga gagtggccaa cctgaagccc cggatcagct tcaacttctt 3420
cgtgaccgcc cccaagaacg tgagcgacat catcccccg accgaagtgg agaaggccat 3480
ccggatgagc cggagccgga tcaacgacgc ctctcggtg aacgacaact ccctggagtt 3540
cctgggcata cagcccaccc tgggccctcc caaccagccc cccgtgagca tctggctgat 3600
cgtgtttggc gtggtgatgg gcgtgatcgt ggtgggaatc gtgatcctga tcttcaccgg 3660
catccgggac cggagaaga agaacaaggc ccggagcggc gagaaccctt acgccagcat 3720
cgatatcagc aagggcgaga acaaccccgg ctccagaac accgacgacg tgcagaccag 3780
cttctgataa tctagaacga gctcgaattc gaagcttctg cagacgcgtc gacgtcatat 3840
ggatccgata tcgccgtggc ggccgcaccc agcgtgttca tcttcccccc ctccgacgag 3900
cagctgaaga gcggcaccgc cagcgtgggtg tgcctgctga acaacttcta cccccgggag 3960
gccaaggtgc agtgggaagg ggacaacgoc ctgcagagcg gcaacagcca ggagagcgtg 4020
accgagcagg acagcaagga ctccacctac agcctgagca gcaccctcac cctgagcaag 4080
gccgactacg agaagcacia ggtgtacgcc tgcgaggtga cccaccaggg cctgagcagc 4140
cccgtgacca agagcttcaa ccggggcgag tgtaataaga cttaagttta aaccgctgat 4200
cagcctcgac tgtgccttct agttgccagc catctgttgt ttgccctcc cccgtgcctt 4260

ccttgaccct ggaaggtgcc actcccactg tcctttccta ataaaatgag gaaattgcat 4320
cgcattgtct gagtaggtgt cattctattc tgggggggtg ggtggggcag gacagcaagg 4380
gggaggattg ggaagacaat agcaggcatg ctggggatgc ggtgggctct atggcttctg 4440
aggcggaag aaccagctgg ggctctaggg ggtatcccca cgcgccctgt agcggcgcag 4500
taagcggggc ggggtgtggg gttacgcgca gcgtgaccgc tacacttgcc agcgccttag 4560
cgcccgtccc tttegtttc tteccctcct ttctcgccac gttcgccggc tttccccgtc 4620
aagctctaaa tcgggggctc ctttaggggt tccgatttag tgctttacgg cacctcgacc 4680
ccaaaaaact tgattagggt gatggttcac gtagtgggcc atcgccctga tagacggttt 4740
ttcgcccttt gacgttggag tccacgttct ttaatagtgg actcttggtc caaactggaa 4800
caacactcaa ccctatctcg gtctattctt ttgatttata agggattttg gccatttcgg 4860
cctattgggt aaaaaatgag ctgatttaac aaaaatttaa cgcaattaa ttctgtggaa 4920
tgtgtgtcag ttaggggtgt gaaagtcccc aggctcccca gcaggcagaa gtatgcaaag 4980
catgcatctc aattagtcag caaccaggtg tggaaagtcc ccaggctccc cagcaggcag 5040
aagtatgcaa agcatgcac tcaattagtc agcaaccata gtcccccccc taactccgcc 5100
catccccccc ctaactccgc ccagttccgc ccattctccg ccccatggct gactaatttt 5160
ttttatttat gcagaggccg aggccgcctc tgccctctgag ctattccaga agtagtgagg 5220
aggctttttt ggaggcctag gcttttgcaa aaagctcccc ggagcttgta tatccatttt 5280
cggatctgat cagcacgtga tgaaaaagcc tgaactcacc gcgacgtctg tcgagaagtt 5340
tctgatcgaa aagttcgaca gcgtctccga cctgatgcag ctctcggagg gcgaagaatc 5400
tcgtgctttc agcttcgatg taggagggcg tggatatgtc ctgcgggtaa atagctgcgc 5460
cgatggtttc tacaagatc gttatgttta tcggcacttt gcatcggccg cgctcccgat 5520
tccggaagtg cttgacattg ggggaattcag cgagagcctg acctattgca tctcccgccg 5580
tgcacagggt gtcacgttgc aagacctgcc tgaaacgcaa ctgcccgtg ttctgcagcc 5640
ggtcgcggag gccatggatg cgatcgctgc ggccgatctt agccagacga gcgggttcgg 5700
cccattcgga ccacaaggaa tcgggtcaata cactacatgg cgtgatttca tatgcgcgat 5760
tgctgatccc catgtgtatc actggcaaac tgtgatggac gacaccgtca gtgcgtccgt 5820
cgcgcaggct ctcgatgagc tgatgctttg ggccgaggac tgccccgaag tccggcacct 5880
cgtgcacgcg gatttcggct ccaacaatgt cctgacggac aatggccgca taacagcggg 5940

cattgactgg	agcgaggcga	tgttcgggga	ttccaatac	gaggtcgcca	acatcttctt	6000
ctggaggccg	tggttggett	gtatggagca	gcagacgcgc	tacttcgagc	ggaggcatcc	6060
ggagcttgca	ggatcgccgc	ggctccgggc	gtatatgctc	cgcattggtc	ttgaccaact	6120
ctatcagagc	ttggttgacg	gcaatttcga	tgatgcagct	tgggcgcagg	gtcgatgcga	6180
cgcaatcgtc	cgatccggag	ccgggactgt	cgggcgtaca	caaatcgccc	gcagaagcgc	6240
ggccgtctgg	accgatggct	gtgtagaagt	actcgccgat	agtggaaacc	gacgccccag	6300
cactcgtccg	agggcaaagg	aatagcacgt	gctacgagat	ttcgattcca	ccgccgcctt	6360
ctatgaaagg	ttgggcttcg	gaatcgtttt	ccgggacgcc	ggctggatga	tcctccagcg	6420
cggggatctc	atgctggagt	tcttcgccc	ccccaaactg	tttattgcag	cttataatgg	6480
ttacaaataa	agcaatagca	tcacaaattt	cacaaataaa	gcattttttt	cactgcattc	6540
tagttgtggt	ttgtccaaac	tcatcaatgt	atcttatcat	gtctgtatac	cgtcgacctc	6600
tagctagagc	ttggcgtaat	catggtcata	gctgtttcct	gtgtgaaatt	gttatccgct	6660
cacaattcca	cacaacatac	gagccggaag	cataaagtgt	aaagcctggg	gtgcctaattg	6720
agtgagctaa	ctcacattaa	ttgcgttgcg	ctcactgccc	gctttccagt	cgggaaacct	6780
gtcgtgccag	ctgcattaat	gaatcggcca	acgcgcgggg	agaggcggtt	tgcgtattgg	6840
gcgctcttcc	gcttctctgc	tactgactc	gctgcgctcg	gtcgttcggc	tgcggcgagc	6900
ggtatcagct	cactcaaagg	cggtaatacg	gttatccaca	gaatcagggg	ataacgcagg	6960
aaagaacatg	tgagcaaaag	gccagcaaaa	ggccaggaac	cgtaaaaagg	ccgcgttgct	7020
ggcgtttttc	cataggctcc	gccccctga	cgagcatcac	aaaaatcgac	gctcaagtca	7080
gaggtggcga	aacccgacag	gactataaag	ataccaggcg	tttccccctg	gaagctccct	7140
cgtgcgctct	cctgttccga	ccctgcccgt	taccggatac	ctgtccgctt	ttctcccttc	7200
gggaagcgtg	gcgctttctc	atagctcacg	ctgtaggtat	ctcagttcgg	tgtaggtcgt	7260
tcgctccaag	ctgggctgtg	tgcacgaacc	ccccgttcag	cccgaccgct	gcgccttate	7320
cggtaactat	cgtcttgagt	ccaacccggt	aagacacgac	ttatcgccac	tggcagcagc	7380
cactggtaac	aggattagca	gagcgaggta	tgtaggcggt	gctacagagt	tcttgaagtg	7440
gtggcctaac	tacggctaca	ctagaagaac	agtatttggt	atctgcgctc	tgctgaagcc	7500
agttaccttc	ggaaaaagag	ttggtagctc	ttgatccggc	aaacaaacca	ccgctggtag	7560
cggttttttt	gtttgcaagc	agcagattac	gcgcagaaaa	aaaggatctc	aagaagatcc	7620
tttgatcttt	tctacggggt	ctgacgetca	gtggaacgaa	aactcacggt	aagggatttt	7680

ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaaa aatgaagttt 7740
 taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat gcttaatcag 7800
 tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt tcgttcatcc atagttgcct gactccccgt 7860
 cgtgtagata actacgatac gggagggcct accatctggc cccagtgctg caatgatacc 7920
 gcgagacca cgctcaccgg ctccagattt atcagcaata aaccagccag ccggaagggc 7980
 cgagcgcaga agtggtcctg caactttatc cgctccatc cagtctatta attggtgccg 8040
 ggaagctaga gtaagtagtt cgccagttaa tagtttgccg aacgttggtg ccattgctac 8100
 aggcatcgtg gtgtcacgct cgtcgtttgg tatggcttca ttcagctccg gttcccaacg 8160
 atcaaggcga gttacatgat cccccatggt gtgcaaaaaa gcggttagct ccttcgggtcc 8220
 tccgatcgtt gtcagaagta agttggccgc agtggtatca ctcatggtta tggcagcact 8280
 gcataattct cttactgtca tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg gtgagtactc 8340
 aaccaagtca ttctgagaat agtgtatgcy gcgaccgagt tgctcttgcc cggcgtcaat 8400
 acgggataat accgcgccac atagcagaac tttaaaagtg ctcatcattg gaaaacgttc 8460
 ttcggggcga aaactctcaa ggatcttacc gctggtgaga tccagttcga tgtaaccac 8520
 tcgtgcaccc aactgatctt cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa 8580
 aacaggaagg caaaatgccg caaaaaaggg aataagggcg acacggaaat gttgaatact 8640
 catactcttc ctttttcaat attattgaag catttatcag ggttattgtc tcatgagcgg 8700
 atacatattt gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca catttccccg 8760
 aaaagtgcc a cctgacg 8777

<210> 55

<211> 47

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sy3H-C

<400> 55

gcccttggtg ctacgcctgg agacggtcac ggtgggtccc tggcccc

47

10 <210> 56

<211> 47

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido 5H-C
 <400> 56
 acctgtcttg aattctccat ggcccaggtg cagctggtgg agtctgg 47
 <210> 57
 5 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sy3L-Amod
 10 <400> 57
 ccagcacggt aagcttcagc acggtcacct tggtgccagt tcc 43
 <210> 58
 <211> 8792
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Vector plg-C910-Clambda
 <220>
 <221> misc_feature
 20 <222> (1330)..(3869)
 <223> Relleno
 <400> 58

tcgacggatc gggagatctc ccgatcccct atgggtgact ctcagtacaa tctgctctga	60
tgccgcatag ttaagccagt atctgctccc tgcttggtg ttggaggctg ctgagtagtg	120
cgcgagcaaa atttaagcta caacaaggca aggcttgacc gacaattggt aattaacatg	180
aagaatctgc ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgct aggtgggtcaa tattggccat	240
tagccatatt attcattggt tatatagcat aaatcaatat tggctattgg ccattgcata	300
cgttgatcc atatcataat atgtacattt atattggctc atgtccaaca ttaccgcat	360
gttgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat tacgggggtca ttagttcata	420
gcccataat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa tggcccgcct ggctgaccgc	480
ccaacgacc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag	540
ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta aactgcccac ttggcagtac	600
atcaagtgta tcatatgcca agtacgcccc ctattgacgt caatgacggt aatggccccg	660
cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc tacttggcag tacatctacg	720
tattagtcac cgctattacc atgggtgatgc ggttttgcca gtacatcaat gggcgtggat	780
agcggtttga ctcacgggga tttccaagtc tccaccccat tgacgtcaat gggagtttgt	840
tttggcacca aaatcaacgg gactttccaa aatgtcgtaa caactccgcc ccattgacgc	900
aaatggggcg taggcgtgta cgggtggagg tctatataag cagagctcgt ttagtgaacc	960
gtcagatcgc ctggagacgc catccacgct gttttgacct ccatagaaga caccgggacc	1020
gatccagcct ccgcgcccg gaacggtgca ttggaatcga tgactctctt aggtagcctt	1080
gcagaagttg gtctgtaggc actgggcagg taagtatcaa ggttacaaga caggtttaag	1140
gagatcaata gaaactgggc ttgtcgagac agagaagact cttgcgtttc tgataggcac	1200
ctattggtct tactgacatc cactttgect ttctctccac aggtgtccac tcccagttca	1260
attacagctc gccaccatgc ggttctccgc tcagctgctg ggccttctgg tgctgtggat	1320
tcccggcgtc tcgagatcta tcgatgcatg ccattggtacc aagcttgcca ccattgagcag	1380
cagctcttgg ctgctgctga gcctggtggc cgtgacagcc gccagagca ccattgagga	1440
gcaggccaag accttctctg acaagttcaa ccacgaggcc gaggacctgt tctaccagag	1500

