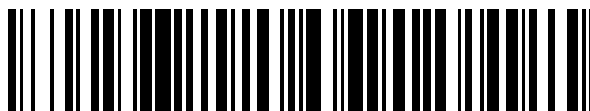


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 456 961**

51 Int. Cl.:

C07K 16/10 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.02.2008 E 08725537 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2014 EP 2125889**

54 Título: **Anticuerpos humanos contra el virus de la hepatitis C (VHC), usos de los mismos**

30 Prioridad:

21.02.2007 US 902432 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

24.04.2014

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS (100.0%)
225 FRANKLIN STREET, 12TH FLOOR
BOSTON, MA 02110, US**

72 Inventor/es:

**BROERING, TERESA;
SLOAN, SUSAN;
BABCOCK, GREGORY J.;
AMBROSINO, DONNA y
THOMAS, WILLIAM D., JR.**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 456 961 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos humanos contra el virus de la hepatitis C (VHC), usos de los mismos

5 **Antecedentes de la invención**

El virus de la hepatitis C (VHC), denominada originariamente "hepatitis no A, no B" (HNANB), es un virus de ARN monocatenario, positivo de la familia *Flaviviridae*. Su genoma contiene un único marco de lectura abierto largo que codifica para una poliproteína de aproximadamente tres mil residuos de aminoácido. (Choo *et al.* (1989) Science 244:359-362). La poliproteína se procesa por proteasas virales y de la célula huésped para dar tres proteínas estructurales principales y varias proteínas no estructurales necesarias para la replicación viral. La secuencia de nucleótidos de VHC es sumamente variable, compartiendo los aislados más divergentes sólo el 60% de homología de secuencia de nucleótidos. Se han identificado varios genotipos de VHC diferentes con secuencias genómicas ligeramente diferentes.

Los aislados de todo el mundo se han agrupado ahora en 6 tipos principales, cada uno con varios subtipos, basándose en datos de secuencia (Simmonds *et al.* (1995) Hepatology 21: 570-83). Los tipos 1-3 representan casi todas las infecciones en Europa, el tipo 4 es prevalente en Egipto y Zaire, el tipo 5 en Sudáfrica y el tipo 6 en Hong Kong.

El virus se transmite principalmente por la sangre y los hemoderivados. La mayoría de los individuos afectados o bien han recibido transfusiones sanguíneas antes de 1990 (cuando se implementó el examen de las reservas de sangre para detectar VHC) o bien han consumido drogas intravenosas. Aproximadamente de 200 a 400 millones de personas en todo el mundo están infectados de forma crónica con VHC, aproximadamente de 2 a 5 millones de estas personas están en los Estados Unidos. La infección crónica de VHC, que afecta a aproximadamente el 80% de las personas infectadas, dura toda la vida y conduce a menudo al desarrollo de cirrosis y cáncer de hígado.

El desarrollo de vacunas contra VHC se ha ralentizado por la extrema variabilidad antigénica del virus. Incluso cuando estén disponibles, las vacunas no aliviarán los problemas a los que se enfrentan millones de portadores crónicos de VHC en todo el mundo.

La mayor parte de los anticuerpos frente a VHC no desempeñan un papel importante en la eliminación de la infección, aunque existen anticuerpos neutralizantes. Sin embargo, éstos tienden a ser específicos de la cepa y son ineficaces frente a cepas emergentes.

En la actualidad, la única terapia con alguna eficacia demostrada contra una enfermedad hepática inducida por VHC implica el uso de alfa-IFN, pero este enfoque sólo ha logrado un éxito limitado. Incluso en los mejores ensayos clínicos con tratamiento con alfa-IFN se notifica sólo el 40-50% de pacientes crónicos que responden y el 50% de estos individuos recaen cuando se detiene el tratamiento. También existen pruebas de que el tratamiento con alfa-IFN es mucho menos eficaz contra algunos genotipos de VHC que otros.

Actualmente, no se han desarrollado aún fármacos convencionales contra una infección por VHC (distintos de alfa-IFN). Por consiguiente, se necesitan inmunoterapias mejoradas para tratar y prevenir una infección por VHC.

45 **Sumario de la invención**

La presente invención resuelve los problemas anteriores proporcionando un anticuerpo monoclonal anti-VHC humano que se une específicamente a una amplia variedad de aislados de VHC e inhibe la capacidad del virus para infectar células.

En una realización, esto se demuestra mediante la capacidad de los anticuerpos para neutralizar (es decir, inhibir o bloquear) VHC *in vitro* (por ejemplo, en un ensayo de neutralización de pseudovirus VHC). En otra realización, esto se demuestra mediante la capacidad de los anticuerpos para inhibir la infectividad de VHC *in vivo* en un sujeto, tal como un animal o un ser humano.

Pueden prepararse eficazmente anticuerpos monoclonales humanos de la invención, en cantidades prácticamente ilimitadas, en forma sumamente purificada. Por consiguiente, los anticuerpos son adecuados para el pronóstico, diagnóstico y/o tratamiento de un individuo expuesto o sospechoso de haber estado expuesto a VHC. Los anticuerpos pueden producirse usando una variedad de técnicas para preparar anticuerpos humanos conocidos en la técnica. Por ejemplo, tal como se ejemplifica en el presente documento, los anticuerpos pueden generarse en animales transgénicos que expresan segmentos génicos de inmunoglobulina humana, por ejemplo, ratones transgénicos que comprenden un locus de Ig humana. Además, los anticuerpos pueden administrarse solos o en combinación, por ejemplo, con una vacuna anti-VHC u otros anticuerpos, para aumentar las tasas de supervivencia de los sujetos (por ejemplo, animales y seres humanos) infectados con VHC.

Por consiguiente, la invención proporciona varias ventajas que incluyen, pero no se limitan a, las siguientes:

- un anticuerpo anti-VHC recombinante totalmente humano para el pronóstico, diagnóstico y/o tratamiento de VHC en un sujeto, por ejemplo, protegerlo frente a o inhibir la morbilidad o mortalidad mediada por VHC en un sujeto;

- 5 - una composición (por ejemplo, farmacéutica) y/o un kit que comprende uno o más anticuerpos anti-VHC recombinantes totalmente humanos que pueden usarse solos o en combinación con vacunas disponibles comercialmente para tratar una infección por VHC.

10 Los anticuerpos monoclonales humanos o partes de unión a antígeno de los mismos de la invención se unen específicamente a un epítipo no conformacional de la proteína E2 de VHC. Anticuerpos particulares o partes de unión a antígeno de los mismos se unen específicamente a un epítipo dentro de la proteína E2 de VHC. Preferiblemente, el epítipo de la proteína E2 de VHC comprende los residuos de aminoácido 412-423. En otra realización, el epítipo de la proteína E2 de VHC consiste en los residuos de aminoácido 412-423. En una realización, la proteína E2 de VHC comprende los residuos de aminoácido 413, 418 y/o 420.

15 Los anticuerpos monoclonales humanos o partes de unión a antígeno de los mismos pueden caracterizarse como que se unen específicamente a una proteína E2 de VHC con una K_D de menos de aproximadamente 10×10^{-9} M, o una K_D incluso más favorable.

20 La invención proporciona un anticuerpo monoclonal humano aislado, o parte de unión a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, comprende:

(a) regiones variables de cadena pesada y ligera que comprenden SEQ ID NO:1 y 2; o

25 (b) una secuencia de región variable de cadena ligera CDR3 que comprende SEQ ID NO:9, una secuencia de región variable de cadena ligera CDR3 que comprende SEQ ID NO:18, una secuencia de región variable de cadena pesada CDR2 que comprende SEQ ID NO:8, una secuencia de región variable de cadena ligera CDR2 que comprende SEQ ID NO:17, una secuencia de región variable de cadena pesada CDR1 que comprende SEQ ID NO:7 y una secuencia de región variable de cadena ligera CDR1 que comprende SEQ ID NO:16.

30 También se dan a conocer anticuerpos o partes de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a un epítipo que se solapa con un epítipo unido por un anticuerpo producido por el clon 83-128, 95-2 ó 073-1 y/o compete por la unión a un VHC, o parte del mismo con un anticuerpo producido por el clon 83-128, 95-2 ó 073-1.

35 Los anticuerpos monoclonales humanos de la presente invención incluyen anticuerpos de cadena completa, por ejemplo, que incluyen un dominio efector, (por ejemplo, un dominio Fc), así como partes de anticuerpo o fragmentos, tales como anticuerpos de cadena sencilla y fragmentos Fab. Los anticuerpos también pueden unirse a una variedad de agentes terapéuticos (por ejemplo, agentes antivirales o toxinas) y/o un marcador.

40 En otro aspecto, la invención presenta polipéptidos aislados que incluyen una parte de unión a antígeno del anticuerpo de la invención.

45 La invención también proporciona un ácido nucleico aislado que codifica para una región variable de un anticuerpo que se une a VHC, comprendiendo dicho ácido nucleico SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 26. La invención también presenta vectores de expresión que incluyen el ácido nucleico anterior así como células huésped que comprenden tales vectores de expresión.

50 Las células huésped adecuadas para expresar anticuerpos de la invención incluyen una variedad de células eucariotas, por ejemplo, células de levadura, células de mamífero, por ejemplo, células de ovario de hámster chino (CHO), células NSO, células de mieloma o células vegetales.

En otro aspecto, la invención presenta composiciones y kits que incluyen uno o más anticuerpos monoclonales humanos aislados de la invención o partes de unión a antígeno de los mismos.

55 Por ejemplo, la invención proporciona una composición que comprende el anticuerpo o parte de unión a antígeno de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

60 La invención también proporciona un kit que comprende uno o más anticuerpos monoclonales aislados, o partes de unión a antígeno de los mismos, de la invención, e instrucciones para su uso en el tratamiento de una enfermedad mediada por VHC.

La invención también proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o parte de unión a antígeno del mismo, de la invención para su uso en un método de tratamiento de una infección por VHC en un sujeto, preferiblemente un sujeto humano.

65 La invención también proporciona una composición para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad o

un trastorno mediado por VHC en un mamífero, en el que dicha composición comprende el anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, de la invención, en un portador farmacéuticamente aceptable. La composición puede comprender además un segundo anticuerpo que se une a VHC.

5 La invención también proporciona un método de detección de una infección por VHC en un mamífero que comprende poner en contacto un líquido corporal obtenido de un mamífero con un anticuerpo de cualquiera de la invención, o parte de unión a antígeno del mismo, y determinar si se produce unión, siendo dicha unión indicativa de la presencia de una infección por VHC.

10 Los anticuerpos monoclonales humanos o partes de los mismos (y composiciones que comprenden los anticuerpos o partes de los mismos) de la invención pueden administrarse en una variedad de modos adecuados, por ejemplo, por vía intravenosa (i.v.), por vía subcutánea (s.c.), o, por vía intramuscular (i.m.) al sujeto. El anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo pueden administrarse solos o en combinación con otro agente terapéutico, por ejemplo, un segundo anticuerpo monoclonal humano o parte de unión a antígeno del mismo. En un ejemplo, el segundo anticuerpo monoclonal humano o parte de unión a antígeno del mismo se une específicamente a un segundo aislado de VHC que difiere del aislado unido al primer anticuerpo. En otro ejemplo, el anticuerpo se administra junto con otro agente, por ejemplo, un agente antiviral. En otro ejemplo, el anticuerpo se administra junto con una gamma-globulina policlonal (por ejemplo, gamma-globulina humana). En otro ejemplo, el anticuerpo se administra antes, después o de manera contemporánea con una vacuna contra VHC.

20 El tratamiento de seres humanos con anticuerpos monoclonales humanos ofrece varias ventajas. Por ejemplo, es probable que los anticuerpos sean menos inmunogénicos en seres humanos que anticuerpos no humanos. La terapia también es rápida porque puede producirse la inactivación de VHC tan pronto como el anticuerpo alcanza los sitios de infección y neutraliza directamente el VHC causante de enfermedad. Los anticuerpos humanos también se ubican en sitios apropiados en seres humanos más eficazmente que anticuerpos no humanos. Además, el tratamiento es específico para VHC, y es recombinante y sumamente purificado y, a diferencia de las terapias convencionales, evita la posibilidad de contaminarse con agentes adventicios.

30 También se dan a conocer métodos para preparar un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un VHC. El método puede implicar inmunizar un animal no humano transgénico que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera humana con una composición que incluye un virus VHC, por ejemplo, vivo o inactivado y aislar un anticuerpo, célula productora de anticuerpos, o anticuerpo que codifica para un ácido nucleico del animal. El VHC puede inactivarse, por ejemplo, mediante tratamiento químico y/o liofilización. El método puede incluir además evaluar la unión del anticuerpo al VHC o la proteína E2 de VHC.

40 También se dan a conocer métodos para preparar los anticuerpos o partes de unión a antígeno de los mismos mediante la expresión de ácidos nucleicos que codifican para anticuerpos humanos en una célula huésped (por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican para la parte de la región de unión a antígeno de un anticuerpo). También se da a conocer un hibridoma o transfectoma que incluye los ácidos nucleicos mencionados anteriormente.

45 También se da a conocer un método para preparar un hibridoma que expresa un anticuerpo que se une específicamente a un VHC inmunizando un animal no humano transgénico que tiene un genoma que incluye un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera humana, con una composición que incluye el VHC o la proteína E2 de VHC; aislando los esplenocitos del animal; generando hibridomas a partir de los esplenocitos; y seleccionando un hibridoma que produce un anticuerpo que se une específicamente a VHC o la proteína E2 de VHC del mismo.

50 También se da a conocer un antígeno que comprende un epítipo no conformacional de la proteína E2 de VHC, aminoácidos 412-464, 412-423 o 413-420. El antígeno puede usarse para producir, examinar o detectar la presencia de un anticuerpo anti-E2 de VHC o puede usarse como agente en inmunoterapia activa, es decir como vacuna. Como vacuna, el antígeno puede usarse solo o en combinación con un adyuvante o hapteno apropiado, por ejemplo, mixto o conjugado o bien química o bien genéticamente. Los conjugados incluyen pero no se limitan a toxoides, partículas pseudovirales (VLP, *virus-like particles*) y portadores proteicos, todos los cuales están diseñados para potenciar la respuesta inmunitaria al antígeno de vacuna. El antígeno cuando se usa para inmunoterapia activa también puede usarse en combinación con inmunoterapia pasiva, por ejemplo, con cualquiera de los anticuerpos anti-E2 de VHC dados a conocer en el presente documento.

60 Otras características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, y a partir de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

65 Las figuras 1A y 1B son gráficas que muestran la unión del anticuerpo humano 95-2 (figura 1A) y el anticuerpo humano 83-128 (figura 1B) a VHC soluble, genotipo 1a E2-660 (triángulos) y VHC soluble, genotipo 1b E2-661 (cuadrados). Se recubrieron placas de ELISA con 2 µg/ml de antígeno y se examinaron con sonda con anticuerpo en

diluciones dobles. Se detectó el anticuerpo unido con anticuerpo secundario de cabra anti-ser humano conjugado a fosfatasa alcalina y sustrato PNPP.

Las figuras 2A y 2B son gráficas que muestran la neutralización de la infección de células Hep3B con diversos pseudovirus con genotipo de VHC en presencia de los anticuerpos humanos 95-2, 83-128 y 17C7 (Acm humanos irrelevantes). Se incubaron diluciones de cinco veces del anticuerpo con cada pseudovirus de VHC durante una hora a temperatura ambiente. Se añadió la mezcla de virus-anticuerpo a células Hep3B seguido por incubación a 37°C durante 72 horas. Se cuantificó la infección con ensayo de luciferasa Brightglo y se leyó en un lector de placas Victor3 para determinar la emisión de luz. Se usó anticuerpo humano contra la rabia (17C7) como control negativo.

Las figuras 3A y 3B son inmunotransferencias de tipo Western que muestran la unión del anticuerpo a proteína E2 expresada en mamífero soluble, purificada (E2-661) de genotipo 1a y 1b de VHC sometida a SDS-PAGE reductora (figura 3A) o no reductora (figura 3B) seguido por transferencia a membrana de PVDF. Se realizaron las inmunotransferencias de tipo Western con los anticuerpos monoclonales anti-cola de his (his), 83-128 y 95-2 usando anticuerpo anti-IgG de ratón (his) o anti-IgG humana (95-2 y 83-128) conjugado a HRP con reactivo de detección quimioluminiscente mejorado. El genotipo de la E2 soluble se indica sobre las transferencias. El anticuerpo primario usado para la detección se enumera debajo de las transferencias. Los marcadores de peso molecular en kilodaltons se enumeran a la izquierda de cada conjunto de transferencias.

La figura 4 es una tabla que muestra la afinidad de los anticuerpos humanos 95-2 y 83-128 frente al epítipo 412-433 de E2 de VHC expresado como proteína de fusión bacteriana. El anticuerpo de cabra anti-Fc de IgG humana se acopló mediante amida al chip de Biacore. Los anticuerpos humanos 95-2 y 83-128 se capturaron por separado sobre el chip y se hizo fluir la proteína expresada en bacterias E2-G que contenía los aminoácidos 412-423 de E2 a concentraciones variables. Se usó el software BIAevaluation™ para ajustar las curvas y calcular las constantes de afinidad.

La figura 5 es un mapa de la poliproteína de VHC que muestra la ubicación de las proteínas expresadas en mamífero E1 y E2. La poliproteína E1 y E2 se indica en la parte superior mediante un largo recuadro blanco con los números de aminoácido indicados encima. Los dominios transmembrana (TM) se indican mediante recuadros de color gris claro y el dominio hipervariable 1 (HVR1) de E2 se indica mediante un recuadro de color gris oscuro. Las proteínas de mamífero expresadas a partir de constructos modificados mediante ingeniería genética se enumeran debajo como barras de color gris oscuro. Los sitios de escisión de peptidasa señal se indican mediante flechas. El nombre de cada proteína va seguido por los aminoácidos codificados entre paréntesis y los aminoácidos totales en la proteína expresada.

Las figuras 6A y 6B son gráficas que muestran los resultados del ELISA de captura de lectinas de truncamientos C-terminales expresados en mamífero de E2. Se recubrieron los sobrenadantes de cultivo celular que contenían truncamientos C-terminales expresados en mamífero de proteínas de fusión de E2 que contenían aminoácidos de E2 (indicados en la figura 7) sobre una placa de ELISA y se examinaron con sonda con diluciones dobles de los anticuerpos humanos 95-2 (figura 6A) y 83-128 (figura 6B) y anticuerpo de ratón anti-cola de seis histidinas (cola de his). Se detectaron los anticuerpos unidos con anticuerpo de cabra anti-ser humano (95-2 y 83-128) o de cabra anti-ratón (cola de his) conjugado a fosfatasa alcalina y sustrato PNPP.

La figura 7 es un mapa que muestra proteínas expresadas en bacterias que abarcan los 80 aminoácidos amino-terminales de E2. Los primeros 80 aminoácidos de la proteína E2 se representan en la parte superior mediante un recuadro blanco con los números de los aminoácidos encima. La región hipervariable 1 (HVR1) de 27 aminoácidos en el extremo amino-terminal se indica mediante un recuadro de color gris oscuro. Las proteínas expresadas a partir de constructos modificados mediante ingeniería genética se indican mediante barras de color gris claro con los nombres a la izquierda de la barra y los números de aminoácido para el inicio y el final de la proteína enumerados debajo de la barra.

Las figuras 8A, 8B y 8C son gráficas que muestran la unión de los anticuerpos humanos 95-2 (figura 8A) y 83-128 (figura 8B) y anticuerpo de ratón anti-cola de seis histidinas (cola de his) (figura 8C) a trozos expresados en bacterias de los primeros 80 aminoácidos de E2. Se recubrieron proteínas de fusión expresadas en bacterias que contenían aminoácidos de E2 (indicados en la figura 7) sobre una placa de ELISA y se examinaron con sonda con diluciones dobles de anticuerpo. Se detectaron los anticuerpos unidos con anticuerpo de cabra anti-ser humano (95-2 y 83-128) o de cabra anti-ratón (cola de his) conjugado a fosfatasa alcalina y sustrato PNPP.

Las figuras 9A, 9B y 9C son gráficas que muestran la unión de los anticuerpos humanos 95-2 (figura 9A) y 83-128 (figura 9B) y anticuerpo de ratón anti-cola de seis histidinas (cola de his) (figura 9C) a proteínas de fusión expresadas en bacterias que contenían los aminoácidos 412-423 de E2 con mutaciones. Se recubrieron proteínas de fusión expresadas en bacterias que contenían los aminoácidos 412-423 de E2 con los aminoácidos indicados mutados a una alanina o que no contenían mutaciones (WT) sobre una placa de ELISA y se examinaron con sonda con diluciones dobles de anticuerpo. Se detectaron los anticuerpos unidos con anticuerpo de cabra anti-ser humano (95-2 y 83-128) o de cabra anti-ratón (cola de his) conjugado a fosfatasa alcalina y sustrato PNPP.

La figura 10 es una tabla que muestra alineaciones de los aminoácidos 412-423 de E2 de la base de datos de VHC de Los Alamos soportada por NIH. Se enumera el código de aminoácido de una letra para la secuencia de genotipo 1a prototipo para los aminoácidos 412-423 en la parte superior izquierda del diagrama (1a). Se indica cualquier aminoácido que sea idéntico a la secuencia de 1a con un guión y se enumera el aminoácido para cualquier posición
 5 que sea diferente de la secuencia de genotipo 1a prototipo. Se enumera el número de veces que se encuentra esta secuencia de doce aminoácidos en la base de datos condensada bajo recuento y se enumera el porcentaje del total bajo porcentaje. Se enumeran las secuencias de las proteínas E2 solubles de genotipos 1a y 1b de la presente invención en las dos líneas superiores.

10 La figura 11 es una tabla que muestra los aminoácidos 412-423 de E2 de otros genotipos. Se enumera el código de aminoácido de una letra para los aminoácidos 412-423 para aislados que contenían cambios (con subrayado) de la secuencia de genotipo 1a prototipo. Se enumera el nombre de genotipo a la derecha seguido por el número de registro Genbank entre paréntesis.

15 Las figuras 12A, 12B y 12C son gráficas que muestran la unión de los anticuerpos humanos 95-2 (figura 12A) y 83-128 (figura 12B) y anticuerpo de ratón anti-cola de seis histidinas (cola de his) (figura 12C) a los aminoácidos 412-423 de E2 de otros genotipos. Se recubrieron proteínas de fusión expresadas en bacterias que contenían los aminoácidos 412-423 de E2 con la secuencia del genotipo indicado sobre una placa de ELISA y se examinaron con sonda con diluciones dobles de anticuerpo. Se detectaron los anticuerpos unidos con anticuerpo de cabra anti-ser
 20 humano (95-2 y 83-128) o de cabra anti-ratón (cola de his) conjugado a fosfatasa alcalina y sustrato PNPP.

La figura 13 representa la secuencia de 1a H77 con codones optimizados de E1/E2 (SEQ ID NO:27) que incluye extremos añadidos que contienen restricciones (representados como letras minúsculas en negrita), proyecciones
 25 adicionales para optimizar el corte por enzimas de restricción (representadas como letras en minúscula con subrayado), secuencia consenso Kozak (representada como letras en minúscula, en negrita y con subrayado) y codón de iniciación ATG (representado como letras en mayúscula, en negrita y con subrayado).

La figura 14 representa la alineación de la región variable de cadena pesada de anticuerpos derivados de los clones 83-128 (SEQ ID NO:1), 95-2 (SEQ ID NO:3), 95-14 (SEQ ID NO:32), 95-38 (SEQ ID NO:33), 95-25 (SEQ ID NO:34),
 30 95-42 (SEQ ID NO:35), 95-43 (SEQ ID NO:36), 95-49 (SEQ ID NO:37), 95-54 (SEQ ID NO:38), 95-58 (SEQ ID NO:39) y 95-62 (SEQ ID NO:40) y que son reactivos frente al epítipo 412-423 de la glicoproteína de VHC E2-660.

La figura 15 representa la alineación de la región variable de cadena ligera de anticuerpos derivados de los clones 83-128 (SEQ ID NO: 2), 073-1 (SEQ ID NO:6), 95-2 (SEQ ID NO:4), 95-14 (SEQ ID NO:44) y 95-38 (SEQ ID NO:53).
 35

Descripción detallada de la invención

Para que la presente invención pueda entenderse más fácilmente, se definen en primer lugar determinados
 40 términos. Se exponen definiciones adicionales en la totalidad de la descripción detallada.

DEFINICIONES

Los términos "virus de la hepatitis C", "VHC", "hepatitis no A, no B", o "HNANB" se usan de manera intercambiable
 45 en el presente documento, e incluyen cualquier "genotipo" o "subgenotipo" (también denominado "subtipo") del virión, o parte del mismo (por ejemplo, una parte de la proteína E2 de genotipo 1a de VHC), que está codificada por el ARN del virus de la hepatitis C o que se produce mediante variación alélica natural.

El VHC está organizado mediante una región no traducida en 5' que está seguido por un marco de lectura abierto (ORF, *open reading frame*) que codifica para aproximadamente 3.010 aminoácidos. El ORF discurre desde el par de bases de nucleótidos 342 hasta el 8.955 seguido por otra región no traducida en el extremo 3'. Los aminoácidos se subdividen en diez proteínas en el orden de 5' a 3' tal como sigue: C; E1; E2; NS1; NS2; NS3; NS4 (a y b); y NS5 (a y b). Estas proteínas se forman a partir de la escisión de la poliproteína más grande tanto por proteasas virales como del huésped. Las proteínas C, E1 y E2 son estructurales y las proteínas NS1-NS5 son proteínas no estructurales. La región C codifica para la proteína de la nucleocápside central. E1 y E2 son proteínas de la envuelta glicosiladas que recubren el virus. NS2 puede ser una metaloproteína de zinc. NS3 es una helicasa. NS4a funciona como cofactor de serina proteasa implicado en la escisión entre NS4b y NS5a. NS5a es una serina fosfoproteína cuya función es desconocida. La región NS5b tiene tanto ARN polimerasa dependiente de ARN como actividad transferasa terminal.
 55

Existen aproximadamente seis (6) genotipos distintos (por ejemplo, genotipos 1, 2, 3, 4, 5 y 6) que se clasifican por las variaciones en la proteína central y más de 80 subgenotipos que presentan además variación dentro de cada genotipo, algunos de los cuales incluyen: 1a; 1b; 1c; 2a; 2b; 2c; 3a; 3b; 4a; 4b; 4c; 4d; 4e; 5a; y 6a.
 60

El término "anticuerpo" tal como se hace referencia en el presente documento incluye anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión a antígeno (es decir, "parte de unión a antígeno del mismo") o cadena sencilla del mismo. Un "anticuerpo" se refiere a una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas mediante enlaces disulfuro, o una parte de unión a antígeno del mismo. Cada
 65

cadena pesada se compone de una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como V_H) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada se compone de tres dominios, C_H^1 , C_H^2 y C_H^3 . Cada cadena ligera se compone de una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento como V_L) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera se compone de un dominio, C_L . Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones de entramado (FR). Cada V_H y V_L se compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino-terminal hasta el extremo carboxi-terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar en la unión de la inmunoglobulina a factores o tejidos del huésped, incluyendo diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (Clq) del sistema del complemento clásico.

El término "parte de unión a antígeno del mismo" de un anticuerpo (o simplemente "parte de anticuerpo"), tal como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad para unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, VHC). Se ha mostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse por fragmentos de un anticuerpo de cadena completa. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro del término "parte de unión a antígeno del mismo" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L , V_H , C_L y C_H^1 ; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos mediante un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y C_H^1 ; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un único brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) Nature 341:544-546), que consiste en un dominio V_H ; y (vi) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada o (vii) una combinación de dos o más CDR aisladas que pueden estar unidas opcionalmente mediante un ligador sintético. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H , están codificados por genes independientes, pueden unirse, usando métodos recombinantes, mediante un ligador sintético que permite que se produzcan como una única cadena de proteína en la que las regiones V_L y V_H se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla Fv (scFv); véanse por ejemplo, Bird *et al.* (1988) Science 242:423-426; y Huston *et al.* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Tales anticuerpos de cadena sencilla también se pretende que estén abarcados dentro del término "parte de unión a antígeno del mismo" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y se examinan los fragmentos para determinar su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos. Pueden producirse partes de unión a antígeno mediante técnicas de ADN recombinante, o mediante escisión enzimática o química de inmunoglobulinas intactas.

Un "anticuerpo biespecífico" o "bifuncional" es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadena pesada/ligera diferentes y dos sitios de unión diferentes. Pueden producirse anticuerpos biespecíficos mediante una variedad de métodos incluyendo fusión de hibridomas o unión de fragmentos Fab'. Véanse, por ejemplo, Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321 (1990); Kostelny *et al.*, J. Immunol. 148, 1547-1553 (1992).

El término "anticuerpo monoclonal", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que presenta una única especificidad de unión y afinidad por un epítopo particular. Por consiguiente, el término "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a un anticuerpo que presenta una única especificidad de unión y que tiene regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En una realización, se producen anticuerpos monoclonales humanos por un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal no humano transgénico, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera fusionados a una célula inmortalizada.

El término "anticuerpo humano recombinante", tal como se usa en el presente documento, incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, se expresan, se crean o se aíslan mediante medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana o un hibridoma preparado a partir de los mismos, (b) anticuerpos aislados de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo, por ejemplo, desde un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpos humanos combinatoria, recombinante, y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados mediante cualquier otro medio que implique el corte y empalme de secuencias génicas de inmunoglobulina humana a otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En determinadas realizaciones, sin embargo, tales anticuerpos humanos recombinantes pueden someterse a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humana, mutagénesis somática *in vivo*) y por tanto las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivadas de y relacionadas con secuencias de V_H y V_L de línea germinal humana, pueden no existir de manera natural dentro del repertorio de línea germinal de anticuerpo humano *in vivo*.

El término "anticuerpo humano" incluye anticuerpos que tienen regiones variables y constantes (si están presentes) de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden

incluir residuos de aminoácido no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas mediante mutagénesis al azar o específica del sitio *in vitro* o mediante mutación somática *in vivo*) (véanse, Lonberg, N. *et al.* (1994) *Nature* 368(6474): 856-859); Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Lonberg, N. y Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* Vol. 13: 65-93, y Harding, F. y Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci* 764:536-546). Sin embargo, el término “anticuerpo humano” no incluye anticuerpos en los que se han injertado secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, en secuencias de entramado humanas (es decir, anticuerpos humanizados).

Tal como se usa en el presente documento, un “anticuerpo heterólogo” se define en relación con el organismo no humano transgénico que produce un anticuerpo de este tipo. Este término se refiere a un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos o una secuencia de ácido nucleico codificante correspondiente a la que se encuentra en un organismo que no consiste en el animal no humano transgénico, y generalmente de una especie distinta a la del animal no humano transgénico.

Un “anticuerpo aislado”, tal como se usa en el presente documento, pretende referirse a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a VHC está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos a VHC). Además, un anticuerpo aislado normalmente está sustancialmente libre de otro material celular y/o productos químicos. En una realización de la invención, una combinación de anticuerpos monoclonales “aislados” que tienen diferentes especificidades para VHC se combinan en una composición bien definida.

El término “epítopo” o “determinante antigénico” se refiere a un sitio en un antígeno en el que se une específicamente una inmunoglobulina o un anticuerpo (por ejemplo, E1 o E2 de VHC, por ejemplo, aminoácidos 412-464 de E2). Pueden formarse epítomos tanto a partir de aminoácidos contiguos como de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos mediante el plegamiento terciario de una proteína. Los epítomos formados a partir de aminoácidos contiguos se conservan normalmente tras la exposición a disolventes desnaturizantes, mientras que los epítomos formados mediante el plegamiento terciario se pierden normalmente tras el tratamiento con disolventes desnaturizantes. Un epítopo incluye normalmente al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ó 15 aminoácidos en una conformación espacial única. Los métodos de determinación de la conformación espacial de epítomos incluyen técnicas de la técnica y las descritas en el presente documento, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, por ejemplo, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996). En una realización preferida, el epítopo (o determinante antigénico) funciona como un epítopo lineal en el que, incluso en el contexto de un segmento de aminoácido más grande, por ejemplo, una proteína que tiene una estructura tridimensional, no se observa un aumento adicional en la afinidad para el epítopo / determinante antigénico.

Tal como se usa en el presente documento, los términos “unión específica”, “unión selectiva”, “se une selectivamente a” y “se une específicamente a”, se refieren a la unión del anticuerpo a un epítopo en un antígeno predeterminado. Normalmente, el anticuerpo se une con una afinidad (K_D) de aproximadamente menos de 10^{-7} M, tal como aproximadamente menos de 10^{-8} M, 10^{-9} M o 10^{-10} M o incluso menor cuando se determina mediante la tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR) en un instrumento BIACORE 3000 usando VHC recombinante como analito y el anticuerpo como ligando, y se une al antígeno predeterminado con una afinidad que es al menos dos veces mayor que su afinidad para la unión a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína) distinto del antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado. Las expresiones “un anticuerpo que reconoce un antígeno” y “un anticuerpo específico para un antígeno” se usan de manera intercambiable en el presente documento con el término “un anticuerpo que se une a específicamente a un antígeno”.

También están abarcados por la presente invención anticuerpos que se unen a los mismos epítomos que los anticuerpos humanos descritos en el presente documento, es decir, anticuerpos que compiten por la unión a VHC. Pueden identificarse anticuerpos que reconocen el mismo epítopo usando técnicas de rutina tales como un inmunoensayo, por ejemplo, mostrando la capacidad de un anticuerpo para bloquear la unión de otro anticuerpo a un antígeno diana, es decir, un ensayo de unión competitiva. La unión competitiva se determina en un ensayo en el que la inmunoglobulina a prueba inhibe la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común, tal como VHC. Se conocen numerosos tipos de ensayos de unión competitiva, por ejemplo: radioinmunoensayo directo o indirecto de fase sólida (RIA), inmunoensayo enzimático directo o indirecto de fase sólida (EIA), ensayo de competencia de tipo sándwich (véase Stahli *et al.*, *Methods in Enzymology* 9:242 (1983)); EIA de biotina-avidina directo de fase sólida (véase Kirkland *et al.*, *J. Immunol.* 137:3614 (1986)); ensayo marcado directo de fase sólida, ensayo de tipo sándwich marcado directo de fase sólida (véase Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988)); RIA de marcaje directo de fase sólida usando marcador de I-125 (véase Morel *et al.*, *Mol. Immunol.* 25(1):7 (1988)); EIA de biotina-avidina directo de fase sólida (Cheung *et al.*, *Virology* 176:546 (1990)); y RIA marcado directo. (Moldenhauer *et al.*, *Scand. J. Immunol.* 32:77 (1990)). Normalmente, un ensayo de este tipo implica el uso de antígeno purificado unido a una superficie sólida o células que portan cualquiera de éstos, una inmunoglobulina de prueba no marcada y una inmunoglobulina de referencia marcada. La inhibición competitiva se mide determinando la cantidad de marcador unido a la superficie sólida o células en presencia de la inmunoglobulina de prueba. Habitualmente, la inmunoglobulina de prueba está presente en exceso. Habitualmente,

cuando está presente un anticuerpo competidor en exceso, inhibirá la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común en al menos el 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75% o más.

El término " K_D " tal como se usa en el presente documento, pretende referirse a la constante de equilibrio de disociación de una interacción antígeno-anticuerpo particular. Normalmente, los anticuerpos humanos de la invención se unen a VHC con una constante de equilibrio de disociación (K_D) de menos de aproximadamente 10^{-7} M, tal como menos de aproximadamente 10^{-8} M, 10^{-9} M o 10^{-10} M o incluso menor cuando se determina mediante una tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR) en un instrumento BIACORE 3000 usando VHC humano recombinante como analito y el anticuerpo como ligando.

El término " K_{off} ", tal como se usa en el presente documento, pretende referirse a la constante de velocidad de disociación para la disociación de un anticuerpo del complejo anticuerpo/antígeno.

El término "CE50", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la concentración de un anticuerpo o una parte de unión a antígeno del mismo, que induce una respuesta, o bien en un ensayo *in vitro* o bien en uno *in vivo*, que es el 50% de la respuesta máxima, es decir, a medio camino entre la respuesta máxima y la línea base.

Tal como se usa en el presente documento, "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM o IgG1) que está codificada por genes de región constante de cadena pesada. En una realización, un anticuerpo monoclonal humano de la invención es del isotipo IgG1. En otra realización, un anticuerpo monoclonal humano de la invención es del isotipo IgG2.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "neutraliza VHC", "inhibe VHC" y "bloquea VHC" se usan de manera intercambiable para referirse a la capacidad de un anticuerpo de la invención para impedir que VHC infecte una célula dada.

Tal como se usa en el presente documento, el término "epítipo no conformacional" se refiere a un epítipo lineal que se compone normalmente de una secuencia de aminoácidos continua que es suficiente para la unión con un anticuerpo que puede unirse a un epítipo de este tipo. Esto contrasta con un epítipo conformacional, que requiere secuencias de aminoácidos discontinuas para formar una estructura tridimensional para que se produzca la unión entre el epítipo y el anticuerpo. Un epítipo lineal también puede distinguirse de un epítipo conformacional en que en condiciones desnaturalizantes, (por ejemplo, en un ensayo de inmunotransferencia tal como el descrito en el presente documento), el epítipo puede estar unido todavía por un anticuerpo que reconoce un epítipo de este tipo. En una realización, la invención proporciona un epítipo de E2 de VHC que es lineal, por ejemplo, no conformacional, por ejemplo, que comprende los residuos 412 a 423, o, que consiste en los residuos 412-423. En una realización relacionada, los anticuerpos de la invención se unen específicamente a un epítipo lineal de este tipo y no a un epítipo conformacional. Todavía más, la invención proporciona un epítipo lineal de este tipo como adecuado para el uso en el desarrollo de vacunas, la producción de anticuerpos frente al mismo y/o para el uso en inmunoterapia activa sola o en combinación con inmunoterapia pasiva.

Tal como se usa en el presente documento, "cambio de isotipo" se refiere al fenómeno mediante el cual cambia la clase, o isotipo, de un anticuerpo de una clase de Ig a una de las demás clases de Ig.

Tal como se usa en el presente documento, "isotipo no cambiado" se refiere a la clase isotípica de cadena pesada que se produce cuando no ha tenido lugar ningún cambio de isotipo; el gen C_H que codifica para el isotipo no cambiado es normalmente el primer gen C_H inmediatamente en el sentido 3' del gen VDJ reorganizado funcionalmente. El cambio de isotipo se ha clasificado como cambio de isotipo clásico o no clásico. El cambio de isotipo clásico se produce mediante acontecimientos de recombinación que implican al menos región de secuencia de cambio en el transgén. El cambio de isotipo no clásico de isotipo puede producirse mediante, por ejemplo, recombinación homóloga entre σ_μ humana y Σ_μ humana (deleción asociada a \square). Pueden producirse mecanismos de cambio no clásico alternativos, tales como recombinación intertransgénica y/o intercromosómica, entre otros, y efectuar el intercambio de isotipo.

Según se usa en este documento, el término "secuencia de cambio" se refiere a aquellas secuencias de ADN responsables de la recombinación de cambio. Una secuencia "donadora de cambio", normalmente junto con una región de cambio μ , estará en 5' (es decir, aguas arriba) de la región del constructo que va a deleccionarse durante la recombinación de cambio. La región "acceptora de cambio" estará entre la región del constructo que va a deleccionarse y la región constante de sustitución (por ejemplo, γ , ϵ , etc.). Como no hay ningún sitio específico en el que se produzca siempre recombinación, la secuencia génica final normalmente no será predecible a partir del constructo.

Tal como se usa en el presente documento, "patrón de glicosilación" se define como el patrón de unidades de hidrato de carbono que se unen covalentemente a una proteína, más específicamente a una proteína inmunoglobulina. Un patrón de glicosilación de un anticuerpo heterólogo puede caracterizarse como que es sustancialmente similar a patrones de glicosilación que se producen de manera natural en anticuerpos producidos por la especie del animal transgénico no humano, cuando un experto habitual en la técnica reconocería que el

patrón de glicosilación del anticuerpo heterólogo es más similar a dicho patrón de glicosilación en la especie del animal transgénico no humano que a la especie de la que se derivan los genes C_H del transgén.

El término “que se produce de manera natural” tal como se usa en el presente documento aplicado a un objeto se refiere al hecho de que un objeto puede encontrarse en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de polinucleótido o polipéptido que está presente en un organismo (incluyendo virus) que puede aislarse de una fuente en la naturaleza y que no se ha modificado intencionadamente por el hombre en el laboratorio se produce de manera natural.

El término “reorganizado” tal como se usa en el presente documento se refiere a una configuración de un locus de inmunoglobulina de cadena pesada o cadena ligera en el que un segmento V está situado inmediatamente adyacente a un segmento D-J o J en una conformación que codifica para esencialmente un dominio V_H o V_L completo, respectivamente. Un locus de gen de inmunoglobulina reorganizado puede identificarse mediante comparación con el ADN de línea germinal; un locus reorganizado tendrá al menos un elemento de homología de heptámero/nonámero recombinado.

El término “no reorganizado” o “configuración de línea germinal” tal como se usa en el presente documento en referencia a un segmento V se refiere a la configuración en la que el segmento V no se recombina de modo que sea inmediatamente adyacente a un segmento D o J.

El término “molécula de ácido nucleico”, tal como se usa en el presente documento, pretende incluir moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero preferiblemente es ADN bicatenario. El término “molécula de ácido nucleico aislado”, tal como se usa en el presente documento en referencia a ácidos nucleicos que codifican para anticuerpos o partes de anticuerpo (por ejemplo, V_H, V_L, CDR3) que se unen a VHC, pretende referirse a una molécula de ácido nucleico en que las secuencias de nucleótidos que codifican para el anticuerpo o parte de anticuerpo están libres de otras secuencias de nucleótidos que codifican para anticuerpos que se unen a antígenos distintos de VHC, otras secuencias que pueden flanquear de manera natural al ácido nucleico en ADN genómico humano.

También se dan a conocer en el presente documento “modificaciones conservativas de secuencia” de las secuencias expuestas en las SEQ ID NO de la presente invención, es decir, modificaciones de secuencias de nucleótidos y aminoácidos que no suprimen la unión del anticuerpo codificado por la secuencia de nucleótidos o que contiene la secuencia de aminoácidos, al antígeno. Tales modificaciones conservativas de secuencia incluyen sustituciones, adiciones y deleciones de nucleótidos y aminoácidos. Por ejemplo, pueden introducirse modificaciones mediante técnicas convencionales conocidas en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR. Las sustituciones conservativas de aminoácidos incluyen aquellas en las que el residuo de aminoácido se sustituye por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácido que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica. 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, cisteína, triptófano), cadenas laterales apolares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por tanto, un residuo de aminoácido no esencial predicho en un anticuerpo anti-VHC humano se sustituye preferiblemente por otro residuo de aminoácido de la misma familia de cadenas laterales. Se conocen bien en la técnica métodos de identificación de sustituciones conservativas de nucleótidos y aminoácidos que no eliminan la unión a antígeno (véanse, por ejemplo, Brummell *et al.* Biochem. 32: 1180-1187 (1993); Kobayashi *et al.* Protein Eng. 12(10):879-884 (1999); y Burks *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:412-417 (1997)). Alternativamente, pueden introducirse mutaciones al azar a lo largo de la totalidad o parte de una secuencia codificante de anticuerpo anti-VHC, tal como mediante mutagénesis de saturación, y pueden examinarse los anticuerpos anti-VHC modificados resultante para determinar la actividad de unión.

Una “secuencia consenso” es una secuencia formada a partir de los aminoácidos (o nucleótidos) que aparecen más frecuentemente en una familia de secuencias relacionadas (véase por ejemplo, Winnaker, From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania 1987). En una familia de proteínas, cada posición en la secuencia consenso está ocupada por el aminoácido que aparece más frecuentemente en esa posición en la familia. Si dos aminoácidos aparecen con igual frecuencia, puede incluirse cualquiera en la secuencia consenso. Una “secuencia de entramado consenso” de una inmunoglobulina se refiere a una región de entramado en la secuencia de inmunoglobulina consenso.

Tal como se representa en la figura 14, una secuencia consenso para las CDR de región variable de cadena pesada se deriva mediante la alineación óptima de las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de los anticuerpos que son reactivos frente al epítipo 412-423 de la glicoproteína de VHC E2-660. Por ejemplo, los anticuerpos derivados de los clones 83-128 (SEQ ID NO: 1), 95-2 (SEQ ID NO:3), 95-14 (SEQ ID NO:32), 95-38 (SEQ ID NO:33), 95-25 (SEQ ID NO:34), 95-42 (SEQ ID NO: 35), 95-43 (SEQ ID NO:36), 95-49 (SEQ ID NO:37), 95-54 (SEQ ID NO:38), 95-58 (SEQ ID NO:39) y 95-62 (SEQ ID NO:40) se alinean de forma óptima para obtener las

secuencias consenso para CDR1, CDR2 y CDR3. Por consiguiente, se encuentra que la secuencia consenso para CDR1 de la región variable de cadena pesada es "1YGMH", expuesta en SEQ ID NO: 87, en la que "1" representa un residuo de aminoácido pequeño y polar. Se encuentra que la secuencia consenso para CDR2 de la región variable de cadena pesada es "VIWXDX7NXYADS1516G", mostrada en SEQ ID NO:88, en la que "X" puede ser cualquier residuo de aminoácido, "7" representa un residuo de aminoácido pequeño y polar, "15" representa un residuo de aminoácido hidrófobo y "16" representa un residuo de aminoácido polar y cargado positivamente. Se encuentra que la secuencia consenso para CDR3 de la región variable de cadena pesada es "ARDI567XR10X12IYFD17", mostrada en SEQ ID NO:89, en la que "X" representa cualquier residuo de aminoácido, "5" representa fenilalanina o ningún aminoácido, "6" representa serina o treonina, "7" y "12" representa un residuo de aminoácido hidrófobo, "10" representa un residuo de aminoácido pequeño y "17" representa un residuo de aminoácido aromático.

De manera similar, la secuencia consenso para las CDR de la región variable de cadena ligera pueden derivarse mediante alineación óptima de las secuencias de aminoácidos de anticuerpos reactivos frente al epítipo 412-423 de la glicoproteína de VHC E2-660, tal como se muestra en la figura 15. Por ejemplo, secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena ligera de anticuerpos derivados de los clones 83-128 (SEQ ID NO:2), 073-1 (SEQ ID NO:6), 95-2 (SEQ ID NO:4), 95-14 (SEQ ID NO:44) y 95-38 (SEQ ID NO:53) se alinean de forma óptima para obtener las secuencias consenso para CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de cadena ligera. Se encuentra que la secuencia consenso para CDR1 de la región variable de cadena ligera es "RASQSVXSYLA", expuesta en SEQ ID NO:90, en la que "X" puede ser cualquier residuo de aminoácido. Se encuentra que la secuencia consenso para CDR2 de la región variable de cadena ligera es "DASNRAT", expuesta en SEQ ID NO:91. Se encuentra que la secuencia consenso para CDR3 de la región variable de cadena ligera es "QQRSNW7T", mostrada en SEQ ID NO:92, en la que "7" representa un residuo de aminoácido pequeño e hidrófobo.

Para ácidos nucleicos, el término "homología sustancial" indica que dos ácidos nucleicos, o secuencias designadas de los mismos, cuando se alinean y comparan de forma óptima, son idénticos, con inserciones o deleciones de nucleótidos apropiadas, en al menos aproximadamente el 80% de los nucleótidos, habitualmente en al menos aproximadamente del 90% al 95%, y más preferiblemente en al menos aproximadamente del 98% al 99,5% de los nucleótidos. Alternativamente, existe homología sustancial cuando los segmentos se hibridarán en condiciones de hibridación selectivas, con el complemento de la hebra.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de homología = n° de posiciones idénticas/ n° total de posiciones x 100), teniendo en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que es necesario introducir para la alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias puede realizarse usando un algoritmo matemático, tal como se describe en los ejemplos no limitativos a continuación.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos puede determinarse usando el programa GAP en el paquete de software del GCG, usando una matriz de NWSgapdna.CMP y una penalización por creación de hueco (*gap weight*) de 40, 50, 60, 70 u 80 y una penalización por extensión de hueco (*length weight*) de 1, 2, 3, 4, 5 ó 6. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos también puede determinarse usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (CABIOS, 4:11-17 (1989)) que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), usando una tabla de residuos en peso PAM120, una penalización por extensión de hueco de 12 y una penalización por creación de hueco de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse usando el algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. (48):444-453 (1970)) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software del GCG, usando o bien una matriz Blossum 62 o bien una matriz PAM250, y una penalización por creación de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 ó 4 y una penalización por extensión de hueco de 1, 2, 3, 4, 5 ó 6.

Las secuencias de ácidos nucleicos y proteínas de la presente invención pueden usarse además como "secuencia de búsqueda" para realizar una búsqueda frente a bases de datos públicas para identificar, por ejemplo, secuencias relacionadas. Tales búsquedas pueden realizarse usando los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul, *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. Las búsquedas de nucleótidos de BLAST pueden realizarse con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a las moléculas de ácido nucleico de la invención. Las búsquedas de proteínas de BLAST pueden realizarse con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de proteína de la invención. Para obtener alineaciones con huecos para fines de comparación, puede utilizarse Gapped BLAST tal como se describe en Altschul *et al.*, (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, pueden usarse los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST).

Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células completas, en un lisado celular, o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido nucleico está "aislado" o "es sustancialmente puro" cuando se ha purificado separándose de otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, mediante técnicas convencionales, incluyendo tratamiento con álcali/SDS, formación

de bandas en CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa y otros bien conocidos en la técnica. Véase, F. Ausubel, *et al.*, ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing y Wiley Interscience, Nueva York (1987).

- 5 Las composiciones de ácido nucleico de la presente invención, aunque a menudo están en una secuencia nativa (excepto por sitios de restricción modificados y similares), a partir de o bien ADNc, o bien ADN genómico o bien mezclas de los mismos, pueden mutarse, según técnicas convencionales para proporcionar secuencias génicas. Para secuencias codificantes, estas mutaciones, pueden afectar a la secuencia de aminoácidos según se desee. En particular, se contemplan secuencias de ADN sustancialmente homólogas a o derivadas de secuencias nativas de V, D, J, constantes, cambios y otras secuencias tales como las descritas en el presente documento (en las que
10 “derivada” indica que una secuencia es idéntica o se ha modificado a partir de otra secuencia).

- Un ácido nucleico está “operativamente unido” cuando se pone en relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor o potenciador está operativamente unido a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia. Con respecto a las secuencias reguladoras de la transcripción, operativamente
15 unidas significa que las secuencias de ADN que están unidas son contiguas y, cuando sea necesario unir dos regiones codificantes de proteína, contiguas y en el marco de lectura. Para secuencias de cambio, operativamente unidas indica que las secuencias pueden efectuar tal recombinación de cambio.

- 20 El término “vector”, tal como se usa en el presente documento, pretende referirse a una molécula de ácido nucleico que puede transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un “plásmido”, que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Determinados vectores pueden producir replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores de mamífero episómicos). Otros vectores (por
25 ejemplo, vectores de mamífero no episómicos) pueden integrarse en el genoma de una célula huésped tras la introducción en la célula huésped, y se replican de ese modo junto con el genoma del huésped. Además, determinados vectores pueden dirigir la expresión de genes a los que están unidos operativamente. Tales vectores se denominan en el presente documento “vectores de expresión recombinantes” (o simplemente, “vectores de expresión”). En general, los vectores de expresión de utilidad en técnica de ADN recombinante están a menudo en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, “plásmido” y “vector” pueden usarse de manera intercambiable ya que el plásmido es la forma usada más comúnmente de vector. Sin embargo, la invención pretende incluir otras formas de este tipo de vectores de expresión, tales como vectores virales (por ejemplo, retrovirus defectuoso para la replicación, adenovirus y virus adenoasociados), que sirven para funciones
30 equivalentes.
35

- El término “célula huésped recombinante” (o simplemente “célula huésped”), tal como se usa en el presente documento, pretende referirse a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Debe entenderse que tales términos pretenden referirse no sólo a la célula del sujeto particular sino a la progenie de una
40 célula de este tipo. Debido a que pueden producirse determinadas modificaciones en generaciones sucesivas debido o bien a mutación o bien a influencias ambientales, tal progenie puede no ser, de hecho, idéntica a la célula original, pero están incluidas todavía dentro del alcance del término “célula huésped” tal como se usa en el presente documento.