cagcctggcc	agctggaact	acaacaccaa	catcaccgag	gagaacgtgc	agaacatgaa	1560
caacgccggc	gacaagtgga	gcgccttcc	gaaggagcag	agcacactgg	cccagatgta	1620
cccctgcag	gagatccaga	acctgaccgt	gaagctgcag	ctgcaggccc	tgcagcagaa	1680
cggcagcagc	gtgctgagcg	aggacaagag	caagcggctg	aacaccatcc	tgaacaccat	1740
gtccaccatc	tacagcaccg	gcaaagtgtg	caaccccgac	aacccccagg	agtgcctgct	1800
gctggagccc	ggcctgaacg	agatcatggc	caacagcctg	gactacaacg	agcggctgtg	1860
ggcctgggag	agctggcgga	gcgaagtggg	caagcagctg	cggcccctgt	acgaggagta	1920
cgtggtgctg	aagaacgaga	tggccagggc	caaccactac	gaggactacg	gcgactactg	1980
gagaggcgac	tacgaagtga	acggcgtgga	cggctacgac	tacagcagag	gccagctgat	2040
cgaggacgtg	gagcacacct	tcgaggagat	caagcctctg	tacgagcacc	tgcacgecta	2100
cgtgcggggc	aagctgatga	acgcctaccc	cagctacatc	agccccatcg	gctgcctgcc	2160
cgcccacctg	ctgggcgaca	tgtggggccg	gttctggacc	aacctgtaca	gcctgaccgt	2220
gcccttcggc	cagaagccca	acatcgacgt	gaccgacgcc	atggtggacc	aggcctggga	2280
cgcccagcgg	atcttcaagg	aggccgagaa	gttcttcgtg	agcgtggggc	tgccaacat	2340
gaccagggc	ttttgggaga	acagcatget	gaccgacccc	ggcaatgtgc	agaaggccgt	2400
gtgccacccc	accgcctggg	acctgggcaa	gggcgacttc	cggatcctga	tgtgcaccaa	2460
agtgaccatg	gacgacttcc	tgaccgccc	ccacgagatg	ggccacatcc	agtacgacat	2520
ggcctacgcc	gcccagccct	tcctgctgcg	gaacggcgcc	aacgagggct	ttcacgaggc	2580
cgtgggcgag	atcatgagcc	tgagcgccgc	cacccccaa	cacctgaaga	gcatcgccct	2640
gctgagcccc	gacttccagg	aggacaacga	gaccgagatc	aacttcctgc	tgaagcaggc	2700
cctgaccatc	gtgggcaccc	tgcccttcac	ctacatgctg	gagaagtggc	ggtggatggt	2760
gtttaagggc	gagatcccca	aggaccagtg	gatgaagaag	tggtgggaga	tgaagcggga	2820
gatcgtgggc	gtggtggagc	ccgtgcccc	cgacgagacc	tactgcgacc	ccgccagcct	2880
gttccacgtg	agcaacgact	actccttcat	ccggtactac	acccggaccc	tgtaccagtt	2940
ccagttccag	gaggccctgt	gccaggccgc	caagcacgag	ggccccctgc	acaagtgcga	3000
catcagcaac	agcaccgagg	ccggacagaa	actgttcaac	atgctgcggc	tgggcaagag	3060
cgagccctgg	accctggccc	tggagaatgt	ggtgggcgcc	aagaacatga	atgtgcgcc	3120
cctgctgaac	tacttcgagc	ccctgttcac	ctggctgaag	gaccagaaca	agaacagctt	3180
cgtgggctgg	agcaccgact	ggagccccta	cgccgaccag	agcatcaaag	tgcggatcag	3240

cctgaagagc gccctgggcg acaaggccta cgagtggaac gacaacgaga tgtacctgtt 3300
ccggagcagc gtggcctatg ccatgcggca gtacttctctg aaagtgaaga accagatgat 3360
cctgttcggc gaggaggacg tgagagtggc caacctgaag ccccgatca gcttcaactt 3420
cttcgtgacc gcccccaaga acgtgagcga catcatcccc cggaccgaag tggagaaggc 3480
catccggatg agccggagcc ggatcaacga cgccttccgg ctgaacgaca actccctgga 3540
gttctctggc atccagccca ccctgggccc tcccaaccag cccccgtga gcatctggct 3600
gatcgtgttt ggcgtggtga tgggcgtgat cgtggtggga atcgtgatcc tgatcttcac 3660
cggcatccgg gaccggaaga agaagaacaa ggcccggagc ggcgagaacc cctacgccag 3720
catcgatata agcaagggcg agaacaaccc cggttccag aacaccgacg acgtgcagac 3780
cagcttctga taatctagaa cgagctcgaa ttcgaagctt ctgcagacgc gtcgacgtca 3840
tatggatccg atatcgccgt ggcggccgca ggccagccca aggccgctcc cagcgtgacc 3900
ctgttcccc cctcctccga ggagctgcag gccacaagg ccaccctggt gtgcctcctc 3960
agcgacttct accctggcgc cgtgaccgtg gcctggaagg ccgacagcag ccccgatgaag 4020
gccggcgtgg agaccaccac cccagcaag cagagcaaca acaagtacgc cgcagcagc 4080
tacctgagcc tcacccccga gcagtggaag agccaccgga gctacagctg ccaggtgacc 4140
cacgagggca gcaccgtgga gaagaccgtg gccccaccg agtgcagcta atagacttaa 4200
gtttaaaccg ctgatcagcc tcgactgtgc cttctagttg ccagccatct gttgtttgcc 4260
cctccccctg gccttccctg accctggaag gtgcactcc cactgtcctt tcctaataaa 4320
atgaggaaat tgcctcgcct tgtctgagta ggtgtcattc tattctgggg ggtgggggtg 4380
ggcaggacag caagggggag gattgggaag acaatagcag gcatgctggg gatgcgggtg 4440
gctctatggc ttctgaggcg gaaagaacca gctggggctc tagggggtat cccacgcgc 4500
cctgtagcgg cgcattaagc gcggcgggtg tgggtggttac gcgcagcgtg accgctacac 4560
ttgccagcgc cctagcgcct gctcctttcg cttctctccc ttcctttctc gccacgttcg 4620
ccggtttcc cgcctaagct ctaaatacggg ggctccctt agggttccga tttagtgtt 4680
tacggcacct cgacccccaa aaacttgatt agggatgatg ttcacgtagt gggccatcgc 4740
cctgatagac ggtttttcgc cctttgacgt tggagtccac gttctttaat agtggactct 4800
tgttccaaac tggacaaca ctcaacccta tctcggctca ttcttttgat ttataaggga 4860
ttttggccat ttcggcctat tggttaaaaa atgagctgat ttaacaaaaa tttaacgcga 4920

attaattctg	tggaatgtgt	gtcagttagg	gtgtggaaag	tccccaggct	ccccagcagg	4980
cagaagtatg	caaagcatgc	atctcaatta	gtcagcaacc	aggtgtggaa	agtccccagg	5040
ctccccagca	ggcagaagta	tgcaaagcat	gcattctcaat	tagtcagcaa	ccatagtccc	5100
gcccctaact	ccgcccattc	cgcccctaac	tccgcccagt	tccgcccatt	ctccgcccga	5160
tggttgacta	atTTTTTTta	tttatgcaga	ggccgaggcc	gcctctgcct	ctgagctatt	5220
ccagaagtag	tgaggaggct	TTTTTggagg	cctaggcttt	tgcaaaaagc	tccccgggagc	5280
ttgtatatcc	atTTTtcggat	ctgatcagca	cgtgatgaaa	aagcctgaac	tcaccgcgac	5340
gtctgtcgag	aagTTTctga	tcgaaaagtt	cgacagcgtc	tccgacctga	tgcagctctc	5400
ggagggcgaa	gaatctctgtg	ctttcagctt	cgatgtagga	gggcgtggat	atgtcctgcg	5460
ggtaaatagc	tgcgccgatg	gtttctacaa	agatcgttat	gtttatcggc	actttgcatc	5520
ggccgcgctc	ccgattccgg	aagtgcctga	cattggggaa	ttcagcgaga	gcctgaccta	5580
ttgcatctcc	cgccgtgcac	aggggtgtcac	gttgcaagac	ctgcctgaaa	ccgaactgcc	5640
cgctgttctg	cagccggtcg	cggaggccat	ggatgcgatc	gctgcggccg	atcttagcca	5700
gacgagcggg	ttcgcccatt	tcggaccgca	aggaatcggg	caatacacta	catggcgtga	5760
tttcatatgc	gcgattgctg	atccccatgt	gtatcactgg	caaactgtga	tggacgacac	5820
cgteagtgeg	tccgtegegc	aggctctcga	tgagctgatg	ctttgggccc	aggactgcc	5880
cgaagtccgg	cacctcgtgc	acgcggattt	cggtccaac	aatgtcctga	cggacaatgg	5940
ccgcataaca	gcggtcattg	actggagcga	ggcgatgttc	ggggattccc	aatacgaggt	6000
cgccaacatc	ttctttctgga	ggccgtgggt	ggcttgtag	gagcagcaga	cgcgctactt	6060
cgagcggagg	catccggagc	ttgcaggatc	gccgcggctc	cgggcgtata	tgctccgat	6120
tggtcttgac	caactctatc	agagcttggg	tgacggcaat	ttcgatgatg	cagcttgggc	6180
gcagggtcga	tgcgacgcaa	tcgtccgatc	cggagccggg	actgtcgggc	gtacacaaat	6240
cgccccgaga	agcgcggccg	tctggaccga	tggtgtgta	gaagtactcg	ccgatagtgg	6300
aaaccgacgc	cccagcactc	gtccgagggc	aaaggaatag	cacgtgctac	gagatttcga	6360
ttccaaccgc	gccttctatg	aaaggttggg	cttcggaatc	gttttccggg	acgccggctg	6420
gatgatcctc	cagcgcgggg	atctcatgct	ggagttcttc	gcccacccca	acttgtttat	6480
tgcagcttat	aatggttaca	aataaagcaa	tagcatcaca	aatttcacaa	ataaagcatt	6540
TTTTTcactg	cattctagtt	gtggTTTTgtc	caaactcadc	aatgtatctt	atcatgtctg	6600
tataccgteg	acctctagct	agagcttggc	gtaatcatgg	tcatagctgt	ttcctgtgtg	6660

aaattgttat ccgctcacia ttccacacia catacgagcc ggaagcataa agtgtaaagc 6720
ctggggtgcc taatgagtga gctaactcac attaattgcy ttgcgctcac tgcccgcttt 6780
ccagtcggga aacctgicgt gccagctgca ttaatgaatc ggccaacgcy cggggagagg 6840
cggtttgcy attgggcyct cttccgcttc ctcgctcact gactcgctgc gctcggtcgt 6900
tcggctgcyg cyagcggtat cagctcactc aaaggcygta atacggttat ccacagaatc 6960
aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa 7020
aaaggccgcy ttgctggcyt ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa 7080
tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaacct gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc 7140
ccctggaage tcctcgtgc gctctcctgt tccgacctg ccgcttaccg gatacctgtc 7200
cgctttctc ccttcgggaa gcytgcyct tttcatagc tcacgctgta ggtatctcag 7260
ttcgggtgtag gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgac gaaccccccg ttcagcccga 7320
ccgctgcycc ttatccgta actatcgtct tgagtccaac ccgtaagac acgacttate 7380
gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcy aggtatgtag gcggtgctac 7440
agagttcttg aagtggtygc ctaactacgy ctacactaga agaacagtat ttggtatctg 7500
cgctctgctg aagccagtta ccttcggaaa aagagtygt agctcttgat ccggcaaaa 7560
aaccaccgct ggtagcgytt ttttgtyt caagcagcy attacgcyca gaaaaaaag 7620
atctcaagaa gatccttga tctttctac ggggtctgac gctcagtyga acgaaaactc 7680
acgttaaggg attttgtyca tgagattatc aaaaagatc ttcacctaga tccttttaa 7740
ttaaaaatga agtttaaat caatctaaag tatatatgag taaacttygt ctgacagtta 7800
ccaatgctta atcagtygag cacctatctc agcyatctgt ctatttcgtt catccatagt 7860
tgctgactc cccgtcgtgt agataactac gatacgggag ggcttaccat ctggccccag 7920
tgctgcaatg ataccgcyag acccagctc accggtcca gatattcag caataacca 7980
gccagccgga agggccgagc gcagaagtyg tctgcaact ttatccgct ccatccagtc 8040
tattaattgt tgccggyaag ctagagtyag tagttcgyca gtyaatagtt tgcgcaacgt 8100
tyttgcyatt gctacaggca tcytygtgc acgctcgtcy ttygtyatgy cttcattcag 8160
ctccgtytcc caacgatcaa ggcgagtyac atgatcccc atgtytgtyca aaaaagcygt 8220
tagctccttc ggtcctcgya tcytygtcag aagtyagtyg gccgagtyt tateactcat 8280
ggttatggca gcyactgcyata attctcttac tytcatgcyca tccgtyagat gcttttctgt 8340

gactggtgag tactcaacca agtcattctg agaatagtgt atgcggcgac cgagttgctc 8400
 ttgcccggcg tcaatacggg ataataccgc gccacatagc agaactttaa aagtgctcat 8460
 cattggaaaa cgttcttcgg ggcgaaaact ctcaaggatc ttaccgctgt tgagatccag 8520
 ttcatgttaa cccactcgtg cacccaactg atcttcagca tcttttactt tcaccagcgt 8580
 ttctgggtga gcaaaaacag gaaggcaaaa tgccgcaaaa aaggggataa gggcgacacg 8640
 gaaatggtga atactcatac tcttcctttt tcaatattat tgaagcattt atcagggtta 8700
 ttgtctcatg agcggataca tatttgaatg tatttagaaa aataaacaata taggggttcc 8760
 gcgcacattt ccccgaaaag tgccacctga cg 8792

<210> 59

<211> 1344

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada CR4261

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(1344)