- 45 Los términos “tratar”, “que trata” y “tratamiento”, tal como se usa en el presente documento, se refieren a medidas terapéuticas o preventivas descritas en el presente documento. Los métodos de “tratamiento” emplean la administración a un sujeto, que necesita tal tratamiento, un anticuerpo humano de la presente invención, por ejemplo, un sujeto que tiene un trastorno mediado por VHC o un sujeto que puede adquirir en última instancia un trastorno de este tipo, para prevenir, curar, retardar, reducir la intensidad de, o mejorar uno o más síntomas del
50 trastorno o trastorno recurrente, o para prolongar la supervivencia de un sujeto más allá de lo esperado en ausencia de tal tratamiento.

- El término “trastorno mediado por VHC”, tal como se usa en el presente documento, incluye estados patológicos y/o síntomas asociados con una infección por VHC. En general, el término “trastorno mediado por VHC” se refiere a cualquier trastorno, cuya aparición, progresión o persistencia de los síntomas requiere la participación de VHC. Los trastornos mediados por VHC a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, cirrosis y cáncer de hígado.
55

- El término “dosis eficaz” o “dosificación eficaz” se define como una cantidad suficiente para lograr o al menos lograr parcialmente el efecto deseado. El término “dosis terapéuticamente eficaz” se define como una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente la enfermedad y sus complicaciones en un paciente que ya padece la enfermedad. Las cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad del trastorno que esté tratándose y del estado general del propio sistema inmunitario del paciente.
60

- 65 El término “paciente” incluye sujetos humanos y otros mamíferos que reciben tratamiento o bien profiláctico o bien terapéutico.

Tal como se usa en el presente documento, el término "sujeto" incluye cualquier ser humano o animal no humano. Por ejemplo, los métodos y las composiciones de la presente invención pueden usarse para tratar un sujeto con una enfermedad inflamatoria, tal como artritis, por ejemplo, artritis reumatoide. El término "animal no humano" incluye todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y animales no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, vacas, gallinas, anfibios, reptiles, etc.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o las pruebas de la presente invención, se describen métodos y materiales adecuados a continuación. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son meramente ilustrativos y no pretenden ser limitativos.

Se describen diversos aspectos de la invención con mayor detalle en las siguientes subsecciones.

VISIÓN GENERAL

El VHC produce patologías en los hepatocitos fatales en seres humanos. Se proporcionan en el presente documento métodos y composiciones para el tratamiento y la prevención de animales infectados por VHC, en particular, sujetos humanos, más particularmente. Las composiciones incluyen anticuerpos que reconocen la proteína E2 de VHC, o parte de la misma. En particular, se proporcionan anticuerpos monoclonales humanos totalmente recombinantes. En determinadas realizaciones, estos anticuerpos monoclonales humanos se producen en ratones que expresan segmentos génicos de inmunoglobulina humana (descritos a continuación). También se proporcionan combinaciones de anticuerpos anti-VHC.

Los nuevos métodos incluyen administrar anticuerpos (y partes de unión a antígeno de los mismos) que se unen a VHC en un sujeto para inhibir una enfermedad mediada por VHC en el sujeto. Por ejemplo, los anticuerpos anti-VHC monoclonales humanos descritos en el presente documento pueden neutralizar VHC e inhibir una infección por VHC y las secuelas de la misma, por ejemplo, cirrosis hepática y/o cáncer de hígado. En otros ejemplos, pueden administrarse combinaciones de anticuerpos anti-VHC (por ejemplo, anticuerpos monoclonales anti-proteína E2 de VHC) para inhibir una enfermedad mediada por VHC. Los anticuerpos monoclonales humanos pueden administrarse solos o en combinación con otras terapias.

1. Producción de anticuerpos humanos frente a VHC

La presente invención abarca un anticuerpo totalmente humano que se une a VHC, por ejemplo, VHC humano. Un anticuerpo monoclonal humano a modo de ejemplo que se une a VHC es 83-128. Otros anticuerpos monoclonales humanos que se unen a VHC incluyen 95-2, 95-14, 95-38 y 073-1.

Pueden producirse los anticuerpos monoclonales humanos de la invención usando una variedad de técnicas conocidas, tales como la técnica de hibridación de células somáticas convencional descrita por Kohler y Milstein, Nature 256: 495 (1975). Aunque se prefieren los procedimientos de hibridación de células somáticas, en principio, también pueden emplearse otras técnicas para producir anticuerpos monoclonales, por ejemplo, transformación viral u oncogénica de linfocitos B, técnica de presentación en fago usando bibliotecas de genes de anticuerpos humanos.

El sistema animal preferido para generar hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos de la invención es el sistema murino. La producción de hibridomas en el ratón se conoce bien en la técnica, incluyendo protocolos de inmunización y técnicas para aislar y fusionar esplenocitos inmunizados.

En una realización, se generan anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra VHC usando ratones transgénicos que portan partes del sistema inmunitario humano en vez del sistema de ratón. En una realización, la invención emplea ratones transgénicos, denominados en el presente documento "ratones HuMAb" que contienen un miniloci génico de inmunoglobulina humana que codifica para secuencias de inmunoglobulina de cadena pesada (μ y γ) y cadena ligera κ humana no reorganizadas, junto con mutaciones seleccionadas como diana que inactivan los loci de cadena μ y κ endógenos (Lonberg, N. *et al.* (1994) Nature 368(6474): 856-859). Por consiguiente, los ratones presentan una expresión reducida de κ o IgM de ratón, y en respuesta a inmunización, los transgenes de cadena pesada y ligera humana introducidos experimentan cambio de clase y mutación somática para generar anticuerpos monoclonales IgG κ humanos de alta afinidad (Lonberg, N. *et al.* (1994), citado anteriormente; revisado en Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113:49- 101; Lonberg, N. y Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. Vol. 13: 65-93, y Harding, F. y Lonberg, N. (1995) Ann. NY. Acad. Sci 764:536-546). La preparación de ratones HuMAb se describe en detalle en la Sección II a continuación y en Taylor, L. *et al.* (1992) Nucleic Acids Research 20:6287-6295; Chen, J. *et al.* (1993) International Immunology 5: 647-656; Tuailleon *et al.* (1993) Proc. Natl. Acad. Sci USA 90:3720-3724; Choi *et al.* (1993) Nature Genetics 4: 117-123; Chen, J. *et al.* (1993) EMBO J. 12: 821-830; Tuailleon *et al.* (1994) J. Immunol. 152:2912-2920; Lonberg *et al.* (1994) Nature 368(6474): 856-859; Lonberg, N.

(1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Taylor, L. *et al.* (1994) International Immunology 6: 579-591; Lonberg, N. y Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. Vol. 13: 65-93; Harding, F. y Lonberg, N. (1995) Ann. NY. Acad. Sci 764:536-546; Fishwild, D. *et al.* (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851. Véanse además, las patentes estadounidenses n.ºs 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299; y 5.770.429; todas concedidas a Lonberg y Kay y GenPharm International; la patente estadounidense n.º 5.545.807 concedida a Surani *et al.*; publicaciones internacionales n.ºs WO 98/24884, publicada el 11 de junio de 1998; WO 94/25585, publicada el 10 de noviembre 1994; WO 93/1227, publicada el 24 de junio de 1993; WO 92/22645, publicada el 23 de diciembre de 1992; WO 92/03918, publicada el 19 de marzo 1992.

10 *Immunizaciones*

Para generar anticuerpos monoclonales totalmente humanos frente a VHC, pueden inmunizarse ratones transgénicos que contienen genes de inmunoglobulina humana (por ejemplo, HCo12, HCo7) con una preparación purificada o enriquecida del antígeno de VHC y/o células que expresan VHC, tal como se describe, por ejemplo, por Lonberg *et al.* (1994) Nature 368(6474): 856-859; Fishwild *et al.* (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851 y el documento WO 98/24884. Tal como se describe en el presente documento, se inmunizan ratones HuMAb o bien con proteínas de VHC recombinantes o bien líneas celulares que expresan VHC como inmunógenos. Alternativamente, pueden inmunizarse ratones con ADN que codifica para VHC. Preferiblemente, los ratones tendrán 6-16 semanas de edad tras la primera infusión. Por ejemplo, puede usarse una preparación purificada o enriquecida (10-100 µg) de del antígeno de VHC recombinante para inmunizar los ratones HuMAb por vía intraperitoneal. En el caso de que las inmunizaciones usando una preparación purificada o enriquecida del antígeno de VHC no den como resultado anticuerpos, también pueden inmunizarse ratones con células que expresan proteínas de VHC, por ejemplo, una línea celular, para promover respuestas inmunitarias. Las líneas celulares a modo de ejemplo incluyen líneas celulares CHO y Raji estables que sobreexpresan VHC.

La experiencia acumulada con diversos antígenos ha mostrado que los ratones HuMAb transgénicos responden de la menor manera cuando se inmunizan inicialmente por vía intraperitoneal (i.p.) o por vía subcutánea (s.c.) con antígeno en adyuvante completo de Freund, seguido por inmunizaciones con JJVSC cada dos semanas (hasta un total de 10) con antígeno en adyuvante incompleto de Freund. La respuesta inmunitaria puede monitorizarse a lo largo del transcurso del protocolo de inmunización con muestras de plasma que se obtienen mediante extracciones de sangre retroorbitarias. El plasma puede examinarse mediante ELISA (tal como se describe a continuación), y pueden usarse ratones con títulos suficientes de inmunoglobulina humana anti-VHC para fusiones. A los ratones puede administrárseles una inmunización de refuerzo por vía intravenosa con antígeno 3 días antes del sacrificio y la extirpación del bazo.

Vacunas basadas en antígeno y conjugados de las mismas

También se da a conocer un epítipo no conformacional conservado de la glicoproteína de la envuelta E2 de VHC, por ejemplo, los aminoácidos 412-464, 412-423 o 413-420 de la proteína E2 de VHC, para su uso en inmunización activa contra una infección por VHC. Este epítipo puede usarse solo o puede modificarse, por ejemplo, para potenciar una respuesta inmunitaria frente al epítipo.

Pueden prepararse conjugados de antígeno contruidos químicamente usando una variedad de reactivos de reticulación fácilmente disponibles y bien conocidos. Estos reactivos de reticulación pueden ser compuestos homofuncionales o heterofuncionales, tales como, por ejemplo, SPDP, SATA, SMCC, DTNB, que forman uniones covalentes con diferentes cadenas laterales de hidrato de carbono o aminoácido reactivas con el antígeno seleccionado.

El portador puede seleccionarse del grupo que consiste en OMPC (complejo proteico de membrana externa de *Neisseria meningitidis*), BSA (albúmina sérica bovina), OVA (ovoalbúmina), THY (tiroglobulina bovina), KLH (hemocianina de lapa californiana) y TT (proteína del toxoide tetánico). Otros portadores, que tienen la capacidad de autoensamblarse en partículas pseudovirales (VLP), incluyen HbSAg (proteína de antígeno de superficie) y HbCAg (proteína de antígeno central) del virus de la hepatitis B, proteínas de la cápside de rotavirus, la proteína L1 del virus del papiloma humano, partículas del virus de la hepatitis E, proteína del virus del polio y proteínas estructurales del virus del papiloma bovino. (Véase J. of Phar. Sciences 95:70-79 (2005)).

La conjugación puede lograrse genética o químicamente, por ejemplo, usando uno o más de acoplamiento maleimida/tiol, acoplamiento bromoacetamida/tiol y reticulación selectiva para histidina. La conjugación puede lograrse usando un agente de reticulación seleccionado del grupo que consiste en uno de más de 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo (sSMCC), éster de N-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS), glutaraldehído, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDCI), Bis-diazobencidina (BDB); tiolactona de N-acetil-homocisteína (NAHT) y éster de N-[épsilon-maleimidocaproiloxi]sulfosuccinimida (sEMCS). En una realización, el agente de reticulación es un éster de N-[épsilon-maleimidocaproiloxi]sulfosuccinimida (sEMCS).

Generación de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos frente a VHC

Para generar hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos frente a VHC, pueden aislarse esplenocitos y células de ganglio linfático de ratones inmunizados y fusionarse a una línea celular inmortalizada apropiada, tal como una línea celular de mieloma de ratón. Entonces pueden examinarse los hibridomas resultantes para determinar la producción de anticuerpos específicos de antígeno. Por ejemplo, pueden fusionarse suspensiones monocelulares de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados a células de mieloma de ratón no secretoras SP2/0-Ag8.653 (ATCC, CRL 1580) con PEG al 50% (p/v). Pueden sembrarse en placas las células a aproximadamente 1×10^5 en placa de microtitulación de fondo plano, seguido por una incubación de dos semanas en medio selectivo que contiene además de los reactivos habituales suero Fetal Clone al 10%, y 1X HAT (Sigma). Tras aproximadamente dos semanas, pueden cultivarse las células en un medio en el que se sustituye el HAT por HT. Pueden examinarse pocillos individuales mediante ELISA para detectar anticuerpos IgM y IgG monoclonales anti-VHC humanos, o para la unión a la superficie de células que expresan proteínas de VHC, por ejemplo, una línea celular CHO que expresa VHC, mediante FLISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a fluorescencia). Una vez que se produce el crecimiento extenso de hibridomas, puede observarse el medio habitualmente tras 10-14 días. Los hibridomas secretores de anticuerpos pueden volver a sembrarse en placas, examinarse de nuevo y si todavía son positivos para IgG humana, pueden subclonarse los anticuerpos anti-VHC monoclonales al menos dos veces mediante dilución limitante. Entonces pueden cultivarse los subclones estables *in vitro* para generar anticuerpo en medio de cultivo tisular para su caracterización.

20 *Generación de transfectomas que producen anticuerpos monoclonales humanos frente a VHC*

También pueden producirse anticuerpos humanos en un transfectoma de célula huésped usando, por ejemplo, una combinación de técnica de ADN recombinante y métodos de transfección génica tal como se conoce bien en la técnica (Morrison, S. (1985) Science 229:1202).

Por ejemplo, en una realización, el/los gen(es) de interés, por ejemplo, genes de anticuerpo humano, pueden ligarse a un vector de expresión tal como un plásmido de expresión eucariota tal como el usado por el sistema de expresión génica GS dado a conocer en los documentos en WO 87/04462, WO 89/01036 y EP 338 841 u otros sistemas de expresión bien conocidos en la técnica. El plásmido purificado con los genes de anticuerpo clonados puede introducirse en células huésped eucariotas tales como células CHO o células NSO o alternativamente otras células eucariotas como células derivadas de plantas, hongos o células de levadura. El método usado para introducir estos genes pueden ser métodos descritos en la técnica tal como electroporación, Lipofectine, Lipofectamine u otros. Tras introducir estos genes de anticuerpo en las células huésped, pueden identificarse y seleccionarse las células que expresan el anticuerpo. Estas células representan los transfectomas que pueden entonces amplificarse para su nivel de expresión y ampliarse a escala para producir anticuerpos. Pueden aislarse anticuerpos recombinantes y purificarse de estos sobrenadantes de cultivo y/o células.

Alternativamente estos genes de anticuerpo clonados pueden expresarse en otros sistemas de expresión tales como *E. coli* o en organismos completos o puede expresarse de manera sintética.

40 *Uso de secuencias de anticuerpo parciales para expresar anticuerpos intactos*

Los anticuerpos interactúan con antígenos diana predominantemente a través de residuos de aminoácido que están ubicados en las seis regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cadena pesada y ligera. Por este motivo, las secuencias de aminoácidos dentro de las CDR son más diversas entre anticuerpos individuales que secuencias fuera de las CDR. Debido a que las secuencias CDR son responsables de la mayor parte de interacciones antígeno-anticuerpo, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imitan las propiedades de anticuerpos que se producen de manera natural específicos construyendo vectores de expresión que incluyen secuencias CDR del anticuerpo que se produce de manera natural específico injertadas sobre secuencias de entramado de un anticuerpo diferente con propiedades diferentes (véase, por ejemplo, Riechmann, L. *et al*, 1998, Nature 332:323-327; Jones, P. *et al*, 1986, Nature 321 :522-525; y Queen, C. *et al.*, 1989, Proc. Natl. Acad Sci. U.S.A. 86: 10029-10033). Tales secuencias de entramado pueden obtenerse de bases de datos de ADN públicas que incluyen secuencias génicas de anticuerpos de línea germinal. Estas secuencias de línea germinal diferirán de las secuencias génicas de anticuerpos maduros porque no incluirán genes variables completamente ensamblados, que se forman mediante la unión de V(D)J durante la maduración de células B. Las secuencias génicas de línea germinal también diferirán de las secuencias de un anticuerpo de repertorio secundario de alta afinidad, de manera individual, de manera uniforme a través de la región variable. Por ejemplo, las mutaciones somáticas son relativamente poco frecuentes en la parte amino-terminal de la región de entramado 1 y en la parte carboxi-terminal de la región de entramado 4. Además, muchas mutaciones somáticas no alteran significativamente las propiedades de unión del anticuerpo. Por este motivo, no es necesario obtener toda la secuencia de ADN de un anticuerpo particular para recrear un anticuerpo recombinante intacto que tiene propiedades de unión similares a las del anticuerpo original (véase el documento PCT/US99/05535 presentado el 12 de marzo de 1999). La secuencia parcial de cadena pesada y ligera que abarca las regiones CDR es suficiente normalmente para este fin. Se usa la secuencia parcial para determinar qué segmentos génicos de unión y variables de línea germinal contribuyeron a los genes variables de anticuerpos recombinados. La secuencia de línea germinal se usa entonces para rellenar las partes que faltan de las regiones variables. Se escinden secuencias líder de cadena pesada y ligera durante la

maduración de proteínas y no contribuyen a las propiedades del anticuerpo final. Para añadir secuencias que faltan, pueden combinarse secuencias de ADNc clonadas con oligonucleótidos sintéticos mediante ligamiento o amplificación por PCR. Alternativamente, toda la región variable puede sintetizarse como un conjunto de oligonucleótidos cortos, solapantes y combinarse mediante amplificación por PCR para crear un clon de región variable completamente sintético. Este proceso tiene determinadas ventajas tales como eliminación o inclusión o sitios de restricción particulares, u optimización de codones particulares.

Las secuencias de nucleótidos de transcritos de cadena pesada y ligera de un hibridoma se usan para diseñar un conjunto solapante de oligonucleótidos sintéticos para crear secuencias de V sintéticas con capacidades de codificación de aminoácidos idénticas a las de las secuencias naturales. Las secuencias de cadena kappa y pesada sintéticas pueden diferir de las secuencias naturales de tres maneras: se interrumpen cadenas de bases de nucleótidos repetidas para facilitar la síntesis de oligonucleótidos y la amplificación por PCR; se incorporan sitios de iniciación de la traducción óptimos según las reglas de Kozak (Kozak, 1991, J. Biol. Chem. 266: 19867-19870); y, se modifican mediante ingeniería genética sitios HindIII en el sentido de 5' desde los sitios de iniciación de la traducción.

Para las regiones variables tanto de cadena pesada como de ligera, se dividen las secuencias de hebra codificantes, y no codificantes correspondientes, optimizadas en oligonucleótidos de 30 - 50 nucleótidos empezando aproximadamente en el punto medio del oligonucleótido no codificante correspondiente. Por tanto, para cada cadena, los oligonucleótidos pueden ensamblarse en conjuntos bicaternarios solapantes que abarcan segmentos de 150 - 400 nucleótidos. Entonces se usan las combinaciones como moldes para producir productos de amplificación por PCR de 150 - 400 nucleótidos. Normalmente, se dividirá un único conjunto de oligonucleótidos de región variable en dos combinaciones que se amplifican por separado para generar dos productos de PCR solapantes. Estos productos solapantes se combinan entonces mediante amplificación por PCR para formar la región variable completa. También puede ser deseable incluir un fragmento solapante de la región constante de cadena pesada o ligera (incluyendo el sitio BbsI de la cadena ligera kappa, o el sitio AgeI si es la cadena pesada gamma) en la amplificación por PCR para generar fragmentos que pueden clonarse fácilmente en los constructos de vector de expresión.

Las regiones variables de cadena pesada y ligera reconstruidas se combinan entonces con secuencias clonadas de promotor, secuencia líder, iniciación de la traducción, secuencia líder, región constante, en 3' no traducida, de poliadenilación y terminación de la transcripción, para formar constructos de vector de expresión. Los constructos de expresión de cadena pesada y ligera pueden combinarse en un único vector, cotransfectarse, transfectarse en serie o transfectarse por separado en células huésped que entonces se fusionan para formar una célula huésped que expresa ambas cadenas.

Pueden construirse plásmidos para su uso en la construcción de vectores de expresión de modo que pueden usarse secuencias de ADNc de cadena ligera kappa V y pesada V amplificadas por PCR para reconstruir minigenes cadena pesada y ligera completos. Estos plásmidos pueden usarse para expresar anticuerpos IgG1κ o IgG4κ completamente humanos. Los anticuerpos totalmente humanos y quiméricos de la presente invención también incluyen anticuerpos IgG2, IgG3, IgE, IgA, IgM e IgD. Pueden construirse plásmidos similares para la expresión de otros isotipos de cadena pesada, o para la expresión de anticuerpos que comprenden cadenas ligeras lambda.

Por tanto, pueden usarse una o más características estructurales de un anticuerpo anti-VHC humano de la invención para crear anticuerpos anti-VHC humanos relacionados estructuralmente que conservan al menos una propiedad funcional de los anticuerpos de la invención, tal como, por ejemplo, unión a VHC o neutralización de VHC. Pueden combinarse una o más regiones CDR de anticuerpos de la invención de manera recombinante con CDR y regiones de entramado humanas conocidas para crear anticuerpos anti-VHC humanos modificados mediante ingeniería genética de manera recombinante, adicionales. Las regiones de entramado variables de cadena pesada y ligera pueden derivarse de las mismas secuencias de anticuerpo humano o diferentes. Las secuencias de anticuerpo humano puede ser las secuencias de anticuerpos humanos que se producen de manera natural o pueden ser secuencias consenso de varios anticuerpos humanos. Véanse Kettleborough *et al*, Protein Engineering 4:773 (1991); Kolbinger *et al*, Protein Engineering 6:971 (1993) y Carter *et al*, documento WO 92/22653.

Por consiguiente, se da a conocer en el presente documento un método para preparar un anticuerpo anti-VHC humano que incluye: preparar un anticuerpo que incluye (1) regiones de entramado de cadena pesada humana y CDR de cadena pesada humana, en el que al menos una de las CDR de cadena pesada humana incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias de aminoácidos de CDR de cadena pesada humana descritas en el presente documento; y (2) regiones de entramado de cadena ligera humana y CDR de cadena ligera humana, en el que al menos una de las CDR de cadena pesada humana incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias de aminoácidos de CDR de cadena ligera humana descritas en el presente documento, en el que el anticuerpo conserva la capacidad para unirse a VHC. La capacidad del anticuerpo para unirse a VHC puede determinarse usando ensayos de unión convencionales, tales como los expuestos en los ejemplos {por ejemplo, un ELISA o un FLISA}.

Se conoce bien en la técnica que los dominios de CDR3 de cadena pesada y ligera de anticuerpos desempeñan un

papel particularmente importante en la especificidad/afinidad de unión de un anticuerpo para un antígeno (véase, Hall *et al.*, J. Immunol, 149:1605-1612 (1992); Polymenis *et al.*, J. Immunol, 152:5318-5329 (1994); Jahn *et al.*, Immunobiol, 193:400-419 (1995); Klimka *et al.*, Brit. J. Cancer, 83: 252-260 (2000); Beiboer *et al.*, J. Mol. Biol, 296:833-849 (2000); Rader *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:8910-8915 (1998); Barbas *et al.*, J. Am. Chem. Soc, 116:2161-2162 (1994); Ditzel *et al.*, J. Immunol, 157:739-749. (1996)). Los anticuerpos recombinantes de la invención preparados tal como se expuso anteriormente comprenden las CDR3 de cadena pesada y ligera del anticuerpo 83-128. Los anticuerpos comprenden además las CDR2 del anticuerpo 83-128. Los anticuerpos comprenden además las CDR1 del anticuerpo 83-128. Otros anticuerpos dados a conocer en el presente documento comprenden cualquier combinación de las CDR3, CDR2 y CDR1 de cadena pesada y/o ligera de 83-128, 95-2, 95-14, 95-38 y 073-1.

Por consiguiente, en otra realización, la invención proporciona además anticuerpos anti-VHC que comprenden: (1) regiones de entramado de cadena pesada humana, una región CDR1 de cadena pesada humana, una región CDR2 de cadena pesada humana y una región CDR3 de cadena pesada humana, en las que la región CDR3 de cadena pesada humana es la CDR3 de 83-128; y (2) regiones de entramado de cadena ligera humana, una región CDR1 de cadena ligera humana, una región CDR2 de cadena ligera humana, y una región CDR3 de cadena ligera humana, en las que la región CDR3 de cadena ligera humana es CDR3 de 83-128. El anticuerpo incluye además la CDR2 de cadena pesada y la CDR2 de cadena ligera de anticuerpo 83-128. El anticuerpo comprende además la CDR1 de cadena pesada y la CDR1 de cadena ligera de 83-128.

Las regiones CDR1, 2 y/o 3 de un anticuerpo modificado mediante ingeniería genética descrito anteriormente pueden comprender la(s) secuencia(s) de aminoácidos exacta(s) a la(s) de los anticuerpos 83-128, 95-2, 95-14, 95-38 y 073-1 dados a conocer en el presente documento. Sin embargo, el experto habitual en la técnica apreciará que puede ser posible cierta desviación de las secuencias CDR exactas de 83-128, 95-2, 95-14, 95-38 y 073-1 a la vez que se conserva la capacidad del anticuerpo para unirse a VHC eficazmente (por ejemplo, modificaciones conservativas de secuencia). El anticuerpo modificado mediante ingeniería genética puede componerse de una o más CDR que son, por ejemplo, idénticas en el 90%, 95%, 98% o el 99,5% a una o más CDR de los anticuerpos 83-128, 95-2, 95-14, 95-38 y 073-1.

Tal como se da a conocer en el presente documento, uno o más residuos de una CDR pueden alterarse para modificar la unión para lograr una constante de asociación más favorecida de la unión, una constante de disociación más favorecida de la unión, o ambas, de tal manera que se logra una constante de unión idealizada. Usando esta estrategia, puede obtenerse un anticuerpo que tiene una afinidad de unión ultra alta, por ejemplo, una K_D de 10^{-10} M o menor. Pueden usarse técnicas de maduración por afinidad, bien conocidas en la técnica y las descritas en el presente documento, para alterar la(s) región/es regiones CDR seguido por examen de las moléculas de unión resultantes para el cambio deseado en la unión. Por consiguiente, a medida que se altera(n) la(s) CDR, pueden monitorizarse cambios en la afinidad de unión así como puede monitorizarse la inmunogenicidad y puntuarse de manera que se obtienen un anticuerpo optimizado para la menor unión combinada y baja inmunogenicidad.

Además de, o en lugar de, modificaciones dentro de las CDR, también pueden realizarse modificaciones dentro de una o más de las regiones de entramado, FR1, FR2, FR3 y FR4, de las regiones variables de cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo humano, siempre que estas modificaciones no eliminen la afinidad de unión del anticuerpo humano. Se sabe que los aminoácidos en varias posiciones en la región de entramado son importantes para determinar la conformación de las CDR (por ejemplo, que pueden interactuar con las CDR) en muchos anticuerpos (Chothia y Lesk, citado anteriormente, Chothia *et al.*, citado anteriormente y Tramontano *et al.*, J. Mol. Biol. 215:175 (1990), todos los cuales se incorporan al presente documento como referencia). Estos autores identificaron residuos de entramado conservados importantes para la conformación de las CDR mediante análisis de las estructuras de varios anticuerpos conocidos. Los anticuerpos analizados se clasificaron en un número limitado de clases estructurales o "canónicas" basándose en la conformación de las CDR. Los residuos de entramado conservados dentro de miembros de una clase canónica se denominan residuos "canónicos". Los residuos canónicos incluyen los residuos 2, 25, 29, 30, 33, 48, 64, 71, 90, 94 y 95 de la cadena ligera y los residuos 24, 26, 29, 34, 54, 55, 71 y 94 de la cadena pesada. Pueden identificarse residuos adicionales (por ejemplo, residuos determinantes de la estructura de CDR) según la metodología de Martin y Thorton (1996) J. Mol. Biol. 263:800. Concretamente, se sabe que los aminoácidos en las posiciones 2, 48, 64 y 71 de la cadena ligera y 26-30, 71 y 94 de la cadena pesada (numeración según Kabat) pueden interactuar con las CDR en muchos anticuerpos. Los aminoácidos en las posiciones 35 en la cadena ligera y 93 y 103 en la cadena pesada también es probable que interaccionen con las CDR. Pueden identificarse residuos adicionales que pueden afectar a la conformación de las CDR según la metodología de Foote y Winter (1992) J. Mol. Biol. 224:487. Tales residuos se denominan residuos "vernier" y son aquellos residuos en la región de entramado estrechamente subyacentes (es decir, formando una "plataforma" debajo) a las CDR.

Los residuos que "participan en la superficie de contacto V_L - V_H " o "residuos de relleno" incluyen aquellos residuos en la superficie de contacto entre V_L y V_H tal como se define, por ejemplo, por Novotny y Haber, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:4592-66 (1985) o Chothia *et al.*, citado anteriormente.

De manera ocasional, existe cierta ambigüedad sobre si un aminoácido particular se encuentra dentro de una o más

de las categorías mencionadas anteriormente. En tales casos, se producen anticuerpos variantes alternativos, uno de los cuales tiene esa sustitución particular, y el otro no. Los anticuerpos variantes alternativos así producidos pueden someterse a prueba en cualquiera de los ensayos descritos en el presente documento para la actividad deseada, y el anticuerpo preferido seleccionado.

5 Candidatos adicionales para la sustitución dentro de la región de entramado son aminoácidos que son inusuales o "raros" para un anticuerpo humano en esa posición. Estos aminoácidos pueden sustituirse por aminoácidos de la posición equivalente de la secuencia de línea germinal humana o de las posiciones equivalentes de anticuerpos humanos más típicos. Por ejemplo, puede ser deseable la sustitución cuando el aminoácido en una región de
10 entramado humana del anticuerpo humano es raro para esa posición y el aminoácido correspondiente en la secuencia de línea germinal es común para esa posición en secuencias de inmunoglobulina humana; o cuando el aminoácido en el anticuerpo humano es raro para esa posición y el aminoácido correspondiente en la secuencia de línea germinal también es raro, con relación a otras secuencias humanas. Se contempla que sustituyendo un aminoácido inusual por un aminoácido de la secuencia de línea germinal, lo que parece ser típico para anticuerpos
15 humanos, puede hacerse que el anticuerpo humano sea menos inmunogénico.

El término "raro", tal como se usa en el presente documento, indica un aminoácido que aparece en esa posición en menos de aproximadamente el 20%, preferiblemente menos de aproximadamente el 10%, más preferiblemente menos de aproximadamente el 5%, incluso más preferiblemente menos de aproximadamente el 3%, incluso más
20 preferiblemente menos de aproximadamente el 2% y incluso más preferiblemente menos de aproximadamente el 1% de las secuencias en una muestra representativa de secuencias, y el término "común", tal como se usa en el presente documento, indica un aminoácido que aparece en más de aproximadamente el 25% pero habitualmente más de aproximadamente el 50% de las secuencias en una muestra representativa. Por ejemplo, todas las secuencias de región variable de cadena ligera y pesada humanas se agrupan respectivamente en "subgrupos" de
25 secuencias que son especialmente homólogas entre sí y tienen los mismos aminoácidos en determinadas posiciones críticas (Kabat *et al*, citado anteriormente). Cuando se decide si un aminoácido en una secuencia de anticuerpo humano es "rara" o "común" entre secuencias humanas, a menudo será preferible considerar sólo aquellas secuencias humanas en el mismo subgrupo que la secuencia de anticuerpo humano.

30 En general, las regiones de entramado de los anticuerpos humanos habitualmente son sustancialmente idénticas, y más habitualmente, idénticas a las regiones de entramado de las secuencias de línea germinal humana de las que se derivan. Naturalmente, muchos de los aminoácidos en la región de entramado realizan una pequeña o ninguna contribución directa a la especificidad o afinidad de un anticuerpo. Por tanto, pueden tolerarse muchas sustituciones conservativas individuales de residuos de región de entramado sin cambio apreciable de la especificidad o afinidad
35 de la inmunoglobulina humana resultante. Por tanto, en una realización, la región variable de entramado del anticuerpo humano comparte una identidad de secuencia de al menos el 85% con una secuencia de región variable de entramado de línea germinal humana o secuencia consenso de tales secuencias. En otra realización, la región variable de entramado del anticuerpo humano comparte una identidad de secuencia de al menos el 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o el 99% con una secuencia de región variable de entramado de línea germinal humana o secuencia
40 consenso de tales secuencias.

Además de unirse simplemente a un epítipo lineal de una proteína E2 de VHC, puede seleccionarse un anticuerpo monoclonal para que conserve otras propiedades funcionales de los anticuerpos de la invención, tales como unión a
45 múltiples genotipos de E2 de VHC y/o unión con una afinidad ultra alta tal como, por ejemplo, una K_D de 10^{-9} M o menor.

Caracterización de anticuerpos monoclonales humanos frente a VHC

50 Pueden caracterizarse anticuerpos monoclonales humanos por la unión a VHC usando una variedad de técnicas conocidas. Generalmente, los anticuerpos se caracterizan inicialmente mediante ELISA. Brevemente, pueden recubrirse placas de microtitulación con VHC purificado en PBS, y luego bloquearse con proteínas irrelevantes tales como albúmina sérica bovina (BSA) diluida en PBS. Se añaden diluciones de plasma de ratones inmunizados con VHC a cada pocillo y se incuban durante 1-2 horas a 37°C. Se lavan las placas con PBS/Tween 20 y luego se incuban con un reactivo policlonal específico de Fc de cabra anti-IgG humana conjugado a fosfatasa alcalina durante
55 1 hora a 37°C. Tras el lavado, se revelan las placas con sustrato ABTS, y se analizan a una DO de 405. Preferiblemente, los ratones que desarrollen los mayores títulos se usarán para fusiones.

60 Puede usarse un ensayo ELISA tal como se describió anteriormente para examinar anticuerpos y, por tanto, hibridomas que producen anticuerpos que muestran reactividad positiva con el inmunógeno de VHC. Los hibridomas que se unen, preferiblemente con alta afinidad, a VHC pueden entonces subclonarse y caracterizarse adicionalmente. Puede elegirse entonces un clon de cada hibridoma, que conserva la reactividad de la célula original (mediante ELISA), para preparar un banco de células, y para la purificación de anticuerpos.

65 Para purificar anticuerpos anti-VHC humanos, pueden hacerse crecer hibridomas seleccionados en frascos rotativos, frascos de agitación de dos litros u otros sistemas de cultivo. Pueden filtrarse los sobrenadantes y concentrarse antes de cromatografía de afinidad con proteína A-Sepharose (Pharmacia, Piscataway, NJ) para purificar la proteína.

Tras el intercambio de tampón a PBS, puede determinarse la concentración mediante DO_{280} usando un coeficiente de extinción de 1,43 o preferiblemente mediante análisis nefelométrico. Puede comprobarse la IgG mediante electroforesis en gel y mediante un método específico de antígeno.

- 5 Para determinar si los anticuerpos monoclonales anti-VHC humanos seleccionados se unen a epítopos únicos, cada anticuerpo puede biotinilarse usando reactivos disponibles comercialmente (Pierce, Rockford, IL). La unión a AcM biotinilado puede detectarse con una sonda marcada con estreptavidina. Para determinar el isotipo de los anticuerpos purificados, pueden realizarse ELISA de isotipo usando técnicas reconocidas en la técnica. Por ejemplo, pueden recubrirse pocillos de placas de microtitulación con 10 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo anti-Ig humana durante la noche a 4°C. Tras el bloqueo con BSA al 5%, se hacen reaccionar las placas con 10 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpos monoclonales o controles de isotipo purificados, a la temperatura ambiental durante dos horas. Los pocillos pueden hacerse reaccionar entonces o bien con IgG1 humana o bien con otras sondas conjugadas específicas de isotipo humano. Se revelan las placas y se analizan tal como se describió anteriormente.
- 10
- 15 Pueden someterse a prueba adicionalmente IgG humanas anti-VHC para determinar la reactividad con el antígeno de VHC mediante inmunotransferencia de tipo Western. Brevemente, pueden prepararse extractos celulares a partir de células que expresan VHC y someterse a electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida. Tras la electroforesis, se transferirán los antígenos separados a membranas de nitrocelulosa, se bloquearán con suero de ratón al 20%, y se examinarán con sonda con los anticuerpos monoclonales que van a someterse a prueba. Puede detectarse la unión a IgG humana usando anticuerpo anti-IgG humana-fosfatasa alcalina y revelarse con pastillas de sustrato BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO).
- 20

II. Producción de animales no humanos transgénicos que generan los anticuerpos anti-VHC monoclonales humanos

- 25 También se dan a conocer en el presente documento animales no humanos transgénicos, tales como ratones transgénicos, que pueden expresar anticuerpos monoclonales humanos que se unen específicamente a VHC. En particular, se da a conocer en el presente documento un ratón transgénico que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana, de manera que el ratón produce anticuerpos anti-VHC humanos cuando se inmuniza con antígeno de VHC y/o células que expresan VHC. El transgén de cadena pesada humana puede integrarse en el ADN cromosómico del ratón, como es el caso para ratones transgénicos, por ejemplo, HuMAb, tal como se describe en detalle en el presente documento y se ejemplifica. Tales ratones transgénicos pueden producir múltiples isotipos de anticuerpos monoclonales humanos frente a VHC (por ejemplo, IgG) sometiéndolos a recombinación V-D-J y cambio de isotipo. El cambio de isotipo puede producirse mediante, por ejemplo, cambio de isotipo clásico o no clásico.
- 30
- 35 El diseño de un animal no humano transgénico que responde a estimulación con antígenos foráneos con un repertorio de anticuerpos heterólogos requiere que los transgenes de inmunoglobulina heterólogos contenidos dentro del animal transgénico funcionen correctamente en la totalidad de la ruta de desarrollo de células B. Esto incluye, por ejemplo, cambio de isotipo del transgén de cadena pesada heterólogo. Por consiguiente, se construyen transgenes de modo que se produzca el cambio de isotipo y uno o más de los siguientes de los anticuerpos: (1) expresión de alto nivel y específica del tipo celular, (2) reorganización de genes funcionales, (3) activación de y respuesta a exclusión alélica, (4) expresión de un repertorio primario suficiente, (5) transducción de señales, (6) hipermutación somática, y (7) dominación del locus de anticuerpo de transgén durante la respuesta inmunitaria.
- 40
- 45 No es necesario que se cumplan todos los criterios anteriores. Por ejemplo, cuando se perturban funcionalmente los loci de inmunoglobulina endógenos del animal transgénico, no es necesario que el transgén active la exclusión alélica. Además, cuando el transgén comprende un gen de inmunoglobulina de cadena pesada y/o ligera funcionalmente reorganizada, es innecesario el segundo criterio de reorganización de genes funcionales, al menos para ese transgén que ya está reorganizado. Para antecedentes sobre inmunología molecular, véase, *Fundamental Immunology*, 2ª edición (1989), Paul William E., ed Raven Press, N. Y.
- 50

- Los animales no humanos transgénicos usados para generar los anticuerpos monoclonales humanos de la invención contienen transgenes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina heterólogos reorganizados, no reorganizados o una combinación de reorganizados y no reorganizados en la línea germinal del animal transgénico. Cada uno de los transgenes de cadena pesada comprende al menos un gen C_H . Además, el transgén de cadena pesada puede contener secuencias de cambio de isotipo funcionales, que pueden soportar un cambio de isotipo de un transgén heterólogo que codifica para múltiples genes C_H en las células B del animal transgénico. Tales secuencias de cambio pueden ser las que se producen de manera natural en el locus de inmunoglobulina de línea germinal de la especie que sirve como fuente de los C_H genes C_H del transgén, o tales secuencias de cambio pueden derivarse de las que se producen en la especie que va a recibir el constructo de transgén (el animal transgénico). Por ejemplo, un constructo de transgén humano que se usa para producir un ratón transgénico puede producir una mayor frecuencia acontecimientos de cambio de isotipo si incorpora secuencias de cambio similares a las que se producen de manera natural en el locus de cadena pesada de ratón, ya que presumiblemente las secuencias de cambio de ratón están optimizadas para funcionar con el sistema de enzima recombinasa de cambio de ratón, mientras que las secuencias de cambio humanas no lo están. Las secuencias de cambio pueden aislarse y clonarse mediante métodos de clonación convencionales, o pueden sintetizarse *de novo* a partir de oligonucleótidos sintéticos solapantes diseñados
- 55
- 60
- 65

basándose en la información de secuencia publicada referente a secuencias de región de cambio de inmunoglobulina (Mills *et al*, Nucl. Acids Res. 15:7305-7316 (1991); Sideras *et al.*, Intl. Immunol. 1 :631-642 (1989)). Para cada uno de los animales transgénicos anteriores, se encuentran transgenes de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera heterólogos funcionalmente reorganizados en una fracción significativa de las células B del animal transgénico (al menos el 10 por ciento).

Los transgenes usados para generar los animales transgénicos pueden incluir un transcén de cadena pesada que comprende ADN que codifica para al menos un segmento génico variable, un segmento génico de diversidad, un segmento génico de unión y al menos un segmento génico de región constante. El transcén de cadena ligera de inmunoglobulina comprende ADN que codifica para al menos un segmento génico variable, un segmento génico de unión y al menos un segmento génico de región constante. Los segmentos génicos que codifican para los segmentos génicos de cadena ligera y pesada son heterólogos para el animal no humano transgénico del que se derivan, o corresponden a, ADN que codifica para segmentos génicos de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina de una especie que no consiste en el animal no humano transgénico. El transcén puede construirse de manera que los segmentos génicos individuales no estén reorganizados, es decir, no reorganizados de modo que codifique para una cadena ligera o pesada de inmunoglobulina funcional. Tales transgenes no reorganizados soportan la recombinación de los fragmentos génicos V, D y J (reorganización funcional) y soportan preferiblemente la incorporación de la totalidad o una parte de un segmento génico de región D región en la cadena pesada de inmunoglobulina reorganizada resultante dentro del animal no humano transgénico cuando se expone al antígeno de VHC.

Los transgenes pueden comprender un "mini-locus" no reorganizado. Tales transgenes comprenden normalmente una parte sustancial de los segmentos C, D y J así como un subconjunto de los segmentos génicos V. En tales constructos de transcén, las diversas secuencias reguladoras, por ejemplo promotores, potenciadores, regiones de cambio de clase, secuencias donadoras de corte y empalme yceptoras de corte y empalme para procesamiento de ARN, señales de recombinación y similares, comprenden secuencias correspondientes derivadas del ADN heterólogo. Tales secuencias reguladoras pueden incorporarse en el transcén de la misma especie o una relacionada del animal no humano usado en la invención. Por ejemplo, pueden combinarse segmentos génicos de inmunoglobulina humana en un transcén con una secuencia potenciadora de inmunoglobulina de roedor para su uso en un ratón transgénico. Alternativamente, pueden incorporarse secuencias reguladoras sintéticas en el transcén, en el que tales secuencias reguladoras sintéticas no son homólogas a una secuencia de ADN funcional que se sabe que se produce de manera natural en los genomas de mamíferos. Las secuencias reguladoras sintéticas se diseñan según reglas de consenso, tales como, por ejemplo, las que especifican las secuencias admisibles de un sitio aceptor de corte y empalme o un motivo promotor/potenciador. Por ejemplo, un minilocus comprende una parte del locus genómico de inmunoglobulina que tiene al menos una delección interna (es decir, no está en un extremo terminal de la parte) de una parte de ADN no esencial (por ejemplo, secuencia intermedia; intrón o parte del mismo) en comparación con el locus de Ig de línea germinal que se produce de manera natural.

El animal transgénico usado para generar anticuerpos humanos frente a VHC contiene preferiblemente al menos una, normalmente 2-10, y algunas veces 25-50 o más copias del transcén descrito en el ejemplo 12 del documento WO 98/24884 (por ejemplo, pHC1 o pHC2) cruzado con un animal que contenía una única copia de un transcén de cadena ligera descrito en los ejemplos 5, 6, 8 ó 14 del documento WO 98/24884, y se cruzó la descendencia con el animal con J_H delecionado descrito en el ejemplo 10 del documento WO 98/24884. Se cruzan los animales para producir homocigosidad para cada uno de estos tres rasgos. Tales animales tienen el siguiente genotipo: una única copia (por conjunto haploide de cromosomas) de un mini-locus no reorganizado de cadena pesada humana (descrito en el ejemplo 12 del documento WO 98/24884), una única copia (por conjunto haploide de cromosomas) de un constructo de cadena ligera K humana reorganizada (descrito en el ejemplo 14 del documento WO 98/24884), y una delección en cada locus de cadena pesada de ratón endógeno que elimina todos los segmentos J_H funcionales (descrito en el ejemplo 10 del documento WO 98/24884). Tales animales se cruzan con ratones que son homocigotos para la delección de los segmentos J_H (ejemplos 10 del documento WO 98/24884) para producir descendencia que es homocigota para la delección de J_H e hemicigota para los constructos de cadena pesada y ligera humana. A los animales resultantes se les inyectan antígenos y se usan para la producción de anticuerpos monoclonales humanos contra estos antígenos.

Las células B aisladas de un animal de este tipo son monoespecíficas con respecto a las cadenas pesadas y ligeras humanas porque sólo contienen una única copia de cada gen. Además, serán monoespecíficas con respecto a cadenas pesadas humanas o de ratón porque ambas copias del gen de cadena pesada de ratón endógeno son no funcionales en virtud de la delección que abarca la región J_H introducida tal como se describe en los ejemplos 9 y 12 del documento WO 98/24884. Además, una fracción sustancial de las células B serán monoespecíficas con respecto a las cadenas ligeras humanas o de ratón porque la expresión de la única copia del gen de cadena ligera K humana reorganizada excluirá de manera alélica e isotípica la reorganización de los genes de cadena lambda y K de ratón endógenos en una fracción significativa de células B.

Los ratones transgénicos dados a conocer en el presente documento muestran producción de inmunoglobulinas con un repertorio significativo, de manera ideal sustancialmente similar al de un ratón nativo. Por tanto, por ejemplo, en realizaciones en las que los genes de Ig endógenos se han inactivado, los niveles de inmunoglobulina total oscilarán

entre aproximadamente 0,1 y 10 mg/ml de suero, preferiblemente de 0,5 a 5 mg/ml, de manera ideal de al menos aproximadamente 1,0 mg/ml. Cuando un transgén que puede efectuar un cambio de IgM a IgG se ha introducido en el ratón transgénico, la razón en ratón adulto de IgG con respecto a IgM en suero es preferiblemente de aproximadamente 10:1. La razón de IgG con respecto a IgM será mucho menor en el ratón inmaduro. En general, más de aproximadamente el 10%, preferiblemente del 40 al 80% de las células B de bazo y ganglio linfático expresan exclusivamente proteína IgG humana.

El repertorio se aproximará de manera ideal al mostrado en un ratón nativo, habitualmente al menos aproximadamente de tanto como el 10%, preferiblemente del 25 al 50% o más. Generalmente, se producirán al menos aproximadamente mil inmunoglobulinas diferentes (de manera ideal IgG), preferiblemente de 10^4 a 10^6 o más, dependiendo principalmente del número de regiones V, J y D diferentes introducidas en el genoma del ratón. Estas inmunoglobulinas reconocerán normalmente aproximadamente la mitad o más de proteínas altamente antigénicas, por ejemplo, proteína A de *Staphylococcus*. Normalmente, las inmunoglobulinas mostrarán una afinidad (K_D) para antígenos preseleccionados inferior a 10^{-7} M, tal como inferior a 10^{-8} M, 10^{-9} M o 10^{-10} M o incluso menor.

Puede ser preferible generar ratones con repertorios predeterminados para limitar la selección de genes V representados en la respuesta de anticuerpos a un tipo de antígeno predeterminado. Un transgén de cadena pesada que tiene un repertorio predeterminado puede comprender, por ejemplo, genes V_H humanos que se usan preferentemente en respuestas de anticuerpos al tipo de antígeno predeterminado en seres humanos. Alternativamente, algunos genes V_H pueden excluirse de un repertorio definido por diversos motivos (por ejemplo, tienen una baja probabilidad de codificar para regiones V de alta afinidad para el antígeno predeterminado; tienen una baja propensión a experimentar mutación somática y definición de afinidad; o son inmunogénicos para determinados seres humanos). Por tanto, antes de la reorganización de un transgén que contiene diversos segmentos génicos de cadena pesada o ligera, tales segmentos génicos pueden identificarse fácilmente, por ejemplo mediante hibridación o secuenciación de ADN, como que son de una especie de organismo distinto al animal transgénico.

Pueden inmunizarse ratones transgénicos tal como se describió anteriormente con, por ejemplo, una preparación purificada o enriquecida de antígeno de VHC y/o células que expresan proteínas de VHC. Alternativamente, los ratones transgénicos pueden inmunizarse con ADN que codifica para proteínas de VHC. Los ratones producirán entonces células B que experimentan cambio de clase a través de recombinación de cambio intratransgénico (cambio cis) y expresan inmunoglobulinas reactivas con VHC. Las inmunoglobulinas pueden ser anticuerpos humanos (también denominados "anticuerpos de secuencia humana"), en los que los polipéptidos de cadena pesada y ligera están codificados por secuencias de transgén humano, que pueden incluir secuencias derivadas mediante mutación somática y uniones recombinatorias de región V, así como secuencias codificadas por línea germinal; puede hacerse referencia a que estos anticuerpos humanos son sustancialmente idénticos a una secuencia de polipéptido codificada por un segmento de gen V_L o V_H humano y un segmento J_L o D_H y J_H humano, aunque pueden estar presentes otras secuencias que no son de línea germinal como resultado de mutación somática y uniones de recombinación V-J y V-D-J diferenciales. Las regiones variables de cada cadena de anticuerpo están codificadas normalmente al menos al 80 por ciento por segmentos génicos de línea germinal humana V, J, y, en el caso de cadena pesadas, D; frecuentemente al menos el 85 por ciento de las regiones variables están codificadas por secuencias de línea germinal humana presentes en el transgén; a menudo el 90 ó 95 por ciento o más de las secuencias de región variable están codificadas por secuencias de línea germinal humana presentes en el transgén. Sin embargo, puesto que se introducen secuencias que no son de línea germinal mediante mutación somática y unión VJ y VDJ, los anticuerpos de secuencia humana tendrán frecuentemente algunas secuencias de región variable (y menos frecuentemente secuencias de región constante) que no están codificadas por segmentos génicos V, D, o J humanos tal como se encuentra en el/los transgén/transgenes humano/s en la línea germinal de los ratones. Normalmente, tales secuencias que no son de línea germinal (o posiciones de nucleótidos individuales) se agruparán en o cerca de las CDR, o en regiones en las que se sabe que se agrupan mutaciones somáticas.

Pueden producirse anticuerpos humanos que se unen al antígeno predeterminado como resultado del cambio de isotipo, de manera que se producen anticuerpos humanos que comprenden una cadena γ de secuencia humana (tal como $\gamma 1$, $\gamma 2a$, $\gamma 2B$, o $\gamma 3$) y una cadena ligera de secuencia humana (tal como kappa). Tales anticuerpos humanos con cambio de isotipo contienen a menudo una o más mutaciones somáticas, normalmente en la región variable y a menudo en o dentro de aproximadamente 10 residuos de una CDR) como resultado de maduración de afinidad y selección de células B por antígeno, particularmente de manera posterior a la exposición a antígeno secundario (o posterior). Estos anticuerpos humanos de alta afinidad pueden tener afinidades de unión (K_D) inferiores a 10^{-7} M, tal como inferiores a 10^{-8} M, 10^{-9} M o 10^{-10} M o incluso menores.