<223>

<400> 59

cag	gtg	cag	ctg	gtg	cag	tct	ggg	ggt	gag	gtg	aag	agg	cct	ggg	gcc	48
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Val	Glu	Val	Lys	Arg	Pro	Gly	Ala	
1				5					10					15		
tca	gtg	aag	gtc	tcc	tgc	aag	gct	tct	gga	tac	acc	ttc	acc	agt	tat	96
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr	
			20						25					30		
acc	tta	cat	tgg	gtg	cgc	cag	gcc	ccc	gga	caa	agg	cct	gag	tgg	atg	144
Thr	Leu	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Arg	Pro	Glu	Trp	Met	
		35					40					45				
gga	tgg	atc	cac	cct	gtc	aat	ggt	gac	aca	aaa	tat	tca	cag	aag	ttc	192
Gly	Trp	Ile	His	Pro	Val	Asn	Gly	Asp	Thr	Lys	Tyr	Ser	Gln	Lys	Phe	
	50						55				60					

cag ggc aga gtc acc att acc agg gac aca tcc gcg agc aca gcc tac Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr 65 70 75 80	240
atg gag ctg agc agc ctg aga tct gaa gac acg gct gtg tat tac tgt Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys 85 90 95	288
gcg agg ggg tac gac agc tgg tct ttt gac tac tgg ggc cag ggc acc Ala Arg Gly Tyr Asp Ser Trp Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr 100 105 110	336
ctg gtg acc gtc tcc agc gct agc acc aag ggc ccc agc gtg ttc ccc Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro 115 120 125	384
ctg gcc ccc agc agc aag agc acc agc ggc ggc aca gcc gcc ctg ggc Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly 130 135 140	432
tgc ctg gtg aag gac tac ttc ccc gag ccc gtg acc gtg agc tgg aac Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn 145 150 155 160	480
agc ggc gcc ttg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccc gcc gtg ctg cag Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln 165 170 175	528
agc agc ggc ctg tac agc ctg agc agc gtg gtg acc gtg ccc agc agc Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser 180 185 190	576
agc ctg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aac cac aag ccc agc Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser 195 200 205	624
aac acc aag gtg gac aaa cgc gtg gag ccc aag agc tgc gac aag acc Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr 210 215 220	672
cac acc tgc ccc ccc tgc cct gcc ccc gag ctg ctg ggc gga ccc tcc His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser 225 230 235 240	720
gtg ttc ctg ttc ccc ccc aag ccc aag gac acc ctc atg atc agc cgg Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg 245 250 255	768
acc ccc gag gtg acc tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gag gac ccc Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro 260 265 270	816
gag gtg aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cac aac gcc Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala 275 280 285	864

aag acc aag ccc cgg gag gag cag tac aac agc acc tac cgg gtg gtg	912
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val	
290 295 300	
agc gtg ctc acc gtg ctg cac cag gac tgg ctg aac ggc aag gag tac	960
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr	
305 310 315 320	
aag tgc aag gtg agc aac aag gcc ctg cct gcc ccc atc gag aag acc	1008
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr	
325 330 335	
atc agc aag gcc aag ggc cag ccc cgg gag ccc cag gtg tac acc ctg	1056
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu	
340 345 350	
ccc ccc agc cgg gag gag atg acc aag aac cag gtg tcc ctc acc tgt	1104
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys	
355 360 365	
ctg gtg aag ggc ttc tac ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc	1152
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser	
370 375 380	
aac ggc cag ccc gag aac aac tac aag acc acc ccc cct gtg ctg gac	1200
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp	
385 390 395 400	
agc gac ggc agc ttc ttc ctg tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc	1248
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser	
405 410 415	
cgg tgg cag cag ggc aac gtg ttc agc tgc agc gtg atg cac gag gcc	1296
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala	
420 425 430	
ctg cac aac cac tac acc cag aag agc ctg agc ctg agc ccc ggc aag	1344
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
435 440 445	

<210> 60

<211> 448

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada CR4261

<400> 60

ES 2 365 749 T3

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

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

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

Gly Trp Ile His Pro Val Asn Gly Asp Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Tyr Asp Ser Trp Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser

225					230					235					240
Val	Phe	Leu	Phe	Pro 245	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp 250	Thr	Leu	Met	Ile	Ser 255	Arg
Thr	Pro	Glu	Val 260	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp 265	Val	Ser	His	Glu 270	Asp	Pro
Glu	Val	Lys 275	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val 280	Asp	Gly	Val	Glu	Val 285	His	Asn	Ala
Lys	Thr 290	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu 295	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr 300	Tyr	Arg	Val	Val
Ser 305	Val	Leu	Thr	Val	Leu 310	His	Gln	Asp	Trp	Leu 315	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr 320
Lys	Cys	Lys	Val	Ser 325	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro 330	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys 335	Thr
Ile	Ser	Lys	Ala 340	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg 345	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr 350	Thr	Leu
Pro	Pro	Ser 355	Arg	Glu	Glu	Met	Thr 360	Lys	Asn	Gln	Val	Ser 365	Leu	Thr	Cys
Leu 370	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro 375	Ser	Asp	Ile	Ala	Val 380	Glu	Trp	Glu	Ser
Asn 385	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn 390	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr 395	Pro	Pro	Val	Leu	Asp 400
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe 405	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys 410	Leu	Thr	Val	Asp	Lys 415	Ser
Arg	Trp	Gln	Gln 420	Gly	Asn	Val	Phe	Ser 425	Cys	Ser	Val	Met	His 430	Glu	Ala
Leu	His 435	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys 440	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser 445	Pro	Gly	Lys

<210> 61

<211> 1377

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Cadena pesada CR4267

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1377)

10 <223>

<400> 61

cag	gtg	cag	ctg	gtg	cag	tct	ggg	act	gag	gtg	aag	aag	cct	ggg	tcc		48
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Thr	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser		
1				5					10					15			
tcg	gtg	aag	gtc	tcc	tgc	aag	gct	tct	gga	ggc	acc	ttc	agc	aac	tat		96
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Gly	Thr	Phe	Ser	Asn	Tyr		
			20					25					30				
gct	atc	agc	tgg	gtg	cga	cag	gcc	cct	gga	caa	ggg	ctt	gag	tgg	atg		144
Ala	Ile	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met		
			35				40						45				
gga	ggt	atc	gtc	cct	aag	ttt	gct	aca	aca	agc	tac	gca	cag	agg	ttc		192
Gly	Gly	Ile	Val	Pro	Lys	Phe	Ala	Thr	Thr	Ser	Tyr	Ala	Gln	Arg	Phe		
			50			55					60						
cag	ggc	aga	gtc	acg	att	acc	gcg	gac	gaa	tcc	acg	agc	aca	gtc	tac		240
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser	Thr	Val	Tyr		
65					70					75					80		
atg	gag	ctg	agc	agc	ctg	aga	tct	gag	gac	acg	gcc	gtg	tat	ttt	tgt		288
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys		
				85						90					95		
gcg	aga	ttt	gga	gtg	gtg	gta	gct	gcc	gac	cgt	caa	gga	gcc	tac	tac		336
Ala	Arg	Phe	Gly	Val	Val	Val	Ala	Ala	Asp	Arg	Gln	Gly	Ala	Tyr	Tyr		
			100					105						110			
tac	tac	ggt	atg	gac	gtc	tgg	ggc	cag	ggc	acc	acc	gtg	acc	gtc	tcc		384
Tyr	Tyr	Gly	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser		
			115				120						125				
agc	gct	agc	acc	aag	ggc	ccc	agc	gtg	ttc	ccc	ctg	gcc	ccc	agc	agc		432
Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser		

130		135		140		
aag agc acc agc ggc ggc aca gcc gcc ctg ggc tgc ctg gtg aag gac						480
Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp						
145		150		155		160
tac ttc ccc gag ccc gtg acc gtg agc tgg aac agc ggc gcc ttg acc						528
Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr						
		165		170		175
agc ggc gtg cac acc ttc ccc gcc gtg ctg cag agc agc ggc ctg tac						576
Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr						
		180		185		190
agc ctg agc agc gtg gtg acc gtg ccc agc agc agc ctg ggc acc cag						624
Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln						
		195		200		205
acc tac atc tgc aac gtg aac cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac						672
Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp						
		210		215		220
aaa cgc gtg gag ccc aag agc tgc gac aag acc cac acc tgc ccc ccc						720
Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro						
		225		230		235
tgc cct gcc ccc gag ctg ctg ggc gga ccc tcc gtg ttc ctg ttc ccc						768
Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro						
		245		250		255
ccc aag ccc aag gac acc ctc atg atc agc cgg acc ccc gag gtg acc						816
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr						
		260		265		270
tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gag gac ccc gag gtg aag ttc aac						864
Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn						
		275		280		285
tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cac aac gcc aag acc aag ccc cgg						912
Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg						
		290		295		300
gag gag cag tac aac agc acc tac cgg gtg gtg agc gtg ctc acc gtg						960
Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val						
		305		310		315
ctg cac cag gac tgg ctg aac ggc aag gag tac aag tgc aag gtg agc						1008
Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser						
		325		330		335
aac aag gcc ctg cct gcc ccc atc gag aag acc atc agc aag gcc aag						1056
Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys						
		340		345		350
ggc cag ccc cgg gag ccc cag gtg tac acc ctg ccc ccc agc cgg gag						1104
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu						
		355		360		365

gag atg acc aag aac cag gtg tcc ctc acc tgt ctg gtg aag ggc ttc 1152
 Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 370 375 380

tac ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aac ggc cag ccc gag 1200
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 385 390 395 400

aac aac tac aag acc acc ccc cct gtg ctg gac agc gac ggc agc ttc 1248
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 405 410 415

ttc ctg tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc cgg tgg cag cag ggc 1296
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 420 425 430

aac gtg ttc agc tgc agc gtg atg cac gag gcc ctg cac aac cac tac 1344
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 435 440 445

acc cag aag agc ctg agc ctg agc ccc ggc aag 1377
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455

<210> 62

<211> 459

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada CR4267

<400> 62

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Phe Gly Val Val Val Ala Ala Asp Arg Gln Gly Ala Tyr Tyr
100 105 110

Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
130 135 140

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
145 150 155 160

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
165 170 175

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
180 185 190

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
195 200 205

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
210 215 220

Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
225 230 235 240

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
245 250 255

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
260 265 270

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
275 280 285

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 290 295 300

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 305 310 315 320

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 325 330 335

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 340 345 350

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
 355 360 365

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 370 375 380

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 385 390 395 400

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 405 410 415

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 420 425 430

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 435 440 445

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455

<210> 63

<211> 1344

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada CR4328

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(1399)

<223>

<400> 63

cag	gtg	cag	ctg	gtg	cag	tct	ggg	gct	gaa	atg	aag	aag	cct	ggg	gcc		48
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Met	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala		
1				5					10					15			
tca	gtg	aag	gtc	tcc	tgc	aag	gct	tct	gga	tac	acc	ttc	act	agc	tat		96
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr		
			20					25					30				
gct	atg	cat	tgg	gtg	cgc	cag	gcc	ccc	gga	caa	agg	ctt	gag	tgg	atg		144
Ala	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Arg	Leu	Glu	Trp	Met		
		35					40					45					
gga	tgg	atc	aac	gct	ggc	aat	ggt	aac	aca	aaa	tat	tca	cag	aag	ttc		192
Gly	Trp	Ile	Asn	Ala	Gly	Asn	Gly	Asn	Thr	Lys	Tyr	Ser	Gln	Lys	Phe		
	50					55					60						
cag	ggc	aga	gtc	acc	att	acc	agg	gac	aca	tcc	gcg	agc	aca	gcc	tac		240
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr		
65					70					75					80		
atg	gag	ctg	agc	agc	ctg	aga	tct	gaa	gac	acg	gct	gtg	tat	tac	tgt		288
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys		
				85					90						95		
gcg	agg	ggg	tac	gac	agc	tgg	tct	ttt	gac	tac	tgg	ggc	cag	ggc	acc		336
Ala	Arg	Gly	Tyr	Asp	Ser	Trp	Ser	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr		
			100					105					110				
ctg	gtg	acc	gtc	tcc	agc	gct	agc	acc	aag	ggc	ccc	agc	gtg	ttc	ccc		384
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro		
		115					120					125					
ctg	gcc	ccc	agc	agc	aag	agc	acc	agc	ggc	ggc	aca	gcc	gcc	ctg	ggc		432
Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly		
	130					135					140						
tgc	ctg	gtg	aag	gac	tac	ttc	ccc	gag	ccc	gtg	acc	gtg	agc	tgg	aac		480
Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn		
145					150					155					160		
agc	ggc	gcc	ttg	acc	agc	ggc	gtg	cac	acc	ttc	ccc	gcc	gtg	ctg	cag		528
Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln		
				165					170					175			
agc	agc	ggc	ctg	tac	agc	ctg	agc	agc	gtg	gtg	acc	gtg	ccc	agc	agc		576

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser	
180	185
190	
agc ctg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aac cac aag ccc agc	624
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser	
195	200
205	
aac acc aag gtg gac aaa cgc gtg gag ccc aag agc tgc gac aag acc	672
Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr	
210	215
220	
cac acc tgc ccc ccc tgc cct gcc ccc gag ctg ctg ggc gga ccc tcc	720
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser	
225	230
235	240
gtg ttc ctg ttc ccc ccc aag ccc aag gac acc ctc atg atc agc cgg	768
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg	
245	250
255	
acc ccc gag gtg acc tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gag gac ccc	816
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro	
260	265
270	
gag gtg aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cac aac gcc	864
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala	
275	280
285	
aag acc aag ccc cgg gag gag cag tac aac agc acc tac cgg gtg gtg	912
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val	
290	295
300	
agc gtg ctc acc gtg ctg cac cag gac tgg ctg aac ggc aag gag tac	960
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr	
305	310
315	320
aag tgc aag gtg agc aac aag gcc ctg cct gcc ccc atc gag aag acc	1008
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr	
325	330
335	
atc agc aag gcc aag ggc cag ccc cgg gag ccc cag gtg tac acc ctg	1056
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu	
340	345
350	
ccc ccc agc cgg gag gag atg acc aag aac cag gtg tcc ctc acc tgt	1104
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys	
355	360
365	
ctg gtg aag ggc ttc tac ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc	1152
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser	
370	375
380	
aac ggc cag ccc gag aac aac tac aag acc acc ccc cct gtg ctg gac	1200
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp	
385	390
395	400
agc gac ggc agc ttc ttc ctg tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc	1248
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser	