También se dan a conocer células B derivadas de ratones transgénicos tal como se describe en el presente documento. Las células B pueden usarse para generar hibridomas que expresan anticuerpos monoclonales humanos que se unen con alta afinidad (por ejemplo, K_D menor que 10^{-7} M) a VHC humano. Por tanto, se da a conocer en el presente documento un hibridoma que produce un anticuerpo humano que tiene una afinidad (K_D) inferior a 10^{-7} M, tal como inferior a 10^{-8} M, 10^{-9} M o 10^{-10} M o incluso menor cuando se determina mediante tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR) en un instrumento BIACORE 3000 usando VHC humano recombinante como analito y el anticuerpo como ligando para la unión a VHC humano, en el que el anticuerpo

comprende:

5 una cadena ligera de secuencia humana que se compone de (1) una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de polipéptido que es sustancialmente idéntica a una secuencia de polipéptido codificada por un segmento de gen V_L humano y un segmento J_L humano, y (2) una región constante de cadena ligera que tiene una secuencia de polipéptido que es sustancialmente idéntica a una secuencia de polipéptido codificada por un segmento de gen C_L humano; y

10 una cadena pesada de secuencia humana que se compone de (1) una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de polipéptido que es sustancialmente idéntica a una secuencia de polipéptido codificada por un segmento de gen V_H humano, opcionalmente una región D, y un segmento J_H humano, y (2) una región constante que tiene una secuencia de polipéptido que es sustancialmente idéntica a una secuencia de polipéptido codificada por un segmento de gen C_H humano.

15 El desarrollo de anticuerpos monoclonales humanos de alta afinidad contra VHC puede ser facilitarse mediante un método para expandir el repertorio de segmentos génicos de región variable humana en un ratón transgénico que tiene un genoma que comprende un transgén de inmunoglobulina humana integrada, comprendiendo dicho método introducir en el genoma un transgén de gen V que comprende segmentos génicos de región V que no están presentes en dicho transgén de inmunoglobulina humana integrada. A menudo, el transgén de región V es un cromosoma artificial de levadura que comprende una parte de un alineamiento de segmentos de genes V_H o V_L (V_K) humanos, tal como puede producirse de manera natural en un genoma humano o tal como pueden someterse juntos a corte y empalme por separado mediante métodos recombinantes, que pueden incluir segmentos génicos V fuera de servicio u omitidos. A menudo al menos cinco o más segmentos génicos V funcionales están contenidos en el YAC. En esta variación, es posible producir un ratón transgénico producido mediante el método de expansión de repertorio V, en el que el ratón expresa una cadena de inmunoglobulina que comprende una secuencia de región variable codificada por un segmento génico de región V presente en el transgén de región V y una región C codificada en el transgén de Ig humana. Por medio del método de expansión de repertorio V, pueden generarse ratones transgénicos que tienen al menos 5 genes V distintos; como pueden generarse ratones que contienen al menos aproximadamente 24 genes V o más. Algunos segmentos de gen V pueden ser no funcionales (por ejemplo, pseudogenes y similares); estos segmentos pueden conservarse o pueden delecionarse selectivamente mediante métodos recombinantes disponibles para el experto en la técnica, si se desea.

20
25
30

Una vez que se ha modificado mediante ingeniería genética la línea germinal de ratón para que contenga un YAC funcional que tiene un repertorio de segmentos V expandido, sustancialmente no presente en el transgén de Ig humana que contiene los segmentos génicos J y C, puede propagarse el rasgo y cruzarse en otros contextos genéticos, incluyendo contextos en los que se cruza el YAC funcional que tiene un repertorio de segmentos V expandido en una línea germinal de ratón que tiene un transgén de Ig humana diferente. Pueden cruzarse múltiples YAC funcionales que tienen un repertorio de segmentos V expandido en una línea germinal para actuar con un transgén de Ig humana (o múltiples transgenes de Ig humana). Aunque se denominan en el presente documento transgenes de YAC, tales transgenes cuando se integran en el genoma pueden carecer sustancialmente de secuencias de levadura, tales como secuencias requeridas para la replicación autónoma en levaduras; tales secuencias pueden eliminarse opcionalmente mediante ingeniería genética (por ejemplo, digestión de restricción y electroforesis en gel de campo pulsado u otro método adecuado) tras la replicación en levaduras ya no es necesario (es decir, antes de la introducción en una célula ES de ratón o procigoto de ratón). Los métodos de propagación del rasgo de expresión de inmunoglobulina de secuencia humana, incluyen cruzar un ratón transgénico que tiene el/los transgén/transgenes de Ig humana, y opcionalmente que tiene también un YAC funcional que tiene un repertorio de segmentos V expandido. Ambos segmentos de genes V_H y V_L pueden no estar presentes en el YAC. El ratón transgénico puede cruzarse en cualquier contexto deseado por el profesional, incluyendo contextos que albergan otros transgenes humanos, incluyendo transgenes de Ig humana y/o transgenes que codifican para otras proteínas de linfocitos humanos. La invención también proporciona una inmunoglobulina de secuencia humana de alta afinidad producida por un ratón transgénico que tiene un transgén de YAC de repertorio de regiones V expandido. Aunque lo anterior describe un animal transgénico preferido, se contemplan otros que se han clasificado en cuatro categorías:

35
40
45
50

I. Animales transgénicos que contienen un transgén de inmunoglobulina de cadena pesada reorganizada y cadena ligera reorganizada;

55

II. Animales transgénicos que contienen un transgén de inmunoglobulina de cadena pesada no reorganizada y cadena ligera no reorganizada;

60 III. Animal transgénico que contienen un transgén de inmunoglobulina de cadena pesada reorganizada y cadena ligera no reorganizada; y

IV. Animales transgénicos que contienen transgenes de inmunoglobulina de cadena pesada reorganizada y cadena ligera reorganizada.

65

De estas categorías de animal transgénico, el orden de preferencia preferido es tal como sigue II > I > III > IV en el

que los genes de cadena ligera endógenos (o al menos el gene K) se han desactivado mediante recombinación homóloga (u otro método) y I > II > III > IV en los que los genes de cadena ligera endógenos no se han desactivado y deben dominarse mediante exclusión alélica.

5 III. Conjugados de anticuerpo/inmunotoxinas

También se da a conocer en el presente documento un anticuerpo monoclonal anti-VHC humano conjugado a un resto terapéutico, tal como una citotoxina, un fármaco (por ejemplo, un inmunosupresor) o un radioisótopo. Cuando se conjugan a una citotoxina, estos conjugados de anticuerpo se denominan "inmunotoxinas". Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que es perjudicial para (por ejemplo, destruye) células. Los ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxiantracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil-decarbазina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa-clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfano, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina-platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC)), y agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina y vinblastina). Un anticuerpo de la presente invención puede conjugarse a un radioisótopo, por ejemplo, yodo radiactivo, para generar productos radiofarmacéuticos citotóxicos para tratar un trastorno relacionado con VHC, tal como un cáncer.

Los conjugados de anticuerpo pueden usarse para modificar una respuesta biológica dada. El resto terapéutico no ha de considerarse que está limitado a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto de fármaco puede ser una proteína o un polipéptido que presenta una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa, o fragmento activo de la misma, tal como abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas*, o toxina diftérica; una proteína tal como factor de necrosis tumoral o interferón- γ ; o, modificadores de la respuesta biológica tales como, por ejemplo, linfocinas, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos ("GM-CSF"), factor estimulante de colonias de granulocitos ("G-CSF"), u otras citocinas o factores de crecimiento.

Se conocen bien técnicas para conjugar tal resto terapéutico a anticuerpos, véanse, por ejemplo, Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld *et al.* (eds.), págs. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", in *Controlled Drug Delivery (2ª Ed.)*, Robinson *et al.* (eds.), págs. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera *et al.* (eds.), págs. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin *et al.* (eds.), págs. 303-16 (Academic Press 1985), y Thorpe *et al.*, "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol Rev.*, 62:119-58 (1982).

IV. Composiciones farmacéuticas

45 En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que contiene uno o una combinación de anticuerpos monoclonales humanos, o parte(s) de unión a antígeno de los mismos, de la presente invención, formulados junto con un portador farmacéuticamente aceptable. En una realización preferida, las composiciones incluyen una combinación de múltiples (por ejemplo, dos o más) anticuerpos humanos aislados de la invención. Preferiblemente, cada uno de los anticuerpos de la composición se une a un epítipo de VHC preseleccionado, distinto.

Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden administrarse en terapia de combinación, es decir, combinadas con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir una composición de la presente invención con al menos uno o más agentes terapéuticos adicionales, tales como agentes antiinflamatorios, FAME (fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad), agentes inmunosupresores, agentes quimioterápicos y agentes contra la psoriasis. Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden administrarse junto con radioterapia. La coadministración con otros anticuerpos, tales como anticuerpos específicos de CD4 y anticuerpos específicos de IL-2, también se abarca por la invención. Tales combinaciones con anticuerpos específicos de CD4 o anticuerpos específicos de IL-2 se consideran particularmente útiles para tratar enfermedades autoinmunitarias y rechazos de trasplantes.

Tal como se usa en el presente documento, "portador farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes de retardo de la absorción e isotónicos, y similares que son fisiológicamente compatibles. Preferiblemente, el portador es adecuado para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, mediante inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo, es decir, anticuerpo,

molécula biespecífica y multiespecífica, puede recubrirse en un material para proteger el compuesto frente a la acción de ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.

5 Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que conserva la actividad biológica deseada del compuesto original y no confiere ningún efecto toxicológico no deseado (véase por ejemplo, Berge, S.M., *et al.* (1977) *J. Pharm. Sci.* 66:1-19). Los ejemplos de tales sales incluyen sales de adición de ácidos y sales de adición de bases. Las sales de adición de ácidos incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como clorhídrico, nítrico, fosfórico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso y similares, así como de ácidos orgánicos no tóxicos
10 tales como ácidos mono- y dicarboxílicos alifáticos, ácidos alcanóicos fenilsustituídos, ácidos hidroxialcanoicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos y similares. Las sales de adición de bases incluyen las derivadas de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, así como de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenciletildiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaína y similares.

15 Una composición de la presente invención pueden administrarse mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica. Tal como apreciará el experto en la técnica, la vía y/o el modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. Los compuestos activos pueden prepararse con portadores que protegerán el compuesto frente a una liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de administración microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables,
20 biocompatibles, tales como etileno-acetato de vinilo, polianhídridos, poli(ácido glicólico), colágeno, poliortoésteres y poli(ácido láctico). Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones están patentados o los conocen generalmente los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

25 Para administrar un compuesto de la invención por determinadas vías de administración, puede ser necesario recubrir el compuesto con, o coadministrar el compuesto con, un material para impedir su inactivación. Por ejemplo, el compuesto puede administrarse a un sujeto en un portador apropiado, por ejemplo, liposomas, o un diluyente. Los diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen solución salina y disoluciones de tampón acuosas. Los liposomas incluyen emulsiones CGF de agua en aceite en agua así como liposomas convencionales (Strejan *et al.* (1984) *J.*
30 *Neuroimmunol.* 7:27).

Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de tales
35 medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso de los mismos en las composiciones farmacéuticas de la invención. También pueden incorporarse compuestos activos complementarios en las composiciones.

40 Las composiciones terapéuticas normalmente deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse como una disolución, microemulsión, liposoma, u otra estructura ordenada adecuada para la alta concentración de fármaco. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. Puede mantenerse la fluidez apropiada, por ejemplo,
45 mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. Puede provocarse la absorción prolongada de las composiciones inyectables mediante la inclusión en la composición un agente que retarde la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

50 Pueden prepararse disoluciones inyectables estériles mediante la incorporación del compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de componentes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por microfiltración. Generalmente, se preparan dispersiones mediante la incorporación del compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los demás
55 componentes requeridos de los enumerados anteriormente. 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 de una disolución esterilizada por filtración previamente del mismo.

60 Se ajustan los regímenes de dosificación para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, puede administrarse un único bolo, pueden administrarse varias dosis divididas a lo largo del tiempo o puede reducirse o aumentarse de manera proporcional tal como esté indicado por las exigencias de la situación terapéutica. Por ejemplo, los anticuerpos humanos de la invención pueden administrarse una vez o dos a la semana mediante inyección subcutánea o una vez o dos al mes mediante inyección subcutánea.

65 Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma unitaria de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. Forma unitaria de dosificación tal como se usa en el presente

documento se refiere a unidades físicamente diferenciadas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos que van a tratarse; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. Las especificaciones para las formas unitarias de dosificación de la invención están dictadas por y dependen directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que haya que lograrse, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de composición de un compuesto activo de este tipo para el tratamiento de sensibilidad en individuos.

Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol, y similares; y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, y similares.

Para las composiciones terapéuticas, las formulaciones de la presente invención incluyen las adecuadas para la administración oral, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), rectal, vaginal y/o parenteral. Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante cualquier método conocido en la técnica de la farmacia. La cantidad de principio activo que puede combinarse con un material portador para producir una única forma de dosificación variará dependiendo del sujeto que esté tratándose, y del modo de administración particular. La cantidad de principio activo que puede combinarse con un material portador para producir una única forma de dosificación será generalmente aquella cantidad de la composición que produce un efecto terapéutico. Generalmente, del cien por cien, esta cantidad oscilará entre aproximadamente el 0,001 por ciento y aproximadamente el noventa por ciento de principio activo, preferiblemente entre aproximadamente el 0,005 por ciento y aproximadamente el 70 por ciento, lo más preferiblemente entre aproximadamente el 0,01 por ciento y aproximadamente el 30 por ciento.

Las formulaciones de la presente invención que son adecuadas para la administración vaginal también incluyen óvulos, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones de pulverización que contienen tales portadores según se conocen en la técnica que son apropiados. Las formas de dosificación para la administración tópica o transdérmica de composiciones de esta invención incluyen polvos, pulverizaciones, pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, disoluciones, parches e inhalantes. El compuesto activo puede mezclarse en condiciones estériles con un portador farmacéuticamente aceptable, y con cualquier conservante, tampón o propelente que pueda requerirse.

Las expresiones "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral" tal como se usan en el presente documento significan modos de administración distintos a la administración enteral y tópica, habitualmente mediante inyección, e incluyen, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal.

Los ejemplos de portadores acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Puede mantenerse la fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectante, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. Puede garantizarse que se impide la presencia de microorganismos tanto mediante procedimientos de esterilización, citados anteriormente, como mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol ácido sórbico, y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio, y similares en las composiciones. Además, puede provocarse la absorción prolongada de las composiciones inyectables mediante la inclusión en la composición un agente que retarde la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Cuando los compuestos de la presente invención se administran como productos farmacéuticos, a seres humanos y animales, pueden administrarse solos o como una composición farmacéutica que contiene, por ejemplo, del 0,001 al 90% (más preferiblemente, del 0,005 al 70%, tal como del 0,01 al 30%) de principio activo en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable.

Independientemente de la vía de administración seleccionada, los compuestos de la presente invención, que pueden usarse en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica.

Los niveles reales de dosificación de los principios activos en las composiciones farmacéuticas de la presente

invencción pueden variarse de modo que se obtenga una cantidad del principio activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, una composición y un modo de administración particulares, sin ser tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos incluyendo la actividad de las composiciones particulares de la presente invencción empleadas, o el éster, la sal o amida de las mismas, la vía de administración, el momento de administración, la tasa de excreción del compuesto particular que esté empleándose, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, el sexo, el peso, el estado, la salud general y la historia médica previa del paciente que esté tratándose, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. Un médico o veterinario que tiene las habilidades habituales en la técnica puede determinar fácilmente y prescribir la cantidad eficaz de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el médico o veterinario puede iniciar el tratamiento con dosis de los compuestos de la invencción empleados en la composición farmacéutica a niveles menores que los requeridos con el fin de lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se logra el efecto deseado. En general, una dosis diaria adecuada de una composición de la invencción será aquella cantidad del compuesto que es la menor dosis eficaz para producir un efecto terapéutico. Una dosis eficaz de este tipo dependerá generalmente de los factores descritos anteriormente. Se prefiere que la administración sea intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea, preferiblemente administrada cerca del sitio de la diana. Si se desea la dosis diaria eficaz de una composición terapéutica puede administrarse como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis administradas por separado a intervalos apropiados a lo largo de todo el día, opcionalmente, en formas de dosificación unitarias. Aunque es posible que un compuesto de la presente invencción se administre solo, es preferible administrar el compuesto como una formulación (composición) farmacéutica.

Pueden administrarse composiciones terapéuticas con dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización preferida, una composición terapéutica de la invencción puede administrarse con un dispositivo de inyección hipodérmica sin agujas, tal como los dispositivos dados a conocer en las patentes estadounidenses n.ºs 5.399.163, 5.383.851, 5.312.335, 5.064.413, 4.941.880, 4.790.824 ó 4.596.556. Los ejemplos de implantes y módulos bien conocidos útiles en la presente invencción incluyen: la patente estadounidense n.º 4.487.603, que da a conocer una bomba de microinfusión implantable para dispensar medicación a una velocidad controlada; la patente estadounidense n.º 4.486.194, que da a conocer un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; la patente estadounidense n.º 4.447.233, que da a conocer una bomba de infusión de medicación para suministrar medicación a una velocidad de infusión precisa; la patente estadounidense n.º 4.447.224, que da a conocer un aparato de infusión implantable de flujo variable para el suministro continuo de fármaco; la patente estadounidense n.º 4.439.196, que da a conocer un sistema de administración de fármacos osmótico que tiene compartimentos de múltiples cámaras; y la patente estadounidense n.º 4.475.196, que da a conocer un sistema de administración de fármacos osmótico. Muchos otros de tales implantes, sistemas de administración y módulos los conocen los expertos en la técnica.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos monoclonales humanos de la invencción pueden formularse para garantizar la distribución apropiada *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BHE) excluye muchos compuestos altamente hidrófilos. Para garantizar que los compuestos terapéuticos de la invencción atraviesan la BHE (si se desea), pueden formularse, por ejemplo, en liposomas. Para métodos de fabricación de liposomas, véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses 4.522.811; 5.374.548; y 5.399.331. Los liposomas pueden comprender uno o más restos que se transportan selectivamente al interior de células u órganos específicos, potencian así la administración de fármacos dirigida (véase, por ejemplo, V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685). Los restos de direccionamiento a modo de ejemplo incluyen folato o biotina (véanse, por ejemplo, la patente estadounidense 5.416.016 concedida a Low *et al.*); manósidos (Umezawa *et al.*, (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038); anticuerpos (P.G. Bloeman *et al.* (1995) *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais *et al.* (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180); receptor de proteína A del surfactante (Briscoe *et al.* (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134), pudiendo las formulaciones de las invencciones comprender diferentes especies ellas, así como componentes de las moléculas de la invencción; p120 (Schreier *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090); véanse también K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; J.J. Killion; I.J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273. En una realización de la invencción, los compuestos terapéuticos de la invencción se formulan en liposomas; en una realización más preferida los liposomas incluyen un resto de direccionamiento. En la realización más preferida, los compuestos terapéuticos en los liposomas se suministran mediante inyección en bolo a un sitio próximo al tumor o la infección. La composición debe ser fluida en la medida en que exista una fácil capacidad de inyección. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos.

Una "dosificación terapéuticamente eficaz" para artritis reumatoide dará preferiblemente como resultado una definición preliminar ACR20 de mejora en los pacientes, más preferido una definición preliminar ACR50 de mejora y incluso más preferido una definición preliminar ARCD70 de mejora.

La definición preliminar ACR20 de mejora se define como:

una mejora $\geq 20\%$ en: el número de articulaciones dolorosas (NAD) y el número de articulaciones inflamadas (NAI)

y una mejora $\geq 20\%$ en 3 de las siguientes 5 evaluaciones: evaluación del dolor por el paciente (VAS), evaluación global por el paciente (VAS), evaluación global del médico (VAS), incapacidad evaluada por el propio paciente (HAQ), proteína de fase aguda (CRP o ESR).

- 5 ACR50 y ACR70 se definen de la misma manera con mejoras $\geq 50\%$ y $\geq 70\%$, respectivamente. Para más detalles véase Felson *et al.* en American College of Rheumatology Preliminary Definition of Improvement in Rheumatoid Arthritis; Arthritis Rheumatism (1995) 38: 727-735.

10 La capacidad de un compuesto para inhibir el cáncer puede evaluarse en un sistema de modelo de animal predictivo de la eficacia en tumores humanos. Alternativamente, esta propiedad de una composición puede evaluarse mediante el examen de la capacidad del compuesto para inhibir, tal inhibición *in vitro*, mediante ensayos conocidos por el profesional experto. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico puede disminuir el tamaño del tumor, o mejorar de otro modo los síntomas en un sujeto. Un experto habitual en la técnica podría determinar tales cantidades basándose en factores tales como la talla del sujeto, la intensidad de los síntomas del
15 sujeto y la composición o vía de administración particular seleccionada.

La capacidad de los anticuerpos para tratar o prevenir la cirrosis también puede evaluarse según métodos bien conocidos en la técnica.

20 La composición debe ser estéril y fluida en la medida en que la composición puede administrarse mediante jeringa. Además de agua, el portador puede ser una solución salina tamponada isotónica, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. Puede mantenerse la fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, es
25 preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol o sorbitol y cloruro de sodio en la composición. Puede provocarse la absorción a largo plazo de las composiciones inyectables mediante la inclusión en la composición un agente que retarda la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio o gelatina.

30 Cuando el compuesto activo está protegido adecuadamente, tal como se describió anteriormente, el compuesto puede administrarse por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o un portador comestible asimilable.

V. Usos y métodos de la invención

35 Los anticuerpos anti-VHC humanos frente a VHC de la presente invención (incluyendo derivados y conjugados de los anticuerpos) y las composiciones que contienen los anticuerpos pueden usarse en una variedad de aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales humanos de la invención pueden usarse para tratar trastornos mediados por VHC, incluyendo pero sin limitarse a, trastornos hepáticos, tales como cirrosis, carcinoma hepatocelular y hepatocarcinogénesis.

40 Por consiguiente, aún en otra realización, la presente invención proporciona un método para tratar o prevenir un trastorno mediado por VHC (por ejemplo, un trastorno hepático), mediante la administración a un sujeto de un anticuerpo humano de la invención en una cantidad eficaz para tratar o prevenir el trastorno. El anticuerpo puede administrarse solo o junto con otro agente terapéutico, tal como alfa-IFN o una citotoxina que actúe junto con o de
45 manera sinérgica con el anticuerpo para tratar o prevenir la enfermedad mediada por VHC. Otros trastornos adecuados para el tratamiento usando los anticuerpos de la invención incluyen patologías de hepatocitos mediadas por VHC, cirrosis mediada por VHC del hígado y/o cáncer hepático mediado por VHC.

Adicionalmente, los anticuerpos de la invención pueden usarse *in vitro* o *in vivo* para diagnosticar una variedad de enfermedades mediadas por VHC. Específicamente, los anticuerpos pueden usarse para detectar los niveles de
50 VHC, o los niveles de células que contienen VHC. Alternativamente, los anticuerpos pueden usarse para inhibir o neutralizar la función de VHC lo que, a su vez, puede prevenir o mejorar síntomas de enfermedad producidos por la función de VHC.

También dentro del alcance de la presente invención se encuentran kits que comprenden anticuerpos anti-VHC
55 humanos de la invención y, opcionalmente, instrucciones para su uso. El kit puede contener además uno o más reactivos adicionales, tales como alfa-IFN o uno o más anticuerpos humanos de la invención adicionales (por ejemplo, un anticuerpo humano que tiene una actividad complementaria que se une a un epítipo de un antígeno de VHC distinto del primer anticuerpo humano).

60 Por consiguiente, a los pacientes tratados con anticuerpos de la invención se les puede administrar adicionalmente (antes de, de manera simultánea a, o tras la administración de un anticuerpo humano de la invención) otro agente terapéutico que potencia o aumenta el efecto terapéutico de los anticuerpos humanos.

Se describen otras realizaciones de la presente invención en los siguientes ejemplos.

65

Ejemplos

La invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrito en las reivindicaciones.

5 Materiales y métodos

En la totalidad de los ejemplos, se usaron los siguientes materiales y métodos a menos que se indique de otro modo.

10 En general, la práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique de otro modo, técnicas convencionales de química, biología molecular, tecnología de ADN recombinante, inmunología (especialmente, por ejemplo, tecnología de anticuerpos) y técnicas convencionales en la preparación de polipéptidos. Véanse, por ejemplo, Sambrook, Fritsch y Maniatis, *Molecular Cloning: Cold Spring Harbor Laboratory Press* (1989); *Antibody Engineering Protocols (Methods in Molecular Biology)*, 510, Paul, S., Humana Pr (1996); *Antibody Engineering: A Practical Approach (Practical Approach Series, 169)*, McCafferty, Ed., Irl Pr (1996); *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow *et al*, C.S.H.L. Press, Pub. (1999); y *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel *et al*, John Wiley & Sons (1992). Se describen sistemas de modelos *in vitro* e *in vivo* para someter a ensayo la biología de VHC, por ejemplo, en *Cell culture models and animal models of viral hepatitis. Part II: hepatitis C*, Lab. Anim. (NY).; 34(2): 39-47 (2005) y en *The chimpanzee model of hepatitis C virus infections*, ILAR J.;42(2): 117-26 (2001).

20 Ensamblaje del constructo de expresión de E1/E2 de genotipo 1a de VHC con codones optimizados

Brevemente, se construyó una secuencia de ácido nucleico que codifica para una secuencia de proteína E2, genotipo 1a, cepa H77 (secuencia de 1a prototipo) (número de registro Genbank NC004102) y se modificó mediante ingeniería genética en el vector pCDNA. Se alteró la secuencia de nucleótidos para un uso de codones optimizados para la expresión mejorada en mamíferos. Se ensambló la secuencia usando PCR solapante con oligonucleótidos adquiridos de DDT y clonados en el vector de expresión pCDNA3.1-myc, his con HindIII y XbaI en marco con myc y las colas de 6 histidinas C-terminales. Entonces se secuenció el vector para confirmar que el constructo era correcto.

30 La secuencia de 1a H77 optimizada para codones de E1/E2 con extremos añadidos que contenían sitios de restricción (letras en minúscula y negrita), proyecciones adicionales para garantizar el corte por la enzima de restricción (letras en minúscula y con subrayado) y secuencia consenso Kozak (letras en minúscula, en negrita y con subrayado) con codón de iniciación ATG (letras en mayúscula, en negrita y con subrayado) (véase SEQ ED NO: 27 y Figura 13).

35 Ensamblaje de constructo de expresión de E2-661 de genotipo 1a de VHC con codones optimizados para expresar proteína E2 soluble (pCDNA-1a-CO-E2-661)

40 Se amplificó por PCR la parte de la proteína E2 que codifica para los aminoácidos 364 a 661 usando pCDNA-1a-CO-E1/E2 como molde y se clonó en el vector de expresión pCDNA3.1-his con HindIII y XbaI en marco con la cola de 6 histidinas C-terminal. Se secuenció el vector para confirmar que el constructo era correcto.

Expresión y purificación de E2-661 de genotipo 1a de VHC con codones optimizados

45 Se transfectaron de manera transitoria células en cultivo celular humanas 293T usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Se recogió el sobrenadante de las células que contenían proteínas secretadas y se purificó 1a E2-661 del sobrenadante usando cromatografía de afinidad de níquel. Se determinó la concentración de proteína basándose en DO 280nm y se evaluó adicionalmente mediante SDS-PAGE con tinción de Coomassie e inmunotransferencia de tipo Western con anticuerpo de ratón frente a E2 disponible comercialmente de Biotools International.

50 Ensamblaje de vector de expresión de E1/E2 de genotipo 1a de VHC de tipo natural (pCDNA-1a-E1/E2)

55 Se amplificó por PCR la secuencia codificante de E1/E2 de VHC1a H77 (aminoácidos 165-746) con cebadores para introducir sitios de clonación HindIII y XbaI, una secuencia consenso Kozak y un codón de iniciación, y luego se clonó en el vector de expresión pCDNA3.1-his con HindIII y XbaI en marco con la cola de 6 histidinas C-terminal. Se secuenció el vector para confirmar que el constructo era correcto.

Ensamblaje de vector de expresión de E2-660 de genotipo 1a de VHC de tipo natural (pCDNA-1a-E2-660)

60 Se amplificó por PCR la parte de la proteína E2 que codifica para los aminoácidos 364 a 660 usando pCDNA-1a-E1/E2 como molde y se clonó en el vector de expresión pCDNA3.1-his con HindIII y XbaI en marco con la cola de 6 histidinas C-terminal. Se secuenció el vector para confirmar que el constructo era correcto.

65 Ensamblaje de vectores de expresión de E1/E2 de genotipo 1b, 2b, 3a y 4a de VHC (pCDNA-E1/E2)

Se obtuvo suero del paciente positivo para VHC de genotipo 1b, 2b, 3a y 4a de alto título y se aisló el ARN del

suero. Se realizó RT-PCR con el ARN aislado con cebadores específicos de genotipo complementarios al extremo del gen central y para el gen p7 que flanquea los genes E1/E2. Se usó PCR para amplificar la secuencia codificante de E1/E2 (aminoácidos 165-746) usando cebadores para introducir sitios de clonación HindIII y XbaI, una secuencia consenso Kozak y un codón de iniciación. Se clonó la secuencia en el vector de expresión pCDNA3.1-his con HindIII y XbaI en marco con la cola de 6 histidinas C-terminal y luego se secuenció. Una búsqueda Blast confirmó que las secuencias eran del genotipo esperado, pero las secuencias no tuvieron una coincidencia exacta en la base de datos.

Ensamblaje de vector de expresión de E2-661 de genotipo 1b de VHC (pCDNA-1b-E2-661)

Se usó PCR para amplificar la parte de la proteína E2 que codifica para los aminoácidos 364 a 661 usando pCDNA-1b-E1/E2 como molde. Luego se clonó la secuencia en el vector de expresión pCDNA3.1-his con HindIII y XbaI en marco con la cola de 6 histidinas C-terminal. Entonces se secuenció el vector para confirmar que el constructo era correcto. Se llevó a cabo la expresión y purificación esencialmente tal como se describió anteriormente para 1a E2-661.

Ensamblaje de vector de expresión de delección de HVR1 de E2 genotipo 1a de VHC

Para generar un constructo que codifica para E1/E2 con una delección de los nucleótidos que codifican para la región hipervariable 1 (HVR1) de E2, se amplificó por PCR E1 usando un cebador en 3' que contenía una proyección para una región de E2 que comienza con el aminoácido 411 (saltándose los aminoácidos 384 a 410-HVR1) usando pCDNA-1a-E1/E2 como molde. En una reacción independiente, se amplificó por PCR la región E2 que codifica para los aminoácidos 411-746 usando un cebador en 5' que contenía una proyección para el extremo 3' de E1 usando pCDNA-1a-E1/E2 como molde. Se mezclaron los productos de PCR de E1 y E2 que contenían proyecciones complementarias a la unión de E1-E2 sin la región que codifica para HVR1 para E2, y luego se amplificaron por PCR usando un cebador específico para el extremo 5' de E1 con un sitio HindIII y el extremo 3' de E2 con un sitio XbaI. Se clonó la secuencia en el vector de expresión pCDNA3.1-his con HindIII y XbaI en marco con la cola de 6 histidinas C-terminal. Entonces se secuenció el vector para confirmar que el constructo era correcto.

Ensamblaje de vectores de expresión de truncamiento de E2 de genotipo 1a de VHC con codones optimizados

Se produjeron mediante ingeniería genética truncamientos para la expresión en mamíferos en los que se eliminaron los aminoácidos desde el extremo C-terminal de E2. Se amplificó por PCR la parte de la proteína E2 que codifica para los aminoácidos deseados usando pCDNA-1a-CO-E1/E2 como molde y se clonó en el vector de expresión pCDNA3.1-his con HindIII y XbaI en marco con la cola de 6 histidinas C-terminal. Entonces se secuenció el vector para confirmar que el constructo era correcto. Se prepararon los siguientes constructos:

- pCDNA-1a-CO-E2-624 (aminoácidos de E2 384 a 624)
- pCDNA-1a-CO-E2-584 (aminoácidos de E2 384 a 584)
- pCDNA-1a-CO-E2-544 (aminoácidos de E2 384 a 544)
- pCDNA-1a-CO-E2-504 (aminoácidos de E2 384 a 504)
- pCDNA-1a-CO-E2-464 (aminoácidos de E2 384 a 464)

Se llevó a cabo la expresión y purificación de cada constructo esencialmente tal como se describió anteriormente para 1a E2-661.

ELISA de lectina

Se llevó a cabo ELISA de captura de lectina con los truncamientos de E2 para determinar la reactividad de los anticuerpos. Brevemente, se recubrieron placas de 96 pocillos con lectina de *Galanthus nivalis* (GNA). Se añadieron los truncamientos de E2 de los sobrenadantes de células 293 transfectadas de manera transitoria a las placas de 96 pocillos recubiertas con lectina de GNA para capturar la proteína. Entonces se añadió sobrenadante de hibridomas a las placas de 96 pocillos para determinar la reactividad de la proteína. Se detectó el anticuerpo unido con anticuerpo secundario anti-ser humano-fosfatasa alcalina y sustrato PNPP.

Ensamblaje de constructos de expresión bacterianos que abarcan los aminoácidos 384 a 464 de glicoproteína E2 de genotipo 1a de VHC

A continuación, se produjeron mediante ingeniería genética proteínas de fusión con fusión de tiorredoxina N-terminal para la expresión bacteriana con el fin de permitir la producción pequeñas partes de E2.

Para el primer conjunto de proteínas, se amplificó por PCR la parte de la proteína E2 que codifica para los

aminoácidos deseados usando pCDNA-1a-E1/E2 como molde y se clonó en el vector de expresión pET32 con EcoRI e HindIII en marco con myc y las colas de 6 histidinas C-terminales. Entonces se secuenció el vector para confirmar que el constructo era correcto. Se prepararon los siguientes constructos:

- 5 ○ pET32-E2-A (aminoácidos 384 a 463)
- pET32-E2-B (aminoácidos 411 a 463)
- pET32-E2-C (aminoácidos 432 a 463)
- 10 ○ pET32-E2-D (aminoácidos 436 a 463)
- pET32-E2-E (aminoácidos 384 a 431)

15 Se transformaron los vectores en bacterias *E. coli* BL21-DE3 (Invitrogen) y se indujo la expresión con IPTG. Se lisaron las bacterias y se purificaron las proteínas de interés con cromatografía de afinidad de níquel. Se determinó la concentración de proteína basándose en DO 280nm y se evaluó adicionalmente mediante SDS-PAGE con tinción de Coomassie e inmunotransferencia de tipo Western usando anticuerpo de ratón específico para myc y colas de histidina.

20 Para el segundo conjunto de proteínas, se prepararon oligonucleótidos fosforilados complementarios que, cuando se apareasen, tendrían proyecciones EcoRI e HindIII y codificarían para los aminoácidos deseados. Se clonó el ADN en el vector de expresión pET32 con EcoRI e HindIII en marco con myc y las colas de 6 histidinas C-terminales. Entonces se secuenció el vector para confirmar que el constructo era correcto. Se prepararon los siguientes constructos:

- 25 ○ pET32-E2-G (aminoácidos 412 a 423)
- pET32-E2-H (aminoácidos 432 a 443)
- 30 ○ pET32-E2-I (aminoácidos 436 a 447)

Se llevó a cabo la expresión y purificación tal como se describió anteriormente para el primer conjunto de proteínas.

35 Generación de mutantes por barrido de alanina del epítipo 412-423 de E2 de VHC

Se mutó por separado cada aminoácido en el epítipo 412-423 a una alanina en el constructo de expresión bacteriano para determinar los contactos de aminoácidos importantes para los anticuerpos. Se prepararon oligonucleótidos fosforilados complementarios que, cuando se apareasen, tendrían proyecciones EcoRI e HindIII y codificarían para la región 412-423 de E2 con los cambios deseados. Se clonó el ADN en el vector de expresión pET32 con EcoRI e HindIII en marco con myc y las colas de 6 histidinas C-terminales. Entonces se secuenció el vector para confirmar que el constructo era correcto.

Se prepararon los siguientes constructos:

- 45 ○ pET32-E2-G-Q412A (aminoácido 412 de Q a A)
- pET32-E2-G-L413A
- 50 ○ pET32-E2-G-I414A
- pET32-E2-G-N415A
- pET32-E2-G-T416A
- 55 ○ pET32-E2-G-N417A
- pET32-E2-G-G418A
- 60 ○ pET32-E2-G-S419A
- pET32-E2-G-W420A
- pET32-E2-G-H421A
- 65 ○ pET32-E2-G-1422A

- pET32-E2-G-N423A

Se llevó a cabo la expresión y purificación tal como se describió anteriormente para las otras proteínas bacterianas.

5

Generación de pseudovirus y ensayo de neutralización

Se generó un pseudovirus que tenía una estructura principal de VIH que contenía una mutación para impedir la expresión de la glicoproteína de la envuelta de VIH y un gen de luciferasa para dirigir la expresión de luciferasa en células diana (pNL4-3.Luc.R-E-). Se proporcionaron glicoproteínas E1/E2 de VHC en trans mediante cotransfección de células 293 con pcDNA E1/E2 derivadas de los diversos genotipos (1a, 1b, 2b, 3a y 4a) con pNL4-3.Luc.R-E-. Se recogió el sobrenadante que contenía partículas virales secretadas de las células de 48 a 72 h tras la transfección y se concentraron usando concentradores Centricon 70 y/o ultracentrifugación. Entonces se usó el pseudovirus para infectar células Hep3B (ATCC) en presencia o ausencia de anticuerpo. Se preincubó el pseudovirus durante 1 h a temperatura ambiente antes de añadirse a células Hep3B. Tras la incubación durante 72 h, se cuantificó la infección mediante la detección de luciferasa con el ensayo de luciferasa BrightGlo (Promega) y se leyó en un lector de placas Victor3 (Perkin Elmer)

10

15

Determinación de afinidad mediante Biacore

20

Se acopló mediante amida anticuerpo de cabra anti-IgG humana (Fc) a un chip de sensor CM5 de Biacore en las celdas de flujo 1 y 2. Se capturó el anticuerpo humano (95-2 ó 83-128) en la celda de flujo 2 usando sólo tampón HBS-P (Biacore). Se hizo fluir E2-G a lo largo tanto de la celda de flujo 1 (para el fondo) como la celda de flujo 2 (para la interacción específica con el anticuerpo humano) a 125, 62,5, 31,3, y 15,6 nM en tampón HBS-P a 50 ml/min durante 200 s. Tras detenerse la inyección, se hizo fluir tampón a lo largo de ambas celdas de flujo para recoger datos de disociación. Se evaluaron los datos y se ajustaron curvas para determinar la constante de afinidad usando el software BIAevaluation

25

Inmunizaciones de ratones

30

Se inmunizaron ratones transgénicos para genes de IgG humana (ratones HuMab) de Medarex con proteína E2 soluble para generar una respuesta inmunitaria. Se inmunizó el ratón 85083 con 1a E2-661 con adyuvante de Freund para 1 inyección y MPL + adyuvante TDM (Sigma) para 14 inyecciones. Se inmunizó el ratón 97895 con 1a E2-661 con MPL + TDM + adyuvante CWS (Sigma) para 1 inyección y MPL + adyuvante TDM para 5 inyecciones

35

Fusiones esplénicas y selección de hibridomas

Se extirparon los bazo de ratón y se aislaron las células de bazo. Se fusionaron las células de bazo a células de mieloma de ratón siguiendo un protocolo de fusión de PEG convencional para generar hibridomas. Entonces se examinaron los sobrenadantes de hibridomas para determinar la producción de anticuerpo reactivo frente a 1a E2-661 mediante ELISA y se avanzó con las células positivas para su caracterización adicional.

40

Aislamiento y secuenciación de genes de anticuerpos de hibridomas

Se aisló el ARN de células de hibridoma usando un kit RNeasy de Qiagen. Se realizó RT-PCR para la región variable de cadena pesada con cebadores específicos de gen que contenían sitios de restricción, se clonó la secuencia resultante y se secuenció el constructo. Se realizó RACE para la región variable de cadena ligera con cebadores específicos de gen. Se clonó la secuencia en el vector TOPO y se secuenció el vector. Se diseñaron cebadores específicos de gen y se usaron para amplificar por PCR y añadir sitios de restricción.

45

50

EJEMPLO 1: GENERACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-VHC MONOCLONALES

Inmunizaciones de ratones, producción y selección de hibridomas

Se inmunizaron ratones transgénicos que comprendían genes de inmunoglobulina humana generados tal como se describió anteriormente en la sección titulada "Generación de anticuerpos monoclonales humanos en ratones HuMab" y suministrados por Medarex, Milpitas, CA, con una versión soluble de la glicoproteína de la envuelta E2 de genotipo 1a de VHC. Se administró el antígeno en combinación con adyuvante completo de Freund o de RIBI. Se monitorizaron las respuestas de sueros de ratón mediante ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) frente a la proteína E2 soluble (1a E2-661). Se aislaron células B esplénicas del animal inmunizado y se fusionaron a células de mieloma de ratón (P3X-AG8.653) usando métodos de fusión de células de bazo convencionales. Se generaron hibridomas clonales y se examinaron usando ELISA para determinar la producción de anticuerpo reactivo frente a E2-661. Se sometieron a prueba los hibridomas positivos para determinar la reactividad equivalente a E2-661 de genotipo 1a y genotipo 1b de VHC mediante ELISA con cantidades decrecientes de sobrenadante de hibridoma. Se sometieron a prueba los hibridomas que mostraron reactividad equivalente a E2-661 de genotipo 1a y E2-661 de 1b para determinar la capacidad para neutralizar la infectividad de pseudovirus de VHC de células

55

60

65

Hep3B. Este proceso de selección produjo 20 hibridomas que neutralizaron pseudovirus de VHC y tenían reactividad equivalente a proteína E2 de 1a y 1b soluble mediante ELISA. Específicamente, diecinueve (19) hibridomas procedían del ratón n.º 97895 y produjeron anticuerpo IgG1 tal como sigue: 95-2; 95-14; 95-15; 95-18; 95-20; 95-21; 95-25; 95-26; 95-30; 95-38; 95-39; 95-42; 95-43; 95-48; 95-49; 95-52; 95-54; 95-58; y 95-62. También se identificó un (1) hibridoma, 83-128, que neutralizaba pseudovirus de VHC y tenía reactividad equivalente a proteína E2 de 1a y 1b soluble mediante ELISA a partir del ratón n.º 85083 y produjo anticuerpo IgG3. También se identificó un (1) hibridoma, 073-1, que neutralizaba pseudovirus de VHC y tenía reactividad equivalente a proteína E2 de 1a y 1b soluble mediante ELISA a partir del ratón n.º 113073 y produjo anticuerpo IgG3. Se caracterizaron adicionalmente estos veintiún (21) hibridomas.

Secuenciación y clonación de anticuerpos

Se secuenciaron las secuencias variables de cadena pesada y ligera de los anticuerpos humanos 83-128 (procedente del hibridoma del ratón n.º 85083) y 073-1 (procedente del hibridoma del ratón n.º 113073) y se clonaron en vectores que contenían las regiones constantes de cadena pesada y ligera para anticuerpo IgG1/kappa humana. Esto cambió los anticuerpos humanos 83-128 y 073-1 de un anticuerpo IgG3 a un anticuerpo IgG1.

Se secuenciaron las secuencias variables de cadena pesada de los anticuerpos humanos de los diecinueve (19) hibridomas del ratón n.º 97895 y se compararon. Se encontró que todos de los (19) anticuerpos compartían una identidad de secuencia sustancial (es decir, idénticas >96%). Se eligieron tres (3) hibridomas, 95-2, 95-14, y 95-38, basándose en los datos del ensayo de neutralización y se determinaron sus secuencias de región variable de cadena ligera. Se cloraron las secuencias de región variable de cadena pesada y ligera de los anticuerpos humanos 95-2, 95-14, y 95-38 en vectores que contenían las regiones constantes de cadena pesada y ligera para anticuerpo IgG1/kappa humana. Se expresó el anticuerpo mediante transfección transitoria, se purificó y se comparó directamente en un ensayo de neutralización de pseudovirus de VHC. Se seleccionó el anticuerpo humano 95-2 del ratón n.º 97895 para caracterizarse adicionalmente.

Las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de los anticuerpos producidos por los clones 95-14, 95-49, 95-62, 95-42, 95-58, 95-25, 95-43, 95-54, 95-2, 95-38, 83-128, 073-1 se exponen en SEQ ID NO:32, 37, 40, 35, 39, 34, 36, 38, 3, 33, 1 y 5 respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de los anticuerpos producidos por los clones 95-2, 95-14, 95-38, 073-1 y 83-128 se exponen en SEQ ID NO:4, 44, 53, 6 y 2, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos que codifican para la región variable de cadena pesada de los anticuerpos producidos por los clones 95-2, 95-14, 95-38, 073-1 y 83-128 se exponen en SEQ ID NO:27, 48, 57, 29 y 25, respectivamente; y las secuencias de nucleótidos que codifican para la región variable de cadena ligera de los anticuerpos producidos por los clones 95-2, 95-14, 95-38, 073-1 y 83-128 se exponen en SEQ ID NO:28, 49, 58, 30 y 26, respectivamente.

EJEMPLO 2: CARACTERIZACIÓN DE ANTICUERPOS

ELISA de E2 soluble de genotipo 1a y 1b de VHC

Se comparó la reactividad del anticuerpo humano 95-2 (figura 1A) y el anticuerpo humano 83-128 (figura 1B) frente a E2-660 de genotipo 1a de VHC soluble (triángulos) y E2-661 de genotipo 1b de VHC soluble (cuadrados). Se recubrieron placas de ELISA con 2 µg/ml de antígeno y se examinaron con sonda con anticuerpo en diluciones dobles. Se detectó el anticuerpo unido con anticuerpo secundario de cabra anti-ser humano conjugado a fosfatasa alcalina y sustrato PNPP. Se encontró que ambos anticuerpos humanos, 95-2 y 83-128 reaccionaban de manera equivalente frente a ambos genotipos (véase la figura 1). También se realizaron estos experimentos con los anticuerpos 95-14, 95-38 y 073-1 y los tres reconocieron el genotipo 1a y 1b de manera equivalente (datos no mostrados).

Neutralización de pseudovirus de VHC de múltiples genotipos

Se determinó la capacidad de los anticuerpos humanos 95-2 y 83-128 para neutralizar ambos genotipos múltiples de pseudovirus de VHC usando células Hep3B. Se incubaron diluciones de cinco veces del anticuerpo con pseudovirus de VHC durante una hora a temperatura ambiente. Se añadió la mezcla de virus-anticuerpo a células Hep3B seguido por incubación a 37°C durante 72 horas. Se cuantificó la infección con ensayo de luciferasa Brightglo y se leyó en un lector de placas Victor3 para determinar la emisión de luz. Se usó un anticuerpo humano irrelevante de isotipo coincidente como control negativo. Se encontró que ambos anticuerpos humanos, 95-2 y 83-128, neutralizaban pseudovirus de genotipos 1a, 1b, 2b, 3a y 4a de VHC (véanse las figuras 2A, 2B, 2C, 2D y 2E, respectivamente). También se mostró que el anticuerpo 073-1 neutralizaba todos los pseudovirus enumerados anteriormente (datos no mostrados).

Inmunotransferencias de tipo Western reductoras y no reductoras de proteína soluble E2 de genotipo 1a y 1b

Se analizó la reactividad de los anticuerpos humanos 95-2 y 83-128 frente a proteína E2 soluble (E2-661) de genotipo 1a y 1b de VHC sometidos a SDS-PAGE reductora o no reductora. Se realizaron las inmunotransferencias de tipo Western con los anticuerpos monoclonales anti-cola de his (his), 83-128 y 95-2 usando anticuerpo anti-IgG de ratón (his) o anti-IgG humana (95-2 y 83-128) conjugado a HRP con reactivo de detección quimioluminiscente mejorado. Se encontró que ambos anticuerpos humanos 95-2 y 83-128 reconocían E2-661 sometida a gel reductor, desnaturalizante seguido por transferencia a membrana de PVDF (véase la figura 3).

Afinidad de unión de los anticuerpos humanos 95-2 y 83-128 para el epítipo 412-423 de E2 expresado como una proteína de fusión bacteriana

Se determinó la afinidad de unión de los anticuerpos humanos 95-2 y 83-128 para el epítipo 412-423 de E2 expresado como una proteína de fusión bacteriana y se resume en la figura 4. Se acopló mediante amida el anticuerpo de cabra anti-Fc de IgG humana al chip Biacore. Se capturaron los anticuerpos humanos 95-2 y 83-128 por separado sobre el chip y se hizo fluir la proteína expresada en bacterias E2-G que contenía los aminoácidos 412-423 de E2 a concentraciones variables. Se usó el software BIAevaluation™ para ajustar las curvas y calcular las constantes de afinidad.

EJEMPLO 3: DETERMINACIÓN DE EPÍTOPOS

Determinación de qué región de la proteína E2 reconocen los anticuerpos humanos 83-128 y 95-2

Para determinar qué región de la proteína E2 reconocen los anticuerpos humanos 83-128 y 95-2, se capturaron truncamientos carboxi-terminales de la proteína E2 expresada en mamífero mediante ELISA de lectina y se examinaron con sonda con 83-128 y 95-2 (véase la figura 5 para el mapa de constructos y la figura 6 para los datos de ELISA). Basándose en los datos, el epítipo para estos anticuerpos está dentro de los aminoácidos 412-464 de E2. Tal como se esperaba, todos los anticuerpos (95-14, 95-49, 95-62, 95-42, 95-58, 95-25, 95-43, 95-54, 95-2, 95-38 y 073-1) también se mapearon en esta región de la proteína E2.

Para definir adicionalmente el epítipo, se usó proteína de fusión expresada en bacterias porque los trozos más pequeños de E2 no se expresaban bien en el sistema de mamífero. Se recubrieron las proteínas purificadas sobre una placa de ELISA y se examinaron con sonda con los anticuerpos humanos 83-128 y 95-2 (véase la figura 7 para el mapa de constructos y la figura 8 para los datos de ELISA). Ambos anticuerpos humanos 83-128 y 95-2 reconocieron todos los constructos que contenían los aminoácidos 412-423 de E2, identificándose así los aminoácidos 412-423 como el epítipo. También se realizó este experimento usando el anticuerpo 073-1 y también reconoció el epítipo 412-423 (datos no mostrados).

Para determinar los contactos importantes dentro del epítipo 412-423, se usó mutagénesis por barrido de alanina para cambiar individualmente cada aminoácido en el epítipo 412-423 a una alanina en la proteína de fusión bacteriana E2-G. Se recubrieron las proteínas purificadas sobre una placa de ELISA y se examinaron con sonda con ambos anticuerpos humanos (83-128 y 95-2). Se usó un anticuerpo monoclonal anti-his específico para la cola epitópica de (His)₆ en las proteínas de fusión para controlar el recubrimiento de la placa (véase la figura 9). Basándose en los datos, se encontró que los residuos 413 y 420 eran críticos para la unión para el anticuerpo humano 95-2; se encontró que los residuos 413, 418 y 420 eran críticos para la unión para el anticuerpo humano 83-128.

Para determinar la frecuencia de cambios que se producen de manera natural dentro del epítipo 412-423, se analizó esta región de E2 para determinar las secuencias notificadas en la base de datos de secuencias de VHC de Los Alamos que se condensaron mediante optimización manual sólo con secuencias completas y secuencias similares reducidas a una secuencia. Basándose en la alineación (figura 10), el 77,7% de las secuencias en la base de datos condensada son idénticas a las secuencias en esta región de las proteínas E2 expresadas 1a y 1b usadas en los presentes ejemplos. Por consiguiente, los anticuerpos humanos 95-2 y 83-128 deben reconocer estas proteínas.