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350

ES 2 365 749 T3

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 65

<211> 1347

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada CR4335

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(1397)

<223>

<400> 65

cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggc agg 48
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gta gcc tct gga ttc acc ttc agt aag gac 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Lys Asp
 20 25 30

gct atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg cta gag tgg gtg Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val 35 40 45	144
gca gtt ata tca tat gat gga agt gat aaa cac tac gca gac tcc gtg Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asp Lys His Tyr Ala Asp Ser Val 50 55 60	192
aag ggc cga gtc acc atc tcc aga gac aat tcc agg aaa acg ctg cat Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Arg Lys Thr Leu His 65 70 75 80	240
ctg cga atg gac agc ctg aga gct gag gac acg gct cta tat tac tgt Leu Arg Met Asp Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys 85 90 95	288
gcg aga gga tac aac tct ggt cat tac ttt gac tac tgg ggc cag ggc Ala Arg Gly Tyr Asn Ser Gly His Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly 100 105 110	336
acc ctg gtg acc gtc tcc agc gct agc acc aag ggc ccc agc gtg ttc Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe 115 120 125	384
ccc ctg gcc ccc agc agc aag agc acc agc ggc ggc aca gcc gcc ctg Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu 130 135 140	432
ggc tgc ctg gtg aag gac tac ttc ccc gag ccc gtg acc gtg agc tgg Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp 145 150 155 160	480
aac agc ggc gcc ttg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccc gcc gtg ctg Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu 165 170 175	528
cag agc agc ggc ctg tac agc ctg agc agc gtg gtg acc gtg ccc agc Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser 180 185 190	576
agc agc ctg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aac cac aag ccc Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro 195 200 205	624
agc aac acc aag gtg gac aaa cgc gtg gag ccc aag agc tgc gac aag Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys 210 215 220	672
acc cac acc tgc ccc ccc tgc cct gcc ccc gag ctg ctg gcc gga ccc Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro 225 230 235 240	720
tcc gtg ttc ctg ttc ccc ccc aag ccc aag gac acc ctc atg atc agc Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser 245 250 255	768

cgg acc ccc gag gtg acc tgc gtg gtg gtg gac gtg aqc cac gag gac	816
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp	
260 265 270	
ccc gag gtg aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cac aac	864
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn	
275 280 285	
gcc aag acc aag ccc cgg gag gag cag tac aac agc acc tac cgg gtg	912
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val	
290 295 300	
gtg agc gtg ctc acc gtg ctg cac cag gac tgg ctg aac ggc aag gag	960
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu	
305 310 315 320	
tac aag tgc aag gtg agc aac aag gcc ctg cct gcc ccc atc gag aag	1008
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys	
325 330 335	
acc atc agc aag gcc aag ggc cag ccc cgg gag ccc cag gtg tac acc	1056
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr	
340 345 350	
ctg ccc ccc agc cgg gag gag atg acc aag aac cag gtg tcc ctc acc	1104
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr	
355 360 365	
tgt ctg gtg aag ggc ttc tac ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag	1152
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu	
370 375 380	
agc aac ggc cag ccc gag aac aac tac aag acc acc ccc cct gtg ctg	1200
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu	
385 390 395 400	
gac agc gac ggc agc ttc ttc ctg tac agc aag ctc acc gtg gac aag	1248
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys	
405 410 415	
agc cgg tgg cag cag ggc aac gtg ttc agc tgc agc gtg atg cac gag	1296
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu	
420 425 430	
gcc ctg cac aac cac tac acc cag aag agc ctg agc ctg agc ccc ggc	1344
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly	
435 440 445	
aag	1347
Lys	

<210> 66

<211> 449

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada CR4335

<400> 66

ES 2 365 749 T3

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Lys Asp
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asp Lys His Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Arg Lys Thr Leu His
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Asn Ser Gly His Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

Lys

<210> 67

<211> 1368

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada CR4383

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(1368)

<223>

<400> 67

cag	gtg	cag	ctg	gtg	cag	tct	ggg	gct	gag	gtg	aag	aag	cct	ggg	gcc	48
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	
1				5					10					15		
tca	gtg	aag	gtc	tcc	tgc	aag	act	tct	gga	tac	acc	ttc	acc	gac	tac	96
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Thr	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr	
			20						25					30		
tat	ctg	cac	tgg	gtg	cga	cac	gcc	cct	gga	caa	ggg	ctt	gag	tgg	atg	144
Tyr	Leu	His	Trp	Val	Arg	His	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
			35				40						45			
gga	tgg	atc	aac	cct	aac	agt	ggt	gac	aca	aac	tat	gca	cag	aag	ttt	192
Gly	Trp	Ile	Asn	Pro	Asn	Ser	Gly	Asp	Thr	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	
			50			55					60					
cag	ggc	agg	gtc	acc	atg	acc	agg	gac	acg	tcc	atc	agc	aca	gcc	tac	240
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr	

65		70		75		80	
atg gac ctg agc agg ctg aga tct gac gac gcg gcc gtg tat tac tgt							288
Met Asp Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Ala Ala Val Tyr Tyr Cys		85		90		95	
gcg aga gat tgg aat acg gtg act acg tac tac tat tac tac tac ggt							336
Ala Arg Asp Trp Asn Thr Val Thr Thr Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly		100		105		110	
atg gac gtc tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcg agt gct agc							384
Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser		115		120		125	
acc aag ggc ccc agc gtg ttc ccc ctg gcc ccc agc agc aag agc acc							432
Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr		130		135		140	
agc ggc ggc aca gcc gcc ctg ggc tgc ctg gtg aag gac tac ttc ccc							480
Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro		145		150		155	160
gag ccc gtg acc gtg agc tgg aac agc ggc gcc ttg acc agc ggc gtg							528
Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val		165		170		175	
cac acc ttc ccc gcc gtg ctg cag agc agc ggc ctg tac agc ctg agc							576
His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser		180		185		190	
agc gtg gtg acc gtg ccc agc agc agc ctg ggc acc cag acc tac atc							624
Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile		195		200		205	
tgc aac gtg aac cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aaa cgc gtg							672
Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val		210		215		220	
gag ccc aag agc tgc gac aag acc cac acc tgc ccc ccc tgc cct gcc							720
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala		225		230		235	240
ccc gag ctg ctg ggc gga ccc tcc gtg ttc ctg ttc ccc ccc aag ccc							768
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro		245		250		255	
aag gac acc ctc atg atc agc cgg acc ccc gag gtg acc tgc gtg gtg							816
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val		260		265		270	
gtg gac gtg agc cac gag gac ccc gag gtg aag ttc aac tgg tac gtg							864
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val		275		280		285	
gac ggc gtg gag gtg cac aac gcc aag acc aag ccc cgg gag gag cag							912
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln		290		295		300	

tac aac agc acc tac cgg gtg gtg agc gtg ctc acc gtg ctg cac cag Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln 305 310 315 320	960
gac tgg ctg aac ggc aag gag tac aag tgc aag gtg agc aac aag gcc Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala 325 330 335	1008
ctg cct gcc ccc atc gag aag acc atc agc aag gcc aag ggc cag ccc Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro 340 345 350	1056
cgg gag ccc cag gtg tac acc ctg ccc ccc agc cgg gag gag atg acc Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr 355 360 365	1104
aag aac cag gtg tcc ctc acc tgt ctg gtg aag ggc ttc tac ccc agc Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser 370 375 380	1152
gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aac ggc cag ccc gag aac aac tac Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr 385 390 395 400	1200
aag acc acc ccc cct gtg ctg gac agc gac ggc agc ttc ttc ctg tac Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr 405 410 415	1248
agc aag ctc acc gtg gac aag agc cgg tgg cag cag ggc aac gtg ttc Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe 420 425 430	1296
agc tgc agc gtg atg cac gag gcc ctg cac aac cac tac acc cag aag Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys 435 440 445	1344
agc ctg agc ctg agc ccc ggc aag Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys 450 455	1368

<210> 68

<211> 456

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada CR4383

<400> 68

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Leu His Trp Val Arg His Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Asp Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Ala Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Trp Asn Thr Val Thr Thr Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
 100 105 110
 Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 115 120 125
 Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
 130 135 140
 Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
 145 150 155 160
 Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 165 170 175
 His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 180 185 190
 Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
 195 200 205
 Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val
 210 215 220

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 225 230 235 240
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 245 250 255
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 260 265 270
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 275 280 285
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 290 295 300
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 305 310 315 320
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 325 330 335
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 340 345 350
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 355 360 365
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 370 375 380
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 385 390 395 400
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 405 410 415
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 420 425 430
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 435 440 445
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

<210> 69
 <211> 669
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Cadena ligera CR4261
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(669)
 10 <223>
 <400> 69

tcg acg cag gct gtg ctg act cag ccg tcc tca gcg tct ggg acc ccc	48
Ser Thr Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Ala Ser Gly Thr Pro	
1 5 10 15	
ggg cag agg gtc acc atc tct tgt tct gga agc agc ccc aac atc gga	96
Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Pro Asn Ile Gly	
20 25 30	
agt aat aat gta aac tgg tac cag cag ctc cca gga acg gcc ccc aaa	144
Ser Asn Asn Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys	
35 40 45	
ctc ctc att tat agt aat aat cag cgg ccc tca ggg gtc cct .ggc cga	192
Leu Leu Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Gly Arg	
50 55 60	
ttc tct ggc tcc aag tct ggc acc tca gcc tcc ctg gcc atc agt ggg	240
Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly	
65 70 75 80	
ctc cag tct gag gat gag gct gat tat tac tgt gca gca tgg gat gac	288
Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp	
85 90 95	
ggc cta agt ggt aat tat gtc ttc gga gct ggg acc cag ctc acc gtt	336
Gly Leu Ser Gly Asn Tyr Val Phe Gly Ala Gly Thr Gln Leu Thr Val	
100 105 110	
tta agt gcg gcc gca ggc cag ccc aag gcc gct ccc agc gtg acc ctg	384

Leu Ser Ala Ala Ala Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu
 115 120 125

ttc ccc ccc tcc tcc gag gag ctg cag gcc aac aag gcc acc ctg gtg 432
 Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val
 130 135 140

tgc ctc atc agc gac ttc tac cct ggc gcc gtg acc gtg gcc tgg aag 480
 Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys
 145 150 155 160

gcc gac agc agc ccc gtg aag gcc ggc gtg gag acc acc acc ccc agc 528
 Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser
 165 170 175

aag cag agc aac aac aag tac gcc gcc agc agc tac ctg agc ctc acc 576
 Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr
 180 185 190

ccc gag cag tgg aag agc cac cgg agc tac agc tgc cag gtg acc cac 624
 Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His
 195 200 205

gag ggc agc acc gtg gag aag acc gtg gcc ccc acc gag tgc agc 669
 Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215 220

<210> 70

<211> 223

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera CR4261

<400> 70

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

Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Pro Asn Ile Gly
 20 25 30

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

Leu Leu Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Gly Arg

<400> 71

cag tcc gtg ctg acc cag cct ccc tca gcg tct ggg acc ccc ggg cag 48
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15

agg gtc acc atc tct tgt tct gga agc agc tcc aac atc gga agt aat 96
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30

act gta aac tgg tac cag cag ctc cca gga acg gcc ccc aaa ctc ctc 144
 Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

atc tat agt aat aat cag cgg ccc tca ggg gtc cct gac cga ttc tct 192
 Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

ggc tcc aag tct ggc acc tca gcc tcc ctg gcc atc agt ggg ctc cag 240
 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
 65 70 75 80

tct gag gat gag gct gat tat tat tgt gca gct tgg gat gac acc ctg 288
 Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Thr Leu
 85 90 95

aat ggt tat gtc ttc gga act ggc acc aag ctt acc gtg ctg ggc cag 336
 Asn Gly Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110

ccc aag gcc gct ccc agc gtg acc ctg ttc ccc ccc tcc tcc gag gag 384
 Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
 115 120 125

ctg cag gcc aac aag gcc acc ctg gtg tgc ctc atc agc gac ttc tac 432
 Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
 130 135 140

cct ggc gcc gtg acc gtg gcc tgg aag gcc gac agc agc ccc gtg aag 480
 Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
 145 150 155 160

gcc ggc gtg gag acc acc acc ccc agc aag cag agc aac aac aag tac 528
 Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
 165 170 175

gcc gcc agc agc tac ctg agc ctc acc ccc gag cag tgg aag agc cac 576
 Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His

180

185

190

cgg agc tac agc tgc cag gtg acc cac gag ggc agc acc gtg gag aag 624
 Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
 195 200 205

acc gtg gcc ccc acc gag tgc agc 648
 Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215

<210> 72

<211> 216

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Cadena ligera CR4267

<400> 72

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30

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

Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
 65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Thr Leu
 85 90 95

Asn Gly Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
 115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
 130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
 145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
 165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
 180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
 195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215

<210> 73

<211> 666

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera CR4328

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(666)

<223>

<400> 73

tcg acg cag gct gtg ctg act cag ccg tcc tca gtg tct ggg acc ccc 48
 Ser Thr Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Thr Pro
 1 5 10 15

ggg cag agg gtc acc atc tct tgt tct gga agc agc tcc aac atc gga 96
 Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly

20					25					30						
agt	aat	act	gta	aac	tgg	tac	cag	cag	ctt	cca	gga	aca	gcc	ccc	aaa	144
Ser	Asn	Thr	Val	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Leu	Pro	Gly	Thr	Ala	Pro	Lys	
		35					40					45				
ctc	ctc	atc	tat	ggt	aac	aac	aat	cgg	ccc	tca	ggg	gtc	cct	gcc	cga	192
Leu	Leu	Ile	Tyr	Gly	Asn	Asn	Asn	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	
	50					55					60					
ttc	tct	ggc	tcc	agg	tct	ggc	acc	tca	gcc	tcc	ctg	gcc	atc	agt	ggg	240
Phe	Ser	Gly	Ser	Arg	Ser	Gly	Thr	Ser	Ala	Ser	Leu	Ala	Ile	Ser	Gly	
65					70				75						80	
ctc	cgg	tcc	gag	gat	gag	gct	gat	tat	tac	tgt	gca	gca	tgg	gat	gac	288
Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ala	Trp	Asp	Asp	
				85					90					95		
agc	ctg	aat	ggc	ccg	gtg	ttc	ggc	gga	ggg	acc	aag	ctg	acc	gtc	cta	336
Ser	Leu	Asn	Gly	Pro	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	
			100					105					110			
ggc	gca	ggc	cag	ccc	aag	gcc	gct	ccc	agc	gtg	acc	ctg	ttc			384
Gly	Ala	Ala	Ala	Gly	Gln	Pro	Lys	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Thr	Leu	Phe	
		115					120					125				
ccc	ccc	tcc	tcc	gag	gag	ctg	cag	gcc	aac	aag	gcc	acc	ctg	gtg	tgc	432
Pro	Pro	Ser	Ser	Glu	Glu	Leu	Gln	Ala	Asn	Lys	Ala	Thr	Leu	Val	Cys	
	130					135					140					
ctc	atc	agc	gac	ttc	tac	cct	ggc	gcc	gtg	acc	gtg	gcc	tgg	aag	gcc	480
Leu	Ile	Ser	Asp	Phe	Tyr	Pro	Gly	Ala	Val	Thr	Val	Ala	Trp	Lys	Ala	
145					150					155					160	
gac	agc	agc	ccc	gtg	aag	gcc	ggc	gtg	gag	acc	acc	acc	ccc	agc	aag	528
Asp	Ser	Ser	Pro	Val	Lys	Ala	Gly	Val	Glu	Thr	Thr	Thr	Pro	Ser	Lys	
				165					170					175		
cag	agc	aac	aac	aag	tac	gcc	gcc	agc	agc	tac	ctg	agc	ctc	acc	ccc	576
Gln	Ser	Asn	Asn	Lys	Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ser	Leu	Thr	Pro	
			180					185					190			
gag	cag	tgg	aag	agc	cac	cgg	agc	tac	agc	tgc	cag	gtg	acc	cac	gag	624
Glu	Gln	Trp	Lys	Ser	His	Arg	Ser	Tyr	Ser	Cys	Gln	Val	Thr	His	Glu	
		195					200					205				
ggc	agc	acc	gtg	gag	aag	acc	gtg	gcc	ccc	acc	gag	tgc	agc			666
Gly	Ser	Thr	Val	Glu	Lys	Thr	Val	Ala	Pro	Thr	Glu	Cys	Ser			
	210					215					220					

<210> 74

<211> 222

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera CR4328

<400> 74

ES 2 365 749 T3

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

Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly
 20 25 30

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

Leu Leu Ile Tyr Gly Asn Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Ala Arg
 50 55 60

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

Leu Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp
 85 90 95

Ser Leu Asn Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

Gly Ala Ala Ala Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe
 115 120 125

Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys
 130 135 140

Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala
 145 150 155 160

Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys
 165 170 175

Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro
 180 185 190

Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu
 195 200 205

Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215 220

<210> 75

<211> 666

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Cadena ligera CR4335

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(666)

<223>

10 <400> 75

tcg acg cag tct gtg ctg act cag cca ccc tca acg tct ggg acc ccc	48
Ser Thr Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Thr Ser Gly Thr Pro	
1 5 10 15	
ggg cag agg gtc acc atc tct tgt tct gga agc gac tcc aac atc ggc	96
Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Asp Ser Asn Ile Gly	
20 25 30	
agt aat act gta aac tgg tac cag cag ctc cca gga atg gcc ccc aaa	144
Ser Asn Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Met Ala Pro Lys	
35 40 45	
ctc ctc atc tat agg aat aat cag cgg ccc tca ggg gtc cct gac cga	192
Leu Leu Ile Tyr Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg	
50 55 60	
ttc tct ggc tcc aag tct ggc acc tca gcc tcc ctg gcc atc agt ggt	240
Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly	
65 70 75 80	
ctc cag tct gaa gat gag gct gac tat ttc tgt gca tca tgg gat gcc	288
Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ala Ser Trp Asp Ala	
85 90 95	

aat ctg ggt ggt ccg ctg ttc ggt ggg ggg acc aag gtc acc gtc cta 336
 Asn Leu Gly Gly Pro Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105 110

 ggt gcg gcc gca ggc cag ccc aag gcc gct ccc agc gtg acc ctg ttc 384
 Gly Ala Ala Ala Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe
 115 120 125

 ccc ccc tcc tcc gag gag ctg cag gcc aac aag gcc acc ctg gtg tgc 432
 Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys
 130 135 140

 ctc atc agc gac ttc tac cct ggc gcc gtg acc gtg gcc tgg aag gcc 480
 Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala
 145 150 155 160

 gac agc agc ccc gtg aag gcc ggc gtg gag acc acc acc ccc agc aag 528
 Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys
 165 170 175

 cag agc aac aac aag tac gcc gcc agc agc tac ctg agc ctc acc ccc 576
 Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro
 180 185 190

 gag cag tgg aag agc cac cgg agc tac agc tgc cag gtg acc cac gag 624
 Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu
 195 200 205

 ggc agc acc gtg gag aag acc gtg gcc ccc acc gag tgc agc 666
 Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215 220

<210> 76

<211> 222

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera CR4335

<400> 76

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

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

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

Leu Leu Ile Tyr Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg
 50 55 60

Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly
 65 70 75 80

Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ala Ser Trp Asp Ala
 85 90 95

Asn Leu Gly Gly Pro Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105 110

Gly Ala Ala Ala Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe
 115 120 125

Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys
 130 135 140

Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala
 145 150 155 160

Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys
 165 170 175

Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro
 180 185 190

Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu
 195 200 205

Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215 220

<210> 77

<211> 666

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera CR4383

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(666)

5 <223>

<400> 77

tcg acg cag tct gtg ctg act cag cca ccc tca gcg tct ggg acc ccc	48
Ser Thr Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro	
1 5 10 15	
ggg cag agg gtc acc atc tct tgt tct gga ggc atc tcc aac atc gga	96
Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Gly Ile Ser Asn Ile Gly	
20 25 30	
agt aat agt gta aat tgg ttc cag caa ctc cca gga acg gcc ccc aaa	144
Ser Asn Ser Val Asn Trp Phe Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys	
35 40 45	
ctc ctc ctc tac agt aat aat cag cgg gcc tca ggg gtc cct gac cga	192
Leu Leu Leu Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg	
50 55 60	
ttc tct ggc tcc aag tct ggc acc tca gcc tcc ctg gcc atc agt ggg	240
Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly	
65 70 75 80	
ctc cag tct gag gat gag gtt gat tat tac tgt gca gca tgg gat gac	288
Leu Gln Ser Glu Asp Glu Val Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp	
85 90 95	
cgc ctg att ggt tat gtc ttc gga acg ggg acc aag gtc acc gtc cta	336
Arg Leu Ile Gly Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu	
100 105 110	
ggg gcg gcc gca ggc cag ccc aag gcc gct ccc agc gtg acc ctg ttc	384
Gly Ala Ala Ala Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe	
115 120 125	
ccc ccc tcc tcc gag gag ctg cag gcc aac aag gcc acc ctg gtg tgc	432
Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys	
130 135 140	
ctc atc agc gac ttc tac cct ggc gcc gtg acc gtg gcc tgg aag gcc	480
Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala	
145 150 155 160	

gac agc agc ccc gtg aag gcc ggc gtg gag acc acc acc ccc agc aag 528
 Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys
 165 170 175

cag agc aac aac aag tac gcc gcc agc agc tac ctg agc ctc acc ccc 576
 Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro
 180 185 190

gag cag tgg aag agc cac cgg agc tac agc tgc cag gtg acc cac gag 624
 Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu
 195 200 205

ggc agc acc gtg gag aag acc gtg gcc ccc acc gag tgc agc 666
 Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215 220

<210> 78

<211> 222

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera CR4383

<400> 78

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

Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Gly Ile Ser Asn Ile Gly
 20 25 30

Ser Asn Ser Val Asn Trp Phe Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys
 35 40 45

Leu Leu Leu Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg
 50 55 60

Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly
 65 70 75 80

Leu Gln Ser Glu Asp Glu Val Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp
 85 90 95

Arg Leu Ile Gly Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105 110

Gly Ala Ala Ala Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe
 115 120 125

Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys
 130 135 140

Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala
 145 150 155 160

Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys
 165 170 175

Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro
 180 185 190

Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu
 195 200 205

Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215 220

<210> 79

<211> 23

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> HuVlambda1A

<400> 79

cagtctgtgc tgactcagcc acc

23

10 <210> 80

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> HuVlambda1B

<400> 80

cagtctgtgy tgacgcagcc gcc

23

<210> 81

<211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> HuVlambda1C
 <400> 81
 cagtctgtcg tgacgcagcc gcc 23
 <210> 82
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> HuVlambda2
 <400> 82
 15 cartctgccc tgactcagcc t 21
 <210> 83
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> HuVlambda3A
 <400> 83
 tcctatgwgc tgactcagcc acc 23
 <210> 84
 25 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> HuVlambda3B
 30 <400> 84
 tcttctgagc tgactcagga ccc 23
 <210> 85
 <211> 23
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> HuVlambda4

	<400> 85	
	cacgttatac tgactcaacc gcc	23
	<210> 86	
	<211> 23	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> HuVlambda5	
	<400> 86	
10	caggctgtgc tgactcagcc gtc	23
	<210> 87	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Huvlambda6	
	<400> 87	
	aatattatgc tgactcagcc cca	23
	<210> 88	
20	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> HuVlambda7/8	
25	<400> 88	
	cagrctgtgg tgacycagga gcc	23
	<210> 89	
	<211> 23	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Huvlambda9	
	<400> 89	
	cwgccctgtgc tgactcagcc mcc	23
35	<210> 90	
	<211> 23	
	<212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> HuVkappa1B	
	<400> 90	
5	gacatccagw tgaccagtc tcc	23
	<210> 91	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> HuVkappa2	
	<400> 91	
	gatgttga tgactcagtc tcc	23
	<210> 92	
15	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> HuVkappa3	
20	<400> 92	
	gaaattgtgw tgacrcagtc tcc	23
	<210> 93	
	<211> 23	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> HuVkappa4	
	<400> 93	
	gatattga tgaccacac tcc	23
30	<210> 94	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> HuVkappa5	
	<400> 94	
	gaaacgacac tcacgcagtc tcc	23

	<210> 95	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> HuVkappa6	
	<400> 95	
	gaaattgtgc tgactcagtc tcc	23
	<210> 96	
10	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> HuVkappa1B-Sall	
15	<400> 96	
	tgagcacaca ggtcgacgga catccagwtg acccagtctc c	41
	<210> 97	
	<211> 41	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> HuVkappa2-Sall	
	<400> 97	
	tgagcacaca ggtcgacgga tgttgatg actcagtctc c	41
25	<210> 98	
	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> HuVkappa3B-Sall	
	<400> 98	
	tgagcacaca ggtcgacgga aattgtgwtg acrcagtctc c	41
	<210> 99	
	<211> 41	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	

	<223> HuVkappa4B-Sall	
	<400> 99	
	tgagcacaca ggtcgacgga tattgtgatg acccacactc c	41
	<210> 100	
5	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> HuVkappa5-Sall	
10	<400> 100	
	tgagcacaca ggtcgacgga aacgacactc acgcagtctc c	41
	<210> 101	
	<211> 41	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> HuVkappa6-Sall	
	<400> 101	
	tgagcacaca ggtcgacgga aattgtgctg actcagtctc c	41
20	<210> 102	
	<211> 48	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> HuJkappa1-NotI	
	<400> 102	
	gagtcattct cgactgctgg cgcacggtt gattccacc ttgtccc	48
	<210> 103	
	<211> 48	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> HuJkappa2-NotI	
	<400> 103	
35	gagtcattct cgactgctgg cgcacggtt gatctccagc ttgtccc	48
	<210> 104	
	<211> 48	

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> HuJkappa3-NotI	
5	<400> 104	
	gagtcattct cgactgcgg cgcacggtt gatatccact ttgtccc	48
	<210> 105	
	<211> 48	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> HuJkappa4-NotI	
	<400> 105	
	gagtcattct cgactgcgg cgcacggtt gatctccacc ttgtccc	48
15	<210> 106	
	<211> 48	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> HuJkappa5-NotI	
	<400> 106	
	gagtcattct cgactgcgg cgcacggtt aatctccagt cgtgtccc	48
	<210> 107	
	<211> 41	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> HuVlambda1A-Sall	
	<400> 107	
30	tgagcacaca ggtcgacgca gtctgtgctg actcagccac c	41
	<210> 108	
	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> HuVlambda1B-Sall	
	<400> 108	

	tgagcacaca ggtcgacgca gtctgtgytg acgcagccgc c	41
	<210> 109	
	<211> 41	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> HuVlambdaC-Sall	
	<400> 109	
	tgagcacaca ggtcgacgca gtctgtcgtg acgcagccgc c	41
10	<210> 110	
	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> HuVlambda2-Sall	
	<400> 110	
	tgagcacaca ggtcgacgca rtctgccctg actcagcct	39
	<210> 111	
	<211> 41	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> HuVlambda3A-Sall	
	<400> 111	
25	tgagcacaca ggtcgacgtc ctatgwgctg actcagccac c	41
	<210> 112	
	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> HuVlambda3B-Sall	
	<400> 112	
	tgagcacaca ggtcgacgtc ttctgagctg actcaggacc c	41
	<210> 113	
35	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