Para determinar si algunas de las diferencias de secuencia notificadas en esta región afectarán al reconocimiento de los anticuerpos humanos 95-2 y 83-128, se produjeron mediante ingeniería genética cambios de secuencia en la proteína de fusión expresada en bacterias E2-G que contenía el epítipo 412-423 (figura 11). Se incluyó una secuencia de una cepa de genotipo 5 notificada en Tarr *et al.* (2006) Hepatology (número de registro Genbank AY785283) que no estaba en la base de datos. Se recubrieron las proteínas purificadas sobre una placa de ELISA que se examinó con sonda con ambos anticuerpos (83-128 y 95-2). Se usó un anticuerpo monoclonal anti-his específico para la cola de his en las proteínas de fusión para controlar el recubrimiento de la placa (figura 12). El anticuerpo humano 95-2 reconoció todos los constructos, con la excepción del genotipo 6a, con una reducción de 10 veces en esta secuencia de genotipo 5 específica. El anticuerpo humano 83-128 reconoció todos los constructos, excepto los derivados de secuencias de genotipo 5 y 6a específicas, y tuvo un débil reconocimiento de 5a.

EJEMPLO 4: MODELO IN VITRO

Se someten a prueba anticuerpos humanos de la presente invención en modelos *in vitro* para determinar la actividad antiviral y para determinar la capacidad para inhibir una infección por VHC. Se conocen numerosos modelos *in vitro* para una infección por VHC en la técnica y se usan para someter a prueba los anticuerpos humanos de la presente invención, incluyendo, por ejemplo, (i) infección de hepatocitos primarios con VHC; (ii) transfección estable de líneas celulares de hepatocitos; y (iii) transfección con replicones de cadena completa o subgenómicos, tal como se describe, por ejemplo, en C. Guha *et al.* ("Cell culture models and animal models of viral hepatitis. Part II: hepatitis C" Lab Animal (NY) 2005, 34(2):39-47). Se exponen las células cultivadas en estos modelos *in vitro* a anticuerpos humanos de la presente invención, o a anticuerpos control apropiados, y se monitorizan el efecto de los anticuerpos sobre una infección por VHC y la actividad viral usando técnicas convencionales conocidas en la técnica, por ejemplo, mediante la detección de ARN viral de VHC, por ejemplo, usando transcripción inversa en tiempo real, cuantitativa/reacción en cadena de la polimerasa (RT/PCR).

EJEMPLO 5: MODELO ANIMAL *IN VIVO*

Se someten a prueba anticuerpos humanos de la presente invención en un modelo animal *in vivo* para determinar la capacidad para inhibir la infección viral de hepatitis C. En particular, se someten a prueba los anticuerpos humanos de la presente invención en un modelo animal de chimpancé tal como se describe en R. E. Lanford *et al.* (ILAR J. 2001;42(2):117-26). Tal como se describe en Lanford *et al.*, el chimpancé (*Pan troglodytes*) es el único animal de experimentación susceptible a la infección con el virus de la hepatitis C (VHC) y fue fundamental en los estudios iniciales de la hepatitis no A, no B, incluyendo observaciones sobre la evolución clínica de la infección, la determinación de las propiedades físicas del virus y la clonación eventual del ácido nucleico de VHC. El modelo de chimpancé ha resultado crítico para el análisis de acontecimientos tempranos en una infección por VHC porque representa una población para la que se dispone de muestras desde el momento de la exposición y se examinan todos los animales expuestos. Por este motivo, el chimpancé representa una población verdaderamente no seleccionada. En cambio, las cohortes humanas se seleccionan a menudo para un estado de enfermedad o la reactividad de los anticuerpos y normalmente incluyen individuos que han estado infectados durante décadas. El modelo de chimpancé es esencial para un entendimiento mejorado de los factores implicados en la eliminación viral, el análisis de la respuesta inmunitaria a la infección, y el desarrollo de vacunas. El desarrollo de clones de ADNc infecciosos de VHC dependía del uso de chimpancés, y seguirán siendo necesarios en el uso de genética inversa para evaluar las secuencias críticas para la replicación viral. Además, se han usado chimpancés junto con la tecnología de microalineamientos de ADN para analizar con sonda todo el espectro de cambios en la expresión génica hepática durante la evolución de una infección por VHC. El chimpancé seguirá proporcionando un aspecto crítico para el entendimiento de la enfermedad por VHC y el desarrollo de modalidades terapéuticas.

Por consiguiente, se inoculan chimpancés con VHC y se les administra adicionalmente un anticuerpo humano de la presente invención. Se les inocula VHC a los animales control y o bien no se les administra un anticuerpo humano de la presente invención o bien se les administra un anticuerpo control apropiado. Se administran anticuerpos humanos de la invención a chimpancés o bien antes de la inoculación de VHC, o bien en el momento de la inoculación de VHC o bien de manera posterior a la inoculación de VHC. Entonces se monitorizan los efectos del anticuerpo humano sobre la infección, la progresión y la eliminación de VHC usando ensayos convencionales en la técnica. Por ejemplo, puede monitorizarse la infección y/o la eliminación de VHC mediante: (i) medir los aumentos en los niveles en suero de alanina amino transferasa (ALT), que indican daño hepático; (ii) detectar ARN viral de VHC en suero mediante, por ejemplo, transcripción inversa en tiempo real, cuantitativa/reacción en cadena de la polimerasa (RT/PCR); y (iii) evaluar la respuesta de anticuerpos anti-VHC, por ejemplo, mediante ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas y de inmunotransferencia recombinante. Los expertos habituales en la técnica conocen estos ensayos y se llevan a cabo, por ejemplo, tal como se describe en Lanford *et al.* Adicionalmente, en experimentos similares a los descritos anteriormente, se evalúan los efectos de los anticuerpos de la invención sobre la respuesta frente a las proteínas E1 y/o E2 de VHC, por ejemplo, tal como se describe en Lanford *et al.* La modulación por disminución de una infección por VHC, una disminución en la progresión de VHC o un aumento en la eliminación de VHC en los animales expuestos a un anticuerpo humano de la invención, en comparación con animales control, es indicativa de la eficacia del anticuerpo para prevenir o tratar una infección por VHC.

Adicionalmente, se usan microalineamientos de ADN para monitorizar los efectos de los anticuerpos humanos de la invención sobre los cambios progresivos en una infección por VHC en el chimpancé mediante la monitorización de los cambios en la expresión génica en el hígado de animales infectados en múltiples puntos de tiempo durante la fase aguda de la infección y a través de eliminación viral. Se lleva a cabo el análisis de microalineamientos de ADN en tejido hepático obtenido antes de la infección y en múltiples puntos de tiempo durante toda la infección y eliminación, por ejemplo, hasta la semana 16 tras la infección, en animales expuestos al anticuerpo y en animales control no expuestos a anticuerpo. Pueden llevarse a cabo estos estudios, por ejemplo, con el microalineamiento de ADN Affymetrix Human FL, que contiene oligonucleótidos representativos de aproximadamente 6800 genes, esencialmente tal como se describe en Lanford *et al.*

EJEMPLO 6: PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-VHC PARA LA ADMINISTRACIÓN EN SERES HUMANOS

Los anticuerpos humanos de la presente invención pueden clonarse y expresarse de manera recombinante para facilitar o aumentar su producción usando técnicas conocidas.

Pueden clonarse secuencias de ácido nucleico que codifican para las cadenas pesadas y cadenas ligeras variables de un clon de anticuerpo de la invención en un vector pIE-Ugamma1F usando metodología de ADN recombinante convencional. Se amplifica el vector en *E. coli*, se purifica y se transfecta en células CHO. Se siembran en placa las células transfectadas a 4×10^5 células por pocillo en una placa de 96 pocillos y se seleccionan para la transfección en vector con G418. Entonces se someten a ensayo los clones resistentes seleccionados mediante la resistencia a G418, junto con otros transfectomas para la producción de IgG. Puede amplificarse la expresión de un anticuerpo mediante crecimiento en presencia de concentraciones crecientes de metotrexato. Se elige un cultivo que puede crecer en metotrexato 175 nM para clonar células individuales para el desarrollo posterior. La colocación del cultivo en placas de 96 pocillos a baja densidad permitió la generación de cultivos que surgen a partir de una célula individual o clones. Se examinan los cultivos para determinar la producción de IgG. Puede amplificarse la expresión de un anticuerpo mediante crecimiento en presencia de concentraciones crecientes de metotrexato. Se elige un cultivo que puede crecer en metotrexato 175 nM para clonar células individuales para el desarrollo posterior. La colocación del cultivo en placas de 96 pocillos a baja densidad permitió la generación de cultivos que surgen a partir de una célula individual o clones.. Se examinan los cultivos para determinar la producción de IgG, y normalmente se selecciona la célula que produce el mayor nivel de IgG para su uso adicional. Se expande el clon amplificado en metotrexato para producir un banco de células que incluye múltiples viales congelados de células. Alternativamente, pueden usarse vectores de glutamina sintetasa (GS) lográndose la selección celular usando, por ejemplo, metionina-sulfoximina (véase, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.^{os} 5.827.739; 5.122.464; 5.879.936; y 5.891.693).

Para preparar anticuerpos a partir de células transfectadas, se cultivan células procedentes de un clon aislado en las etapas anteriores y se expanden como inóculo para un biorreactor. El biorreactor contiene normalmente un volumen de 500 litros de medio de cultivo. Se cultivan las células en el biorreactor hasta que disminuye la viabilidad celular, lo que indica que se ha producido una concentración de anticuerpo máxima en el cultivo. Se retiran las células mediante filtración. Se aplica el filtrado a una columna de proteína A. Se unen los anticuerpos a la columna, y se eluyen con un lavado a bajo pH. A continuación, se aplican los anticuerpos a una columna de Q-Sepharose para eliminar los contaminantes residuales, tales como proteínas de células CHO, ADN, y otros contaminantes (por ejemplo, contaminantes virales, si están presentes). Se eluyen los anticuerpos de la columna de Q-Sepharose, se someten a nanofiltración, se concentran y se lavan en un tampón tal como PBS. Entonces se toman de manera aséptica alícuotas de la preparación y se introducen en viales para la administración.

Resumen de la lista de secuencias

SEQ ID NO.	Tipo	Descripción de secuencia
1	AA	VH del clon 83-128
2	AA	VL del clon 83-128
3	AA	VH del clon 95-2
4	AA	VL del clon 95-2
5	AA	VH del clon 073-1
6	AA	VL del clon 073-1
7	AA	CDR1 de VH del clon 83-128
8	AA	CDR2 de VH del clon 83-128
9	AA	CDR3 de VH del clon 83-128
10	AA	CDR1 de VH del clon 95-2
11	AA	CDR2 de VH del clon 95-2
12	AA	CDR3 de VH del clon 95-2
13	AA	CDR1 de VH del clon 073-1
14	AA	CDR3 de VH del clon 073-1
15	AA	CDR3 de VH del clon 073-1
16	AA	CDR1 de VL del clon 83-128
17	AA	CDR2 de VL del clon 83-128
18	AA	CDR3 de VL del clon 83-128
19	AA	CDR1 de VL del clon 95-2
20	AA	CDR2 de VL del clon 95-2

ES 2 456 961 T3

21	AA	CDR3 de VL del clon 95-2
22	AA	CDR1 de VL del clon 073-1
23	AA	CDR2 de VL del clon 073-1
24	AA	CDR3 de VL del clon 073-1
25	NA	VH del clon 83-128
26	NA	VL del clon 83-128
27	NA	VH del clon 95-2
28	NA	VL del clon 95-2
29	NA	VH del clon 073-1
30	NA	VL del clon 073-1
31	NA	E1/E2 1a H77 (figura 13)
32	AA	VH del clon 95-14 (figura 14)
33	AA	VH del clon 95-38 (figura 14)
34	AA	VH del clon 95-25 (figura 14)
35	AA	VH del clon 95-42 (figura 14)
36	AA	VH del clon 95-43 (figura 14)
37	AA	VH del clon 95-49 (figura 14)
38	AA	VH del clon 95-54 (figura 14)
39	AA	VH del clon 95-58 (figura 14)
40	AA	VH del clon 95-62 (figura 14)
41	AA	CDR1 de VH del clon 95-14
42	AA	CDR2 de VH del clon 95-14
43	AA	CDR3 de VH del clon 95-14
44	AA	VL del clon 95-14
45	AA	CDR1 de VL del clon 95-14
46	AA	CDR2 de VL del clon 95-14
47	AA	CDR3 de VL del clon 95-14
48	NA	VH del clon 95-14
49	NA	VL del clon 95-14
50	AA	CDR1 de VH del clon 95-38
51	AA	CDR2 de VH del clon 95-38
52	AA	CDR3 de VH del clon 95-38
53	AA	VL del clon 95-38
54	AA	CDR1 de VL del clon 95-38
55	AA	CDR2 de VL del clon 95-38
56	AA	CDR3 de VL del clon 95-38
57	NA	VH del clon 95-38
58	NA	VL del clon 95-38
59	AA	412-423 DE E2 (1a) QLINTNGSWHIN (figura 10)
60	AA	(1b) QLVNTNGSWHIN (figura 10)
61	AA	QLVNSNGSWHIN (figura 10)

62	AA	QLINSNGSWHIN (figura 10)
63	AA	HLINTNGSWHIN (figura 10)
64	AA	QLIKTNGSWHIN (figura 10)
65	AA	QLVNTNGSWHVN (figura 10)
66	AA	QFVNTNGSWHIN (figura 10)
67	AA	QLIKNGSSWHIN (figura 10)
68	AA	QLVKTNGSWHIN (figura 10)
69	AA	HLVNTNGSWHIN (figura 10)
70	AA	HLVNSNGSWHIN (figura 10)
71	AA	QLIHTNGSWHIN (figura 10)
72	AA	QLVKTEGNWHIN (figura 10)
73	AA	NLIKTNGSWHIN (figura 10)
74	AA	QLIYTNGSWHIN (figura 10)
75	AA	QLINTNGSWHLN (figura 10)
76	AA	ILINTNGSWHIN (figura 10)
77	AA	SLINTNGSWHIN (figura 10)
78	AA	NLINTNGSWHIN (figura 10)
79	AA	HLVNSNGSWHIN genotipo 2b (figura 11)
80	AA	QLVNSSGSWHIN genotipo 3a (figura 11)
81	AA	QLINSNGSWHIN genotipo 4a (figura 11)
82	AA	QLIQNGSSWHIN genotipo 5 (figura 11)
83	AA	QFVNTNGSWHIN genotipo 5a (figura 11)
84	AA	QLIKNGSSWHIN genotipo 6a (figura 11)
85	AA	QLIKTNGSWHIN genotipo 6g (figura 11)
86	AA	QLINSNGSWHVN genotipo 6k (figura 11)
87	AA	VH CDR1 secuencia consenso
88	AA	VH CDR2 secuencia consenso
89	AA	VH CDR3 secuencia consenso
90	AA	VL CDR1 secuencia consenso
91	AA	VL CDR2 secuencia consenso
92	AA	VL CDR3 secuencia consenso

Lista de secuencias

- <110> UNIVERSIDAD DE MASSACHUSETTS
- 5 <120> ANTICUERPOS HUMANOS CONTRA EL VIRUS DE LA HEPATITIS C (VHC) Y USOS DE LOS MISMOS
- <130> MJ1-005PC
- <140> Simultáneamente con el presente documento
- <141> Simultáneamente con el presente documento
- <150> Documento 60/902.432
- 10 <151> 21-02-2007
- <160> 92
- <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 123
- 15 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

ES 2 456 961 T3

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Constructo sintético

<400> 1

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 Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr
20 25 30

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

Ala Val Ile Trp Phe Asp Glu Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Ile Ser Leu Val Arg Asp Ala Phe Ile Tyr Phe Asp Phe
100 105 110

Trp Gly Leu Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

5 <210> 2

<211> 106

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: Constructo sintético

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

<210> 3

<211> 124

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Constructo sintético

<400> 3

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 Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Asp Ile Phe Thr Val Val Arg Gly Phe Phe Ile Tyr Phe Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 4

<211> 106

10

ES 2 456 961 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Constructo sintético
 <400> 4

5

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

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

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

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

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

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

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

<210> 5
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Constructo sintético
 <400> 5

10

ES 2 456 961 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 Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

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

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Glu Asn Asn Arg Tyr Ser Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Pro Thr Asn Tyr His Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Ile Tyr
100 105 110

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

<210> 6

<211> 106

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Constructo sintético

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

10 <210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 7
Asn Tyr Gly Met His
 5 **1** **5**
 <210> 8
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 8
Val Ile Trp Phe Asp Glu Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Arg
1 **5** **10** **15**

Gly
 <210> 9
 15 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 20 <400> 9
Ala Arg Asp Ile Ser Leu Val Arg Asp Ala Phe Ile Tyr Phe Asp Phe
1 **5** **10** **15**
 <210> 10
 <211> 5
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 10
Ser Tyr Gly Met His
 30 **1** **5**
 <210> 11
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 11
Val Ile Trp Phe Asp Gly Asn Asn Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 **5** **10** **15**

Gly
 <210> 12
 40 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 12
Ala Arg Asp Ile Phe Thr Val Val Arg Gly Phe Phe Ile Tyr Phe Asp
1 **5** **10** **15**

Tyr
 45 <210> 13
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 13
Asn Tyr Gly Met His
 1 5
 <210> 14
 5 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 10 <400> 14
Val Ile Trp Tyr Asp Glu Asn Asn Arg Tyr Ser Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly
 <210> 15
 <211> 19
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 15
Ala Arg Asp Pro Thr Asn Tyr His Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Ile Tyr
 1 5 10 15

Phe Asp Tyr
 20 <210> 16
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 16
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10
 <210> 17
 <211> 7
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 17
Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 35 1 5
 <210> 18
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 18
Gln Gln Arg Ser Asn Trp Val Thr
 1 5
 <210> 19
 45 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 50 <400> 19
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10
 <210> 20

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 20
Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5
 <210> 21
 <211> 8
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 21
Gln Gln Arg Ser Asn Trp Val Thr
 15 **1 5**
 <210> 22
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 22
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10
 <210> 23
 <211> 7
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 23
Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5
 <210> 24
 <211> 8
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 24
Gln Gln Arg Ser Asn Trp Val Thr
1 5
 40 <210> 25
 <211> 369
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> Descripción de la secuencia artificial: Constructo sintético
 <400> 25
caggTgcagc tggTggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggagatc cctgagactc 60

tcctgtacag cgtctggatt caccttcaat aactatggca tgcactgggt ccgccagact 120
ccaggcaagg ggctggagtg gctggcagtt atatggtttg atgaaaataa taagtactat 180

gcagactccg tgaggggccc attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgttt 240

ctgcaaatga acagcctgaa aaccgaagac acggctatgt attattgtgc gagagatatt 300

tctctggttc gggatgcttt tatctacttt gacttctggg gcctgggaac cctggtcacc 360

gtctcctca 369
 <210> 26
 50 <211> 318

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Constructo sintético
 5 <400> 26
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtc gagtggttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240
gaagatthttg cagthttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggatcacctt cggccaaggg 300
acacgactgg agatcaaa 318
 <210> 27
 <211> 372
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Constructo sintético
 <400> 27
caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccagget 120
ccaggcaagg ggctggaatg ggtggcagtt atatggthttg atggaaataa tcaatactat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagacatc 300
thtactgtgg thcggggatt thttatctac thtgactact ggggccaggg aaccctggtc 360
accgtctcct ca 372
 <210> 28
 <211> 318
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Descripción de la secuencia artificial: Constructo sintético
 <400> 28
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctthttg ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtc gagtgthtggc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240
gaagatthttg cagthttatta ctgtcagcag cgtagcaact gggtcacctt cggccaaggg 300
acacgactgg agatcaaa 318
 <210> 29
 <211> 378
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Constructo sintético
 <400> 29

ES 2 456 961 T3

	caggtgcagc tgggtggagtc tgggggagge gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc	60
	tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt aactatggca tgcaactgggt ccgccaggct	120
	ccaggcaagg ggctggagtg gatggcagtt atctggtatg atgaaaataa tagatactct	180
	gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	240
	ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatcct	300
	acgaattacc atggttcggg gagttattat atctactttg actactgggg ccaggggaacc	360
	ctggtcaccg tctcctca	378
	<210> 30	
	<211> 318	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Constructo sintético	
	<400> 30	
	gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc	60
	ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct	120
	ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccaactgg catcccagcc	180
	aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcac cctagagcct	240
	gaagatthtg cagthtatta ctgtcagcag cgtagcaact ggtcacctt cggccaaggg	300
	acacgactgg agatcaaa	318
10	<210> 31	
	<211> 1785	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Descripción de la secuencia artificial: Constructo sintético	
	<400> 31	

ES 2 456 961 T3

cgctatagaa gcttgccgcc accatggcca cccggcaacct gcccggtgc tccttctcca 60
 tcttcctget ggcctgctg tcctgootga ccgtgcccgc ctccgcctac caggtgcgca 120
 actcctccgg cctgtaccac gtgaccaacg actgccetaa ctccctccatc gtgtacgagg 180
 ccgccgacgc catcctgcac actcctgggt gcgtgccctg cgtgcgagag ggcaacgcct 240
 cccgctgctg ggtggccgtg actcctaccg tggccacccg cgacggcaag ctgcccacca 300
 cccagctgcg ccgccacatc gacctgctgg tgggtccgc caccctgtgc tccgcctgt 360
 acgtgggca cctgtgcggc tccgtgttcc tgggtggcca gctgttcacc ttctctctc 420
 gccgccactg gaccaccag gactgcaact gctccatcta ccctggccac atcacggcc 480
 accgatggc ctgggacatg atgatgaact ggtctccac cgcgcctcgt gtggtggccc 540
 agctgctgcg catccctcag gccatcatgg acatgatcgc cggcgcccac tggggcgtcc 600
 tggccggcat cgcctacttc tccatggtgg gcaactgggc caaggtgctg gtggtgctgc 660
 tgctgttcgc cggcgtggac gccgagacc acgtgacggg cggctccgcc ggccgcacca 720
 ccgccggcct ggtgggcctg ctgacaccgc gcgccaagca gaacatccag ctgatcaaca 780
 ccaacggctc ctggcacatc aactccaccg ccctgaactg caacgagtcc ctgaacaccg 840
 gctggctggc cggcctgttc taccagcaca agttcaactc ctccggctgt cccgagcgcc 900
 tggcctcctg ccgccgctg accgaactcg cccagggctg gggccctatc tctacgcca 960
 acggtccgg cctggacgag cggccctact gctggcacta ccctcctcgc ccttgcgca 1020
 tcgtgcccgc caagtccgtg tggggccctg tgtactgctt cactccctct cccgtggtgg 1080
 tgggcaccac cgaccgctcc ggcgtccca cctactcctg gggcgccaac gacaccgacg 1140
 tgttcgtgct gaacaacacc cgcctcctc tgggcaactg gttcggtgc acctggatga 1200
 actccaccgg cttaccaag gtgtgcggcg cgcctccctg cgtgatcggc ggcgtgggca 1260
 acaacaccct gctgtgcct accgaactgct tccgcaagca tcccaggcc acctactccc 1320
 gctgcccgtc cgggccctgg atcactcctc gctgcatggt ggactatccc taccgcctgt 1380
 ggcactatcc ctgcaccatc aactacacca tcttcaaggt gcgcatgtac gtgggcggcg 1440
 tggagcaccg cctggaggcg gcgtgcaact ggaccgcgg cgagcgtgc gacctggagg 1500
 accgcgaccg ctccgagctg tctcctctgc tgetgtccac caccagtggt caggtgctgc 1560
 cctgctcctt caccaccctg cccgcgtgt ccaccggcct gatccacctg caccagaaca 1620
 tcgtggacgt gcagtacctg tacggcgtgg gtcctccat cgcgtcctgg gcgatcaagt 1680
 gggagtacgt ggtgctgctg tcctgctgc tggcggacgc gcgctgtgc tcctgcctgt 1740
 ggatgatgct gctgatctcc caggcggagg cgtctagagg agtca 1785

<210> 32

<211> 124

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Constructo sintético

ES 2 456 961 T3

<400> 32

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 Ala Ala Ser Gly Phe Ile Leu Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Asp Ile Phe Thr Met Val Arg Gly Val Phe Ile Tyr Phe Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 33

<211> 124

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Constructo sintético

<400> 33

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 Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

10

ES 2 456 961 T3

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

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

Ala Arg Asp Ile Phe Thr Val Ala Arg Gly Val Ile Ile Tyr Phe Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 34

<211> 124

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Constructo sintético

<400> 34

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 Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Asp Ile Phe Thr Met Asp Arg Gly Val Phe Ile Tyr Phe Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

10 <210> 35

<211> 124

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de la secuencia artificial: Constructo sintético

<400> 35

ES 2 456 961 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 Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Glu Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Ile Phe Thr Met Val Arg Gly Val Phe Ile Tyr Phe Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 36

<211> 124

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Constructo sintético

<400> 36

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 Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Asp Ile Phe Thr Met Val Arg Gly Val Phe Ile Tyr Phe Asp
 100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 37

<211> 124

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Constructo sintético

<400> 37

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 Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Asp Ile Phe Thr Met Val Arg Gly Val Phe Ile Tyr Phe Asp
 100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10 <210> 38

<211> 124

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de la secuencia artificial: Constructo sintético

<400> 38

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 Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

ES 2 456 961 T3

20

25

30

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

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

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

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

Ala Arg Asp Ile Phe Thr Met Val Arg Gly Val Phe Ile Tyr Phe Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 39

<211> 124

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Constructo sintético

<400> 39

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 Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Glu Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Ile Phe Thr Met Val Arg Gly Val Phe Ile Tyr Phe Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

10

<210> 40

<211> 124

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Constructo sintético

<400> 40

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 Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Asp Ile Phe Thr Met Val Arg Gly Val Phe Ile Tyr Phe Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

5

<210> 41

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 41

Ser Tyr Gly Met His
1 5

<210> 42

15

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

20

<400> 42

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 43

<211> 17

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 43

Ala Arg Asp Ile Phe Thr Met Val Arg Gly Val Phe Ile Tyr Phe Asp
1 5 10 15

Tyr

<210> 44

<211> 106

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Constructo sintético

<400> 44

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

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

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

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

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

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

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

10 <210> 45

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 45

Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 46

<211> 7

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 46

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

25 <210> 47

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 47

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Val Thr
1 5

ES 2 456 961 T3

<210> 48
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Constructo sintético
 <400> 48
caggtgcagc tggtaggagtc tgggggagggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cgtctggatt catcctcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaaataa taaatactat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagacatc 300
tttactatgg ttcggggagt ttttatctac tttgactact ggggccaggg aaccctggtc 360
accgtctcct ca 372
 <210> 49
 10 <211> 318
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Constructo sintético
 15 <400> 49
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttggc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact gggtcacctt cggccaaggg 300
acacgactgg agatcaaa 318
 <210> 50
 <211> 5
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 50
Ser Tyr Gly Met His
1 5
 25 <210> 51
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 51
Val Ile Trp Leu Asp Gly Ser Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly
 35 <210> 52
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 52

Ala Arg Asp Ile Phe Thr Val Ala Arg Gly Val Ile Ile Tyr Phe Asp
1 5 10 15

Tyr

<210> 53

<211> 106

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Constructo sintético

<400> 53

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

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

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

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

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

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

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

10

<210> 54

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 54

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 55

20

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

25

<400> 55

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 56

<211> 8

<212> PRT

30

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 56

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Val Thr
1 5
 <210> 57
 <211> 372
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Constructo sintético
 <400> 57
cagggtgcaac tgggtggagtc tgggggagge gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggcttg atggaagtaa cacatactat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatt tctagagaca attccaagaa cagcgtgttt 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagacatc 300
tttactgtgg ctcggggagt tattatctac tttgactact ggggccaggg aaccctggtc 360
accgtctcct ca 372
 10 <210> 58
 <211> 318
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Descripción de la secuencia artificial: Constructo sintético
 <400> 58
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact gggtcacctt cggccaaggg 300
acacgactgg agatcaaa 318
 20 <210> 59
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Virus de la hepatitis C
 <400> 59
Gln Leu Ile Asn Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn
1 5 10
 25 <210> 60
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Virus de la hepatitis C
 <400> 60
Gln Leu Val Asn Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn
1 5 10
 30 <210> 61
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Virus de la hepatitis C
 <400> 61
Gln Leu Val Asn Ser Asn Gly Ser Trp His Ile Asn
 35 **1 5 10**
 <210> 62
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Virus de la hepatitis C

<400> 62
Gln Leu Ile Asn Ser Asn Gly Ser Trp His Ile Asn
1 5 10

<210> 63
 <211> 12
 5 <212> PRT
 <213> Virus de la hepatitis C
 <400> 63
His Leu Ile Asn Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn
1 5 10

<210> 64
 10 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Virus de la hepatitis C
 <400> 64
Gln Leu Ile Lys Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn
1 5 10

15 <210> 65
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Virus de la hepatitis C
 <400> 65
Gln Leu Val Asn Thr Asn Gly Ser Trp His Val Asn
1 5 10

20 <210> 66
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Virus de la hepatitis C
 25 <400> 66
Gln Phe Val Asn Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn
1 5 10

<210> 67
 <211> 12
 <212> PRT
 30 <213> Virus de la hepatitis C
 <400> 67
Gln Leu Ile Lys Asn Gly Ser Ser Trp His Ile Asn
1 5 10

<210> 68
 <211> 12
 35 <212> PRT
 <213> Virus de la hepatitis C
 <400> 68
Gln Leu Val Lys Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn
1 5 10

<210> 69
 40 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Virus de la hepatitis C
 <400> 69
His Leu Val Asn Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn
1 5 10

45 <210> 70
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Virus de la hepatitis C
 <400> 70
His Leu Val Asn Ser Asn Gly Ser Trp His Ile Asn
1 5 10

50 <210> 71
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Virus de la hepatitis C
 55 <400> 71

Gln Leu Ile His Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn
1 5 10
 <210> 72
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Virus de la hepatitis C
 <400> 72
Gln Leu Val Lys Thr Glu Gly Asn Trp His Ile Asn
1 5 10
 <210> 73
 <211> 12
 10 <212> PRT
 <213> Virus de la hepatitis C
 <400> 73
Asn Leu Ile Lys Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn
1 5 10
 <210> 74
 <211> 12
 15 <212> PRT
 <213> Virus de la hepatitis C
 <400> 74
Gln Leu Ile Tyr Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn
1 5 10
 20 <210> 75
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Virus de la hepatitis C
 <400> 75
Gln Leu Ile Asn Thr Asn Gly Ser Trp His Leu Asn
1 5 10
 25 <210> 76
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Virus de la hepatitis C
 30 <400> 76
Tyr Leu Ile Asn Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn
1 5 10
 <210> 77
 <211> 12
 <212> PRT
 35 <213> Virus de la hepatitis C
 <400> 77
Ser Leu Ile Asn Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn
1 5 10
 <210> 78
 <211> 12
 40 <212> PRT
 <213> Virus de la hepatitis C
 <400> 78
Asn Leu Ile Asn Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn
1 5 10
 <210> 79
 <211> 12
 45 <212> PRT
 <213> Virus de la hepatitis C
 <400> 79
His Leu Val Asn Ser Asn Gly Ser Trp His Ile Asn
1 5 10
 50 <210> 80
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Virus de la hepatitis C
 <400> 80
Gln Leu Val Asn Ser Ser Gly Ser Trp His Ile Asn
1 5 10
 55

<210> 81
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Virus de la hepatitis C
 5 <400> 81
Gln Leu Ile Asn Ser Asn Gly Ser Trp His Ile Asn
1 5 10
 <210> 82
 <211> 12
 <212> PRT
 10 <213> Virus de la hepatitis C
 <400> 82
Gln Leu Ile Gln Asn Gly Ser Ser Trp His Ile Asn
1 5 10
 <210> 83
 <211> 12
 <212> PRT
 15 <213> Virus de la hepatitis C
 <400> 83
Gln Phe Val Asn Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn
1 5 10
 <210> 84
 <211> 12
 <212> PRT
 20 <213> Virus de la hepatitis C
 <400> 84
Gln Leu Ile Lys Asn Gly Ser Ser Trp His Ile Asn
1 5 10
 25 <210> 85
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Virus de la hepatitis C
 <400> 85
Gln Leu Ile Lys Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn
 30 **1 5 10**
 <210> 86
 <211> 12
 <212> PRT
 35 <213> Virus de la hepatitis C
 <400> 86
Gln Leu Ile Asn Ser Asn Gly Ser Trp His Val Asn
1 5 10
 <210> 87
 <211> 5
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 <220>
 <221> MOD_RES
 45 <222> (1) .. (1)
 <223> aminoácido polar, pequeño variable
 <400> 87
Xaa Tyr Gly Met His
1 5
 <210> 88
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 55 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> aminoácido variable
 <220>

<221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> aminoácido variable
 <220>
 5 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> aminoácido polar, pequeño variable
 <220>
 <221> MOD_RES
 10 <222> (9)..(9)
 <223> aminoácido variable
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (15)..(15)
 15 <223> aminoácido hidrófobo variable
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (16)..(16)
 <223> aminoácido polar cargado positivamente variable
 20 <400> 88
Val Ile Trp Xaa Asp Xaa Xaa Asn Xaa Tyr Tyr Ala Asp Ser Xaa Xaa
1 5 10 15

Gly

<210> 89
 <211> 17
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 <220>
 <221> MOD_RES
 30 <222> (5)..(5)
 <223> Phe o no está presente
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 35 <223> Ser o Thr
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> aminoácido hidrófobo variable
 40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> aminoácido variable
 <220>
 45 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(10)
 <223> aminoácido pequeño variable
 <220>
 <221> MOD_RES
 50 <222> (11)..(11)
 <223> aminoácido variable
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (12)..(12)
 55 <223> aminoácido hidrófobo variable
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (17)..(17)
 <223> aminoácido aromático variable
 60 <400> 89
Ala Arg Asp Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Ile Tyr Phe Asp

	1	5	10	15
	Xaa			
	<210> 90			
	<211> 11			
	<212> PRT			
5	<213> Secuencia artificial			
	<220>			
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético			
	<220>			
	<221> MOD_RES			
10	<222> (7)..(7)			
	<223> aminoácido variable			
	<400> 90			
	Arg	Ala	Ser	Gln
	Ser	Val	Xaa	Ser
	Tyr	Leu	Ala	
	1	5	10	
	<210> 91			
15	<211> 7			
	<212> PRT			
	<213> Secuencia artificial			
	<220>			
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético			
20	<400> 91			
	Asp	Ala	Ser	Asn
	Arg	Ala	Thr	
	1	5		
	<210> 92			
	<211> 8			
	<212> PRT			
25	<213> Secuencia artificial			
	<220>			
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético			
	<220>			
	<221> MOD_RES			
30	<222> (7)..(7)			
	<223> aminoácido hidrófobo, pequeño variable			
	<400> 92			
	Gln	Gln	Arg	Ser
	Asn	Trp	Xaa	Thr
	1	5		

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo monoclonal humano aislado, o parte de unión a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, comprende:
- 5 (a) regiones variables de cadena pesada y ligera que comprenden SEQ ID NO:1 y 2; o
- (b) una secuencia de región variable de cadena ligera CDR3 que comprende SEQ ID NO:9, una secuencia de región variable de cadena ligera CDR3 que comprende SEQ ID NO:18, una secuencia de región variable de cadena pesada CDR2 que comprende SEQ ID NO: 8, una secuencia de región variable de cadena ligera CDR2 que comprende SEQ ID NO:17, una secuencia de región variable de cadena pesada CDR1 que comprende SEQ ID NO:7 y una secuencia de región variable de cadena ligera CDR1 que comprende SEQ ID NO:16.
- 10 2. Anticuerpo según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es un anticuerpo de cadena completa.
- 15 3. Anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, según la reivindicación 1, que:
- comprende un dominio Fc; o
- 20 - es un anticuerpo de cadena sencilla; o
- es un fragmento Fab.
- 25 4. Polipéptido aislado que comprende la parte de unión a antígeno de un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
5. Composición que comprende el anticuerpo o parte de unión a antígeno según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 30 6. Ácido nucleico aislado que codifica para una región variable de un anticuerpo que se une a VHC, comprendiendo dicho ácido nucleico SEQ ID NO:25 y SEQ ID NO:26.
7. Vector de expresión o célula huésped que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 6.
- 35 8. Kit que comprende uno o más anticuerpos monoclonales aislados, o partes de unión a antígeno de los mismos, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, e instrucciones para su uso en el tratamiento de una enfermedad mediada por VHC.
- 40 9. Anticuerpo monoclonal aislado, o parte de unión a antígeno del mismo, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su uso en un método de tratamiento de una infección por VHC en un sujeto.
10. Anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su uso en un método de tratamiento de una infección por VHC según la reivindicación 9 en el que:
- 45 (a) el sujeto es humano; o
- (b) el anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, es para administración intravenosa, intramuscular o subcutánea.
- 50 11. Anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su uso en un método de tratamiento de una infección por VHC según la reivindicación 9, en el que el método comprende administrar dicho anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, en combinación con un segundo agente terapéutico que se selecciona de:
- 55 (i) un segundo anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo;
- (ii) un agente antiviral; o
- (iii) una vacuna contra VHC, que es opcionalmente una proteína E2 de VHC2 o fragmento de la misma.
- 60 12. Composición para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad o un trastorno mediado por VHC en un mamífero, en la que dicha composición comprende el anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en un portador farmacéuticamente aceptable.
- 65 13. Composición según la reivindicación 12 para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad o un trastorno mediado por VHC según la reivindicación 12, en la que dicha composición comprende además un segundo

anticuerpo que se une a VHC.

- 5 14. Método de detección de una infección por VHC en un mamífero, que comprende poner en contacto un líquido corporal obtenido de un mamífero con un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o parte de unión a antígeno del mismo, y determinar si se produce unión, siendo dicha unión indicativa de la presencia de una infección por VHC.

Figura 1A: 95-2

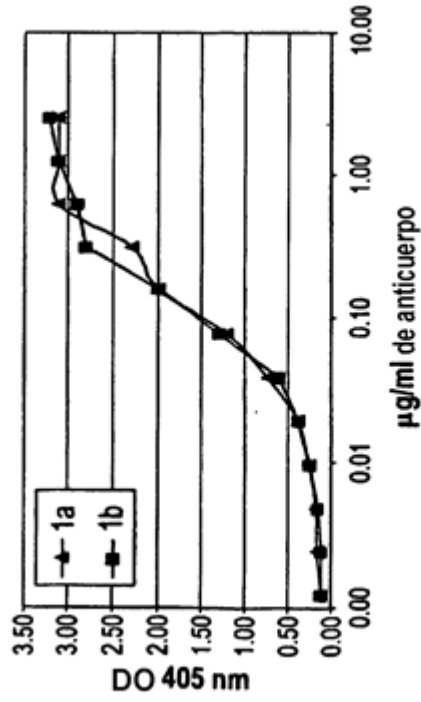
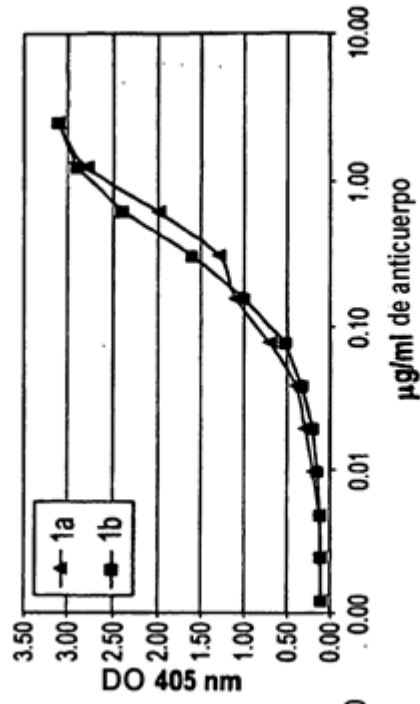
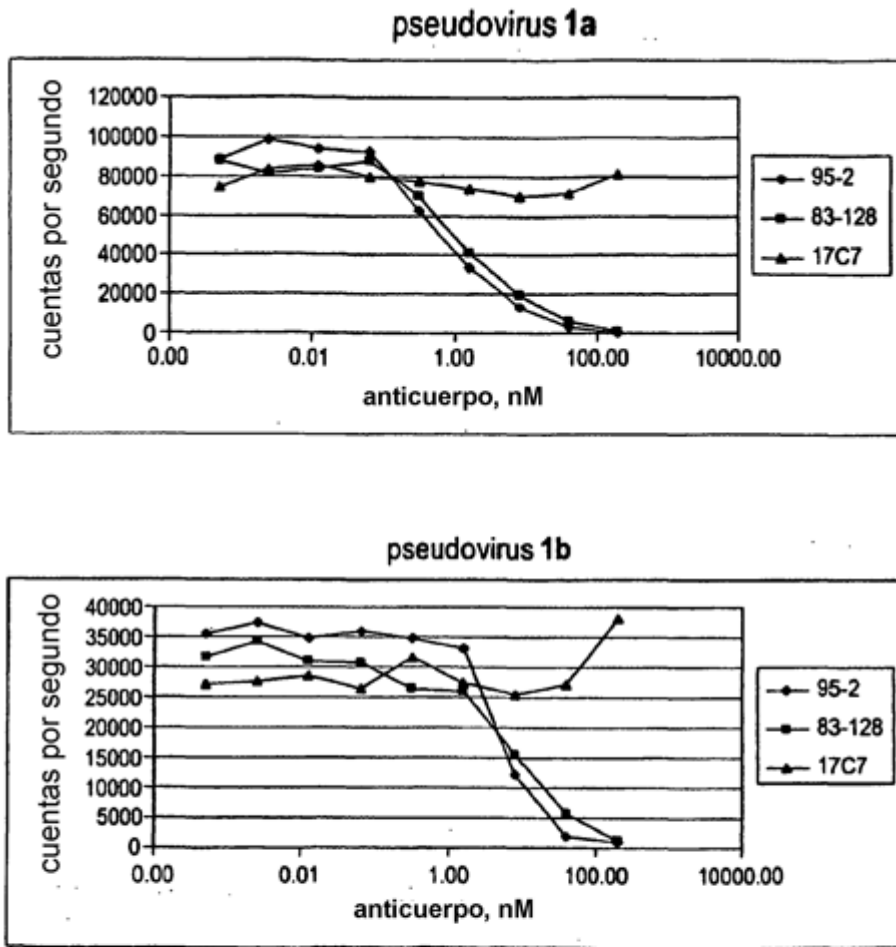


Figura 1B: 83-128



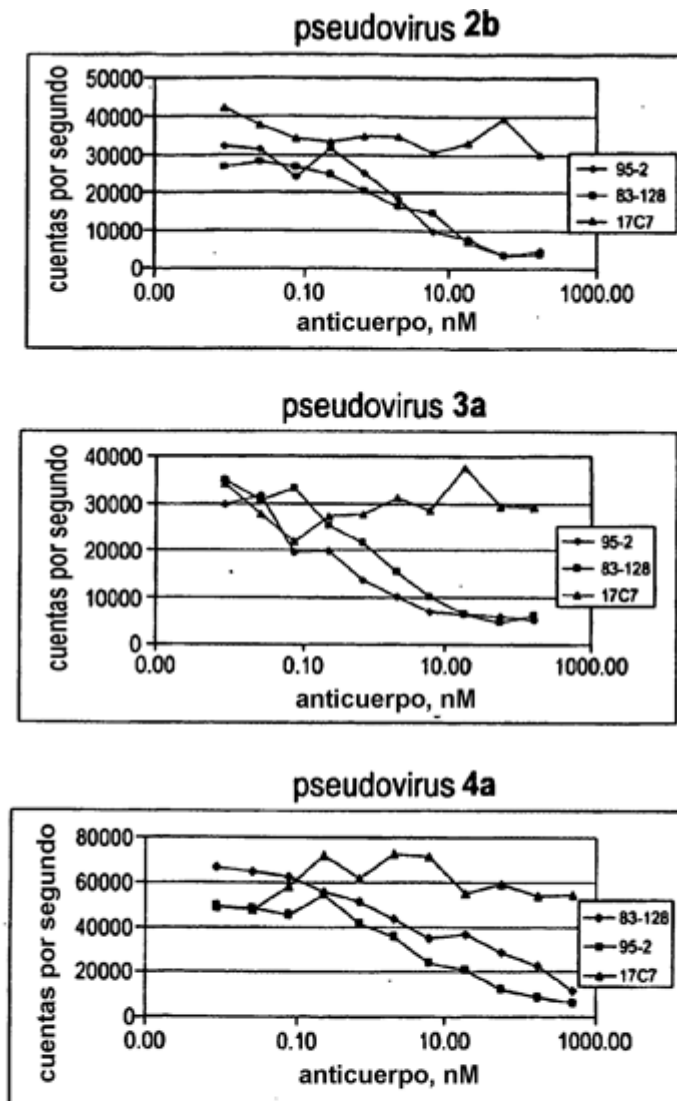
ELISA de E2 soluble de genotipo 1. Se recubrieron placas de ELISA con 2 µg/ml de 1a E2-660 (triángulos) o 1b E2-661 (cuadrados) y se examinaron con sonda con anticuerpos HuMab 95-2 y 83-128 en diluciones dobles. Se detectó el anticuerpo unido con anticuerpo secundario de cabra anti-ser humano conjugado a fosfatasa alcalina y sustrato PNPP.

Fig. 1



Neutralización con pseudovirus de genotipos 1a y 1b de VHC. Se incubaron diluciones de cinco veces de anticuerpos HuMab 95-2, 83-128 y 17C7 (HuMab contra la rabia, control negativo) con pseudovirus de VHC durante 1 h a temperatura ambiente. Se añadió la mezcla de virus-anticuerpo a células Hep3B seguido por incubación a 37°C durante 72 h. Se cuantificó la infección con ensayo de luciferasa Brightglo y se leyó en un lector de placas Victor3 para determinar la emisión de luz.

Fig. 2A



Neutralización con pseudovirus de genotipos 2b, 3a y 1a de VHC. Se incubaron diluciones de cinco veces de anticuerpos HuMab 95-2, 83-128 y 17C7 (HuMab contra la rabia, control negativo) con pseudovirus de VHC durante 1 h a temperatura ambiente. Se añadió la mezcla de virus-anticuerpo a células Hep3B seguido por incubación a 37°C durante 72 h. Se cuantificó la infección con ensayo de luciferasa Brightglo y se leyó en un lector de placas Victor3 para determinar la emisión de luz.

Fig. 2B

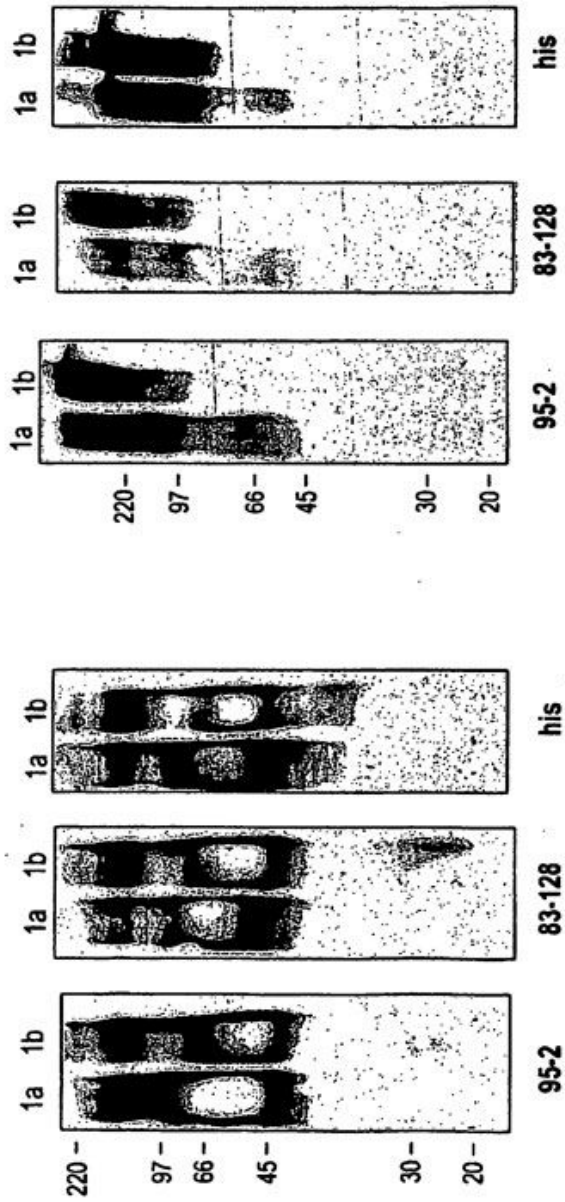


Figura 3A: Reducidas

Figura 3B: No reducidas

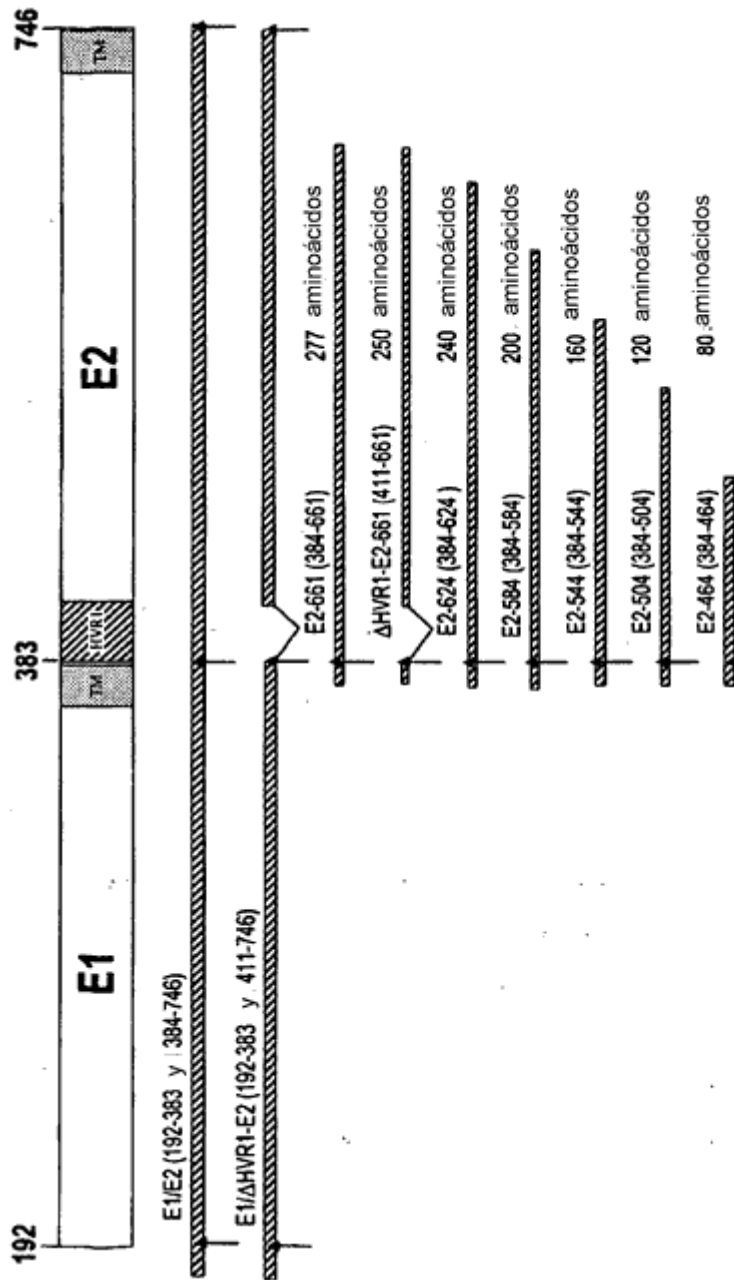
Inmunotransferencias de tipo Western reductoras y no reductoras de proteína soluble E2 de genotipos 1a y 1b. Se sometió proteína E2 expresada en mamífero soluble, purificada (E2-661) de genotipos 1a y 1b a SDS-PAGE reductora o no reductora seguido por transferencia a membrana de PVDF. Se realizaron las inmunotransferencias de tipo Western con los anticuerpos monoclonales anti-cola de his (his), 83-128 y 95-2 usando anticuerpo anti-IgG de ratón (his) o anti-IgG humana (95-2 y 83-128) conjugado a HRP con reactivo de detección quimioluminiscente mejorado. El genotipo de la E2 soluble se indica sobre las transferencias. El anticuerpo primario usado para la detección se enumera debajo de las transferencias. Los marcadores de peso molecular en kilodaltons se enumeran