<220>
 <223> HuVlambda4-Sall
 <400> 113
 tgagcacaca ggtcgacgca cgttatactg actcaaccgc c 41
 5 <210> 114
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> HuVlambda5-Sall
 <400> 114
 tgagcacaca ggtcgacgca ggctgtgctg actcagccgt c 41
 <210> 115
 <211> 41
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> HuVlambda6-Sall
 <400> 115
 20 tgagcacaca ggtcgacgaa tttatgctg actcagcccc a 41
 <210> 116
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Huvlambda7/8-Sall
 <400> 116
 tgagcacaca ggtcgacgca grctgtggtg acycaggagc c 41
 <210> 117
 30 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> HuVlambda9-Sall
 35 <400> 117
 tgagcacaca ggtcgacgca gcctgtgctg actcagccmc c 41
 <210> 118

	<211> 48	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> HuJlambdal-NotI	
	<400> 118	
	gagtcattct cgactgcgg cgcacctag gacggtgacc ttgtccc	48
	<210> 119	
	<211> 48	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> HuJlambda2/3-NotI	
	<400> 119	
15	gagtcattct cgactgcgg cgcacctag gacggtcagc ttgtccc	48
	<210> 120	
	<211> 48	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> HuJlambda4/5-NotI	
	<400> 120	
	gagtcattct cgactgcgg cgcacytaa aacggtgagc tgggtccc	48
	<210> 121	
25	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> HuVH1B/7A	
30	<400> 121	
	cagrtgcagc tgggtcartc tgg	23
	<210> 122	
	<211> 23	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> HuVH1C	

	<400> 122	
	saggtccagc tggtrcagtc tgg	23
	<210> 123	
	<211> 23	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> HuVH2B	
	<400> 123	
10	saggtgcagc tggaggagtc tgg	23
	<210> 124	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> HuVH3B	
	<400> 124	
	saggtgcagc tggaggagtc tgg	23
	<210> 125	
20	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> HuVH3C	
25	<400> 125	
	gaggtgcagc tggaggagwc ygg	23
	<210> 126	
	<211> 23	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> HuVH4B	
	<400> 126	
	caggtgcagc tacagcagtg ggg	23
35	<210> 127	
	<211> 23	
	<212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> HuVH4C	
	<400> 127	
5	cagstgcagc tgcaggagtc sgg	23
	<210> 128	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> HuVH5B	
	<400> 128	
	gargtgcagc tgggtgcagtc tgg	23
	<210> 129	
15	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> HuVH6A	
20	<400> 129	
	caggtacagc tgcagcagtc agg	23
	<210> 130	
	<211> 56	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> HuVH1B/7A-Sfil	
	<400> 130	
	gtcctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gccagrtgc agctggtgca rctgg	56
30	<210> 131	
	<211> 56	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> HuVH1C-Sfil	
	<400> 131	
	gtcctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gccsaggtcc agctggrca gtctgg	56

<210> 132
 <211> 56
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> HuVH2B-Sfil
 <400> 132
 gtctctgcaa ctgcggccca gccggccatg gccagrtca cctgaagga gtctgg 56
 <210> 133
 10 <211> 56
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> HuVH3B-Sfil
 15 <400> 133
 gtctctgcaa ctgcggccca gccggccatg gccsaggtgc agctggtgga gtctgg 56
 <210> 134
 <211> 56
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> HuVH3C-Sfil
 <400> 134
 gtctctgcaa ctgcggccca gccggccatg gccgaggtgc agctggtgga gwcygg 56
 25 <210> 135
 <211> 56
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> HuVH4B-Sfil
 <400> 135
 gtctctgcaa ctgcggccca gccggccatg gccaggtgc agctacagca gtgggg 56
 <210> 136
 <211> 56
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

	<223> HuVH4C-Sfil	
	<400> 136	
	gtcctcgcaa ctgcgccca gccggccatg gccagstgc agctgcagga gtcsgg	56
	<210> 137	
5	<211> 56	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> HuVH5B-Sfil	
10	<400> 137	
	gtcctcgcaa ctgcgccca gccggccatg gccgargtc agctggtgca gtctgg	56
	<210> 138	
	<211> 56	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> HuVH6A-Sfil	
	<400> 138	
	gtcctcgcaa ctgcgccca gccggccatg gccaggtac agctgcagca gtcagg	56
20	<210> 139	
	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> HuJH1/2-XhoI	
	<400> 139	
	gagtcattct cgactcgaga cggtagaccag ggtgcc	36
	<210> 140	
	<211> 36	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> HuJH3-XhoI	
	<400> 140	
35	gagtcattct cgactcgaga cggtagaccat tgtccc	36
	<210> 141	
	<211> 36	

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> HuJH4/5-XhoI
 5 <400> 141
 gagtcattct cgactcgaga cggtgaccag ggttcc 36
 <210> 142
 <211> 36
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> HuJH6-xhoI
 <400> 142
 gagtcattct cgactcgaga cggtgaccgt ggtccc 36
 15 <210> 143
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> LCDR1
 <400> 143
 Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val Asn
 1 5 10
 <210> 144
 <211> 7
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> LCDR2
 <400> 144
 Gly Asn Asn Asn Arg Pro Ser
 1 5
 30 <210> 145
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> LCDR3

<400> 145

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Pro Val
1 5 10

5 <210> 146

<211> 5855

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Vector pCR-IgM

<400> 146

```

gttctttcct gcgttatccc ctgattctgt ggataaccgt attaccgcct ttgagtgagc      60
tgataccgct cgccgcagcc gaacgaccga gcgcagcgag tcagtgagcg aggaagcggg      120
agagcgccca atacgcaaac cgctctctcc cgcgcggttg ccgattcatt aatgcagctg      180
gcacgacagg tttcccgact ggaaagcggg cagtgagcgc aacgcaatta atgtgagtta      240
gctcactcat taggcacccc aggctttaca ctttatgctt ccggctcgtg tgttgtgtgg      300
aattgtgagc ggataacaat ttcacacagg aacagctat gaccatgatt acgccaagct      360
cagaattaac cctcactaaa gggactagtc ctgcaggttt aaacgaattc gcccttcagg      420
gagtgctagc gccccaacc ttttcccct cgtctcctgt gagaattccc cgtcggatac      480
gagcagcgtg gccgttggct gcctcgcaca ggacttctt cccgactcca tcactttctc      540
ctggaaatac aagaacaact ctgacatcag cagcacccgg ggcttcccat cagtcctgag      600
agggggcaag tacgcagcca cctcacaggt gctgctgctt tccaaggagc tcatgcaggg      660
cacagacgaa cacgtggtgt gcaaagtcca gcacccaac ggcaacaaag aaaagaacgt      720
gcctcttcca ggtgagggcc gggcccagcc accgggacag agagggagcc gaagggggcg      780
ggagtggcgg gcaccgggct gacacgtgtc cctcactgca gtgattgctg agctgcctcc      840
caaagtgagc gtcttcgtcc caccccgcga cggcttcttc ggcaaccccc gcaagtccaa      900
gctcatctgc caggccacgg gtttcagtcc ccggcagatt caggtgtcct ggctgcgcga      960
ggggaagcag gtggggtctg gcgtcaccac ggaccaggtg caggtgagg ccaaagagtc     1020
tgggcccacg acctacaagg tgaccagcac actgaccatc aaagagagcg actggctcag     1080
ccagagcatg ttcacctgcc gcgtggatca caggggctg accttcagc agaatgcgtc     1140

```

ctccatgtgt	gtccccggtg	agtgacctgt	ccccaggggc	agcaccacc	gacacacagg	1200
gggccactcg	ggctctggcat	tcgccacccc	ggatgcagcc	atctactccc	tgagccttgg	1260
ctccccagag	cggccaaggg	caggggctcg	ggcggcagga	cccctgggct	cggcagaggc	1320
agttgctact	ctttgggtgg	gaacctatgc	tccgcccaca	tccacacctg	ccccacctct	1380
gactcccttc	tcttgactcc	agatcaagac	acagccatcc	gggtcttcgc	catcccccca	1440
tcctttgcc	gcatcttct	caccaagtcc	accaagttga	cctgcctggg	cacagacctg	1500
accacctatg	acagcgtgac	catctcctgg	accgcgccaga	atggcggaagc	tgtgaaaacc	1560
cacaccaaca	tctccgagag	ccaccccaat	gccactttca	gcgccgtggg	tgaggccagc	1620
atctgcgagg	atgactggaa	ttccggggag	aggttcacgt	gcaccgtgac	ccacacagac	1680
ctgccctcgc	cactgaagca	gaccatctcc	cggcccaagg	gtaggcccc	ctcttgcccc	1740
tcttctgca	ctccctggga	cctcccttgg	cctctggggc	atggtggaaa	gcacccctca	1800
ctcccccggt	gtctgggcaa	ctggggaaaa	ggggactcaa	ccccagcccc	caggetggtc	1860
ccccactgc	cccgccctca	ccacctctc	tgttcacagg	ggtggccctg	cacaggccccg	1920
atgtctactt	gctgccacca	gcccgggagc	agctgaacct	gcgggagtcg	gccaccatca	1980
cgtgcctggg	gacgggcttc	tctcccgcgg	acgtcttcgt	gcagtggatg	cagagggggc	2040
agcccttgtc	cccggagaag	tatgtgacca	gcgcccacat	gcctgagccc	caggccccag	2100
gccggtactt	cgccacagc	atcctgaccg	tgtccgaaga	ggaatggaac	acgggggaga	2160
cctacacctg	cgtgggtggc	catgaggccc	tgcccaacag	ggtcaccgag	aggaccgtgg	2220
acaagtccac	cggtaaacce	accctgtaca	acgtgtccct	ggtcatgtcc	gacacagctg	2280
gcacctgcta	ctgatgatct	agatctagaa	cacaaagggc	gaattcgcgg	ccgctaaatt	2340
caattcgccc	tatagtgagt	cgtattacaa	ttcactggcc	gtcgttttac	aacgtcgtga	2400
ctgggaaaac	cctggcglla	cccaacttaa	tcgccttgca	gcacatcccc	ctttcgccag	2460
ctggcgtaat	agcgaagagg	cccgacccga	tcgccttcc	caacagttgc	gcagcctata	2520
cgtacggcag	tttaaggttt	acacctataa	aagagagagc	cgttatcgtc	tgtttgtgga	2580
tgtacagagt	gatattattg	acacgccggg	gcgacggatg	gtgatcccc	tggccagtgc	2640
acgtctgctg	tcagataaag	tctcccgtga	actttaccgg	gtgggtgcata	tcggggatga	2700
aagctggcgc	atgatgacca	ccgatatggc	cagtgtgccg	gtctccgtta	tcggggaaga	2760
agtggtgat	ctcagccacc	gcgaaaatga	catcaaaaac	gccattaacc	tgatgttctg	2820

gggaatataa atgtcaggca tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tccttttcac	2880
gtagaaagcc agtccgcaga aacggtgctg accccggatg aatgtcagct actgggctat	2940
ctggacaagg gaaaacgcaa gcgcaaagag aaagcaggta gcttgcaagt ggcttacatg	3000
gcgatagcta gactgggocg ttttatggac agcaagcgaa ccggaattgc cagctggggc	3060
gccctctggt aaggttggga agccctgcaa agtaactgg atggctttct cgccgccaag	3120
gatctgatgg cgcaggggat caagctctga tcaagagaca ggatgaggat cgtttcgcat	3180
gattgaacaa gatggattgc acgcaggttc tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg	3240
ctatgactgg gcacaacaga caatcggctg ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc	3300
gcaggggocg ccggttcttt ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgccctga atgaactgca	3360
agacgaggca gcgcggctat cgtggctggc cacgacgggc gttccttgcg cagctgtgct	3420
cgacgttgtc actgaagcgg gaagggactg gctgctattg ggcgaagtgc cggggcagga	3480
tctcctgtca tctcaccttg ctctgcgga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg	3540
gcgctgcat acgcttgatc cggctacctg cccattcgac caccaagcga aacatcgcat	3600
cgagcgagca cgtactcgga tggaaagccg tcttgctgat caggatgatc tggacgaaga	3660
gcatcagggg ctgcgcccag ccgaactggt cgccaggctc aaggcgagca tgcccgacgg	3720
cgaggatctc gtcgtgacct atggcgatgc ctgcttgccg aatatcatgg tggaaaatgg	3780
ccgcttttct ggattcatcg actgtggccg gctgggtgtg gccgaccgct atcaggacat	3840
agcgttggt acccgtgata ttgctgaaga gcttggcggc gaatgggctg accgcttct	3900
cgtgctttac ggtatcgccg ctcccgatc gcagcgcac gccttctatc gccttcttga	3960
cgagttcttc tgaattatta acgcttaca tttcctgatg cggtatcttc tccttacgca	4020
tctgtgcggt atttcacacc gcatacaggt ggcacttttc ggggaaatgt gcgcggaacc	4080
cctatttggt tatttttcta aatacattca aatatgtatc cgctcatgag acaataacc	4140
tgataaatgc ttcaataata ttgaaaaagg aagagtatga gtattcaaca tttccgtgtc	4200
gcccttattc ccttttttgc ggcattttgc cttcctgttt ttgctcacc agaaacgctg	4260
gtgaaagtaa aagatgctga agatcagttg ggtgcacgag tgggttacat cgaactggat	4320
ctcaacagcg gtaagatcct tgagagtttt cgccccgaag aacgttttcc aatgatgagc	4380
acttttaaag ttctgctatg tggcgcggta ttatcccgta ttgacgccgg gcaagagcaa	4440
ctcggtcgcc gcatacacta ttctcagaat gacttgggtg agtactcacc agtcacagaa	4500
aagcatctta cggatggcat gacagtaaga gaattatgca gtgctgcat aaccatgagt	4560

gataaactg cggccaactt acttctgaca acgatcggag gaccgaagga gctaaccgct 4620
tttttgcaca acatggggga tcatgtaact cgccttgatc gttgggaacc ggagctgaat 4680
gaagccatac caaacgacga gcgtgacacc acgatgcctg tagcaatggc aacaacgttg 4740
cgcaaactat taactggcga actacttact cttagcttccc ggcaacaatt aatagactgg 4800
atggaggcgg ataaagttgc aggaccactt ctgcgctcgg cccttccggc tggctggttt 4860
attgctgata aatctggagc cggtgagcgt gggctcgcg gtatcattgc agcactgggg 4920
ccagatggta agccctcccg tatcgtagtt atctacacga cggggagtca ggcaactatg 4980
gatgaacgaa atagacagat cgctgagata ggtgcctcac tgattaagca ttggtaactg 5040
tcagaccaag tttactcata tatactttag attgatttaa aacttcattt ttaatttaa 5100
aggatctagg tgaagatcct ttttgataat ctcatgacca aaatccctta acgtgagttt 5160
tcgttccact gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag gatcttcttg agatcctttt 5220
tttctgcgcg taatctgctg cttgcaaaca aaaaaaccac cgctaccagc ggtggtttgt 5280
ttgccggatc aagagctacc aactcttttt ccgaaggtaa ctggcttcag cagagcgcag 5340
ataccaaata ctgtccttct agtgtagccg tagttaggcc accacttcaa gaactctgta 5400
gcaccgcta catacctcgc tctgctaate ctgttaccag tggctgctgc cagtggcgat 5460
aagtcgtgtc ttaccggggt ggactcaaga cgatagttac cggataaggc gcagcggtcg 5520
ggctgaacgg ggggttcgtg cacacagccc agcttgagc gaacgaccta caccgaactg 5580
agatacctac agcgtgagct atgagaaagc gccacgcttc ccgaaggag aaaggcggac 5640
aggatccgg taagcggcag ggtcggaaaca ggagagcga cgagggagct tccaggggga 5700
aacgcctggt atctttatag tctgtcggg tttcgccacc tctgacttga gcgtcgattt 5760
ttgtgatgct cgtcaggggg gcggagccta tggaaaaacg ccagcaacgc ggccctttta 5820
cggttcctgg gcttttgctg gccttttgct cacat 5855

<210> 147

<211> 2235

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> pgM104-354C899

<220>

<221> Intrón

10 <222> (681)..(764)

<223>

<220>

<221> Intrón

<222> (1667)..(1845)

<223>

5 <220>

<221> Intrón

<222> (1101)..(1345)

<223>

<400> 147

caggtgcagc	tggtgcagtc	tggggctgag	gtgaggaagc	ctggggcctc	agtgaaggtt	60
tcttgcaagg	catctggata	caccttcacc	cactattata	tgcaactggg	gcgacaggcc	120
cctggacaag	ggcttgagtg	gatgggaata	atcaacccta	gtggtggtag	cacaacctac	180
gcacagaagc	tccagggcag	agtcacatg	accagggaca	cgtccacgag	cacagtctac	240
atggagctga	gcagcctgag	atctgaggac	acggccgtgt	attactgtgc	gagagattgg	300
ggctccaatt	acgtttgggg	gagttatccc	aagtactggg	gccagggcac	cctggtgacc	360
gtctccagcg	ctagcgcccc	aacccttttc	cccctegtct	cctgtgagaa	ttccccgtcg	420
gatacgagca	gcgtggccgt	tggctgectc	gcacaggact	tccttcccga	ctccatcaact	480
ttctctgga	aatacaagaa	caactctgac	atcagcagca	cccggggcct	cccatcagtc	540
ctgagagggg	gcaagtacgc	agccacctca	caggtgctgc	tgccctccaa	ggacgtcatg	600
cagggcacag	acgaacacgt	ggtgtgcaaa	gtccagcacc	ccaacggcaa	caaagaaaag	660

10

ES 2 365 749 T3

aacgtgecte ttccaggtga gggccgggcc cagccaccgg gacagagagg gagccgaagg 720
 gggcgggagt ggcgggcacc gggctgacac gtgtccctca ctgcagtgat tgctgagctg 780
 cctcccaaag tgagcgtctt cgteccacce cgcgacggct tcttcggcaa cccccgcaag 840
 tccaagctca tctgccaggc cacgggtttc agtccccggc agattcaggt gtcctggctg 900
 cgcgagggga agcaggtggg gtctggcgtc accacggacc aggtgcaggc tgaggccaaa 960
 gagtctgggc ccacgacctt caaggtgacc agcacactga ccatcaaaga gaqcgactgg 1020
 ctcagccaga gcatgttccac ctgcegeggtg gatcacaggg gcctgacctt ccagcagaat 1080
 gcgtcctcca tgttgttccc cggtagtgta cctgtcccca ggggcagcac ccaccgacac 1140
 acaggggtcc actcgggtct ggcattcgcc accccggatg cagccatcta ctccctgagc 1200
 cttggcttcc cagagcggcc aagggcaggg gctcggggcg caggaccctt gggctcggca 1260
 gaggcagttg ctactctttg ggtgggaacc atgcctccgc ccacatccac acctgccccca 1320
 cctctgactc ctttctcttg actccagatc aagacacagc catccgggtc ttcgccatcc 1380
 ccccatcctt tgccagcatc ttcctcacca agtccaccaa gttgacctgc ctggtcacag 1440
 acctgaccac ctatgacagc gtgaccatct cctggaccgg ccagaatggc gaagctgtga 1500
 aaaccacac caacatctcc gagagccacc ccaatgccac tttcagcggc gtgggtgagg 1560
 ccagcatctg cgaggatgac tggaattccg gggagagggt cacgtgcacc gtgaccacaca 1620
 cagacctgcc ctgccactg aagcagacca tctcccggcc caagggtagg cccactctt 1680
 gccctcttcc ctgcactccc tgggacctcc cttggcctct ggggatgggt ggaaagcacc 1740
 cctcactccc ccgttgtctg ggcaactggg gaaaagggga ctcaacccca gccacagggc 1800
 tggteccccc actgccccgc cctcaccacc atctctgttc acaggggtgg cctgacacag 1860
 gcccgatgtc tacttgctgc caccagcccg ggagcagctg aacctgcggg agtcggccac 1920
 catcaagtgc ctggtgacgg gcttctctcc cgcggacgtc ttcgtgcagt ggalgcagag 1980
 ggggcagccc ttgtccccgg agaagtatgt gaccagcggc ccaatgcctg agccccaggg 2040
 cccaggccgg tacttcgccc acagcatcct gaccgtgtcc gaagaggaat ggaacacggg 2100
 ggagacctac acctgcggtg tggcccatga ggcctgccc aacagggta ccgagaggac 2160
 cgtggacaag tccaccggta aaccaccct gtacaacgtg tccctggta tgtccgacac 2220
 agctggcacc tgcta 2235

<210> 148

<211> 576

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

Phe Pro Ser Val Leu Arg Gly Gly Lys Tyr Ala Ala Thr Ser Gln Val
 180 185 190

Leu Leu Pro Ser Lys Asp Val Met Gln Gly Thr Asp Glu His Val Val
 195 200 205

Cys Lys Val Gln His Pro Asn Gly Asn Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu
 210 215 220

Pro Gly Glu Val Ile Ala Glu Leu Pro Pro Lys Val Ser Val Phe Val
 225 230 235 240

Pro Pro Arg Asp Gly Phe Phe Gly Asn Pro Arg Lys Ser Lys Leu Ile
 245 250 255

Cys Gln Ala Thr Gly Phe Ser Pro Arg Gln Ile Gln Val Ser Trp Leu
 260 265 270

Arg Glu Gly Lys Gln Val Gly Ser Gly Val Thr Thr Asp Gln Val Gln
 275 280 285

Ala Glu Ala Lys Glu Ser Gly Pro Thr Thr Tyr Lys Val Thr Ser Thr
 290 295 300

Leu Thr Ile Lys Glu Ser Asp Trp Leu Ser Gln Ser Met Phe Thr Cys
 305 310 315 320

Arg Val Asp His Arg Gly Leu Thr Phe Gln Gln Asn Ala Ser Ser Met
 325 330 335

Cys Val Pro Asp Gln Asp Thr Ala Ile Arg Val Phe Ala Ile Pro Pro
 340 345 350

Ser Phe Ala Ser Ile Phe Leu Thr Lys Ser Thr Lys Leu Thr Cys Leu
 355 360 365

Val Thr Asp Leu Thr Thr Tyr Asp Ser Val Thr Ile Ser Trp Thr Arg
 370 375 380

Gln Asn Gly Glu Ala Val Lys Thr His Thr Asn Ile Ser Glu Ser His
 385 390 395 400

Pro Asn Ala Thr Phe Ser Ala Val Gly Glu Ala Ser Ile Cys Glu Asp
 405 410 415

Asp Trp Asn Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr Val Thr His Thr Asp
 420 425 430

Leu Pro Ser Pro Leu Lys Gln Thr Ile Ser Arg Pro Lys Gly Val Ala
 435 440 445

Leu His Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro Ala Arg Glu Gln Leu
 450 455 460

Asn Leu Arg Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu Val Thr Gly Phe Ser
 465 470 475 480

Pro Ala Asp Val Phe Val Gln Trp Met Gln Arg Gly Gln Pro Leu Ser
 485 490 495

Pro Glu Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met Pro Glu Pro Gln Ala Pro
 500 505 510

Gly Arg Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu Thr Val Ser Glu Glu Glu Trp
 515 520 525

Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val Ala His Glu Ala Leu Pro
 530 535 540

Asn Arg Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser Thr Gly Lys Pro Thr
 545 550 555 560

Leu Tyr Asn Val Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala Gly Thr Cys Tyr
 565 570 575

<210> 149

<211> 60

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido líder, cadena pesada

<220>

<221> CDS

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido líder, cadena ligera kappa

5 <400> 152

Met Arg Leu Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15

Ala Ser Thr

<210> 153

<211> 60

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido líder, cadena ligera lambda

<220>

<221> CDS

15 <222> (1)..(60)

<223>

<400> 153

atg cgg ttc tcc gct cag ctg ctg ggc ctt ctg gtg ctg tgg att ccc 48
 Met Arg Phe Ser Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Val Leu Trp Ile Pro
 1 5 10 15

ggc gtc tcg acg 60
 Gly Val Ser Thr
 20

<210> 154

20 <211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido líder, cadena ligera lambda

25 <400> 154

Met Arg Phe Ser Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Val Leu Trp Ile Pro
 1 5 10 15

Gly Val Ser Thr
 20

	<210> 155	
	<211> 54	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Péptido líder, cadena pesada	
	<400> 155	
	atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtactgctgc tggcccagcc ggcc	54
	<210> 156	
10	<211> 56	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Péptido líder, cadena ligera kappa	
15	<400> 156	
	atgcggtctgc ccgcccagct gctgggcctt ctcatgctgt ggggccccgc ctcgag	56
	<210> 157	
	<211> 59	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Péptido líder, cadena ligera lambda	
	<400> 157	
	atgcggttct ccgctcagct gctgggcctt ctggtgctgt ggattccccg cgtctcgag	59
25	<210> 158	
	<211> 13	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Sitio Sfil	
	<400> 158	
	ggcccagccg gcc	13
	<210> 159	
	<211> 5	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	

	<223> Sitio Xhol/Sall combinado	
	<400> 159	
	Tcgac	5
	<210> 160	
5	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador directo	
10	<400> 160	
	atgaaggatga cagcgtgagg tgac	24
	<210> 161	
	<211> 24	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador inverso	
	<400> 161	
	acatggatag acgcaggaca gcag	24
20	<210> 162	
	<211> 68	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Cebador directo	
	<400> 162	
	aagcttagca tggaacaaaa acttatttct gaagaagatc tgctggcaac acggcggctg	60
	ctcggctg	68
	<210> 163	
	<211> 27	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador inverso	
	<400> 163	
35	gatataccttt attgtccagc attccac	27

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo monoclonal capaz de unirse a una proteína de la célula huésped y que tiene actividad neutralizante de flavivirus, comprendiendo dicho anticuerpo una cadena pesada y una ligera, en el que dicha cadena pesada comprende una región CDR1 según SEQ ID NO:7, una región CDR2 según SEQ ID NO:8 y una región CDR3 según SEQ ID NO:5; y en el que dicha cadena ligera comprende una región CDR1 según SEQ ID NO:9, una región CDR2 según SEQ ID NO:10 y una región CDR3 según SEQ ID NO:11, y en el que dicha proteína de la célula huésped es factor 1 asociado a Fas.
2. Anticuerpo monoclonal capaz de unirse a una proteína de la célula huésped y que tiene actividad neutralizante de flavivirus, comprendiendo dicho anticuerpo una cadena pesada y una ligera, en el que dicha cadena pesada comprende una región CDR1 según SEQ ID NO:12, una región CDR2 según SEQ ID NO:13 y una región CDR3 según SEQ ID NO:6; y en el que dicha cadena ligera comprende una región CDR1 según SEQ ID NO:14, una región CDR2 según SEQ ID NO:15 y una región CDR3 según SEQ ID NO:16, o una secuencia según SEQ ID NO:74, y en el que dicha proteína de la célula huésped es NADH-deshidrogenasa flavoproteína-1.
3. Inmunoconjugado que comprende un anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1 ó 2, comprendiendo además el inmunoconjugado al menos una etiqueta.
4. Molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1 ó 2.
5. Composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1 ó 2 y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.
6. Anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1 ó 2 para uso como medicamento.
7. Uso de un anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1 ó 2 en la preparación de un medicamento para la profilaxis y/o el tratamiento de una infección por flavivirus.
8. Uso según la reivindicación 7, en el que dicho flavivirus es un virus del Nilo occidental.
9. Uso de un anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1 ó 2 para el diagnóstico *in vitro*.

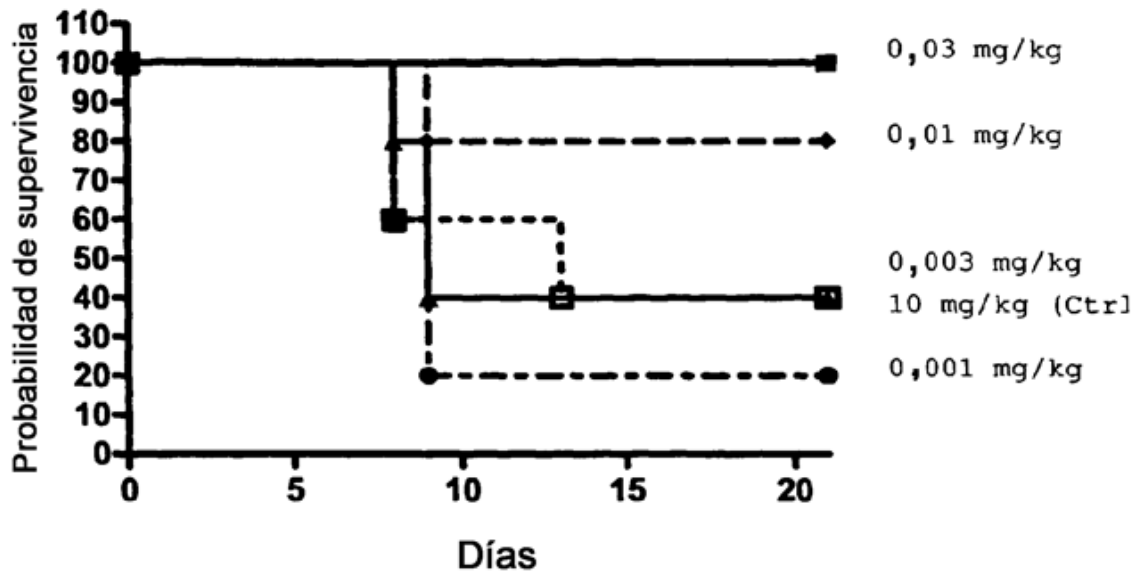


FIGURA 1

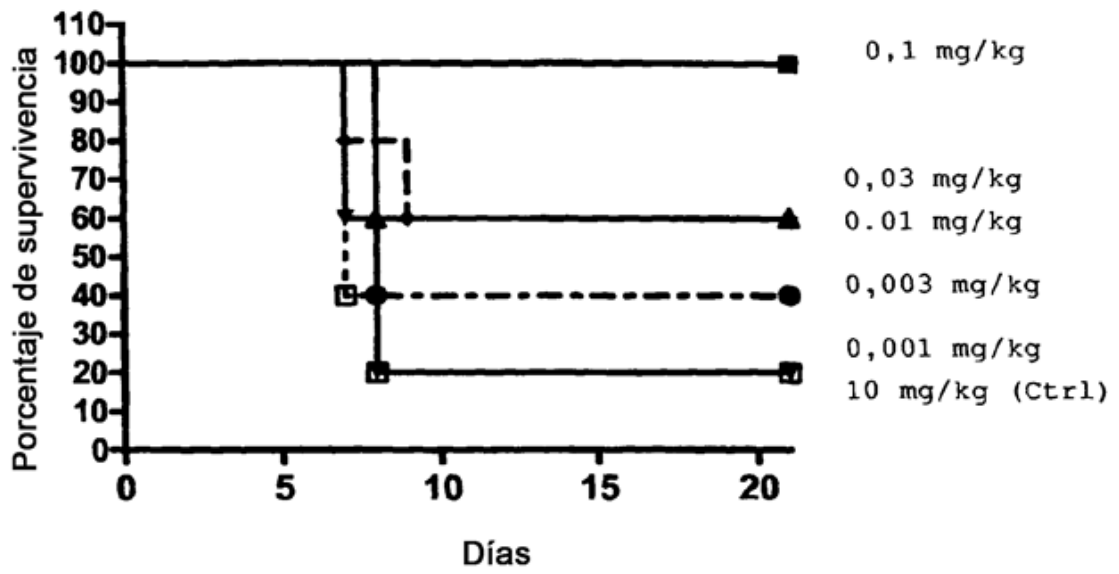


FIGURA 2

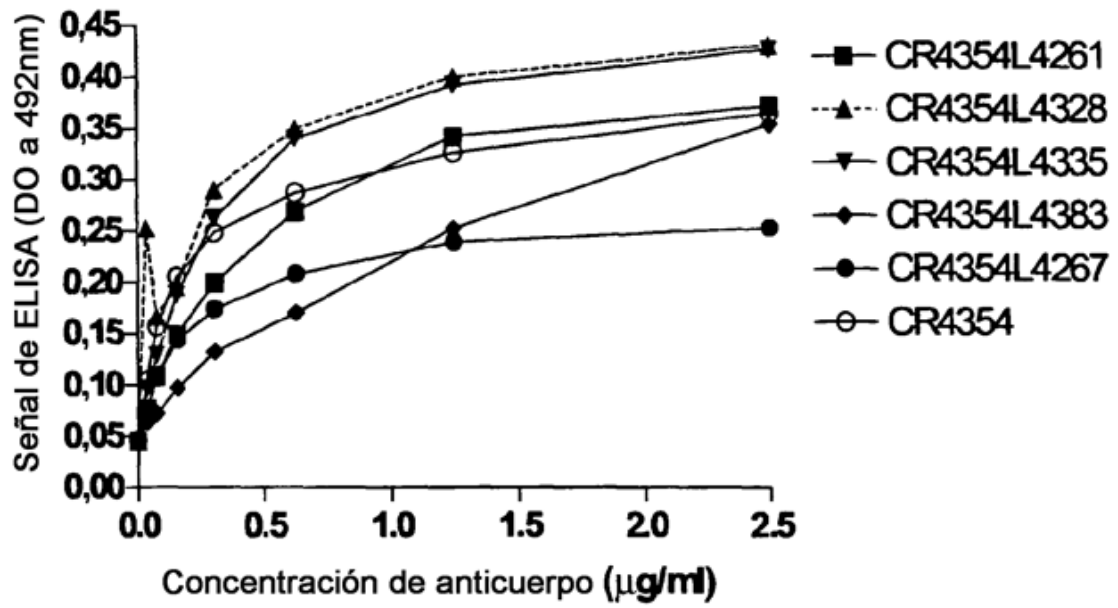


FIGURA 3

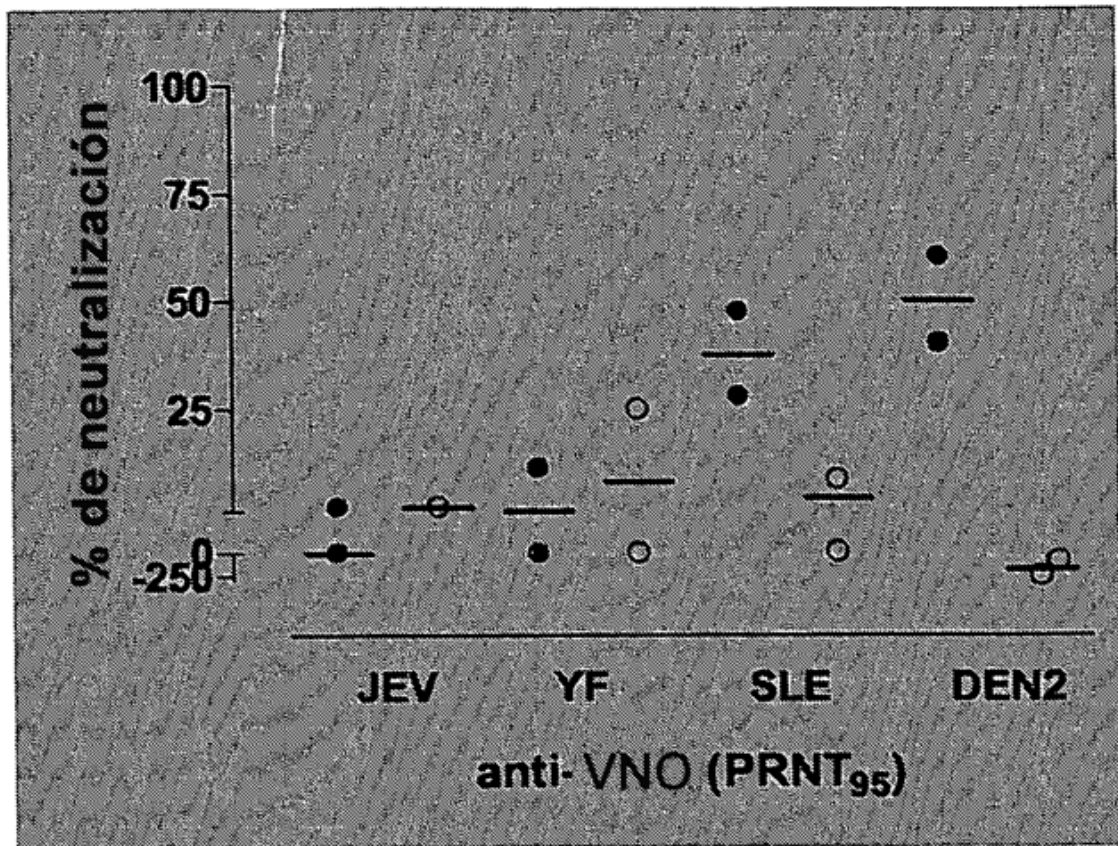


FIGURA 4

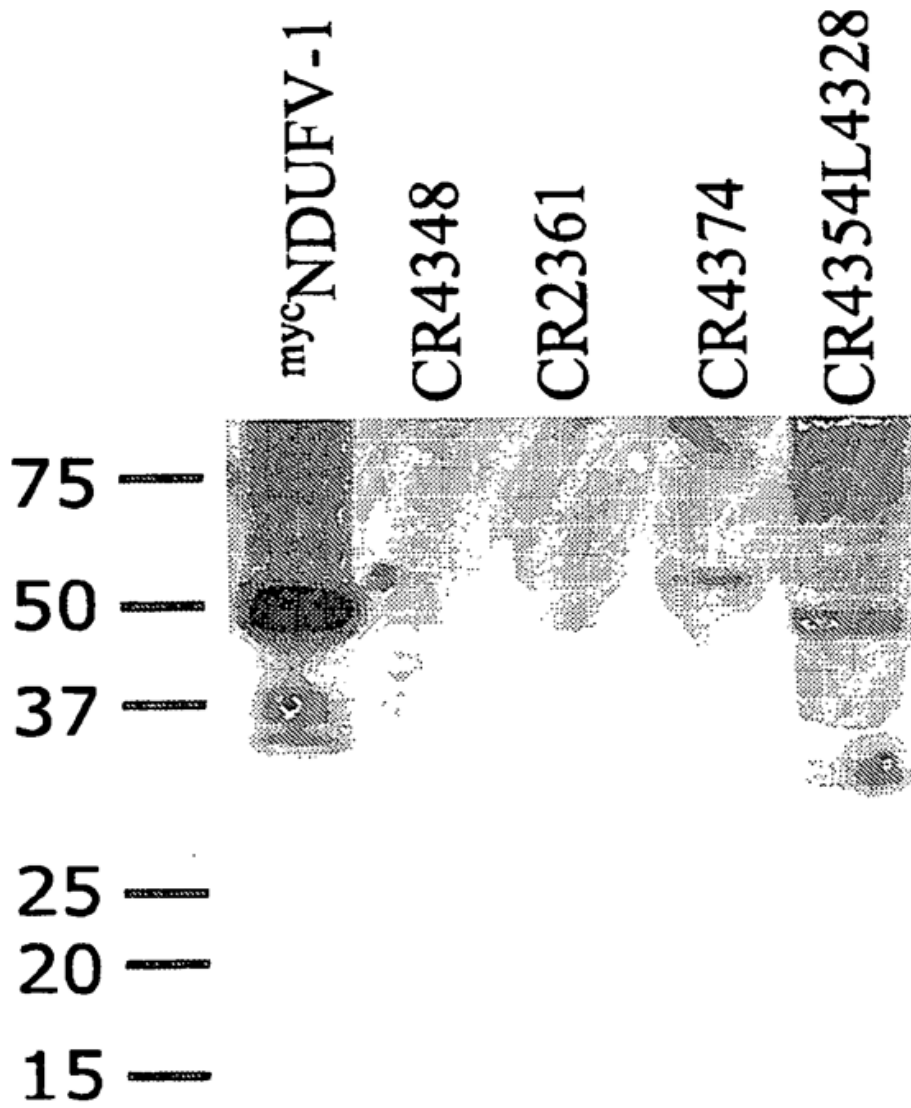


FIGURA 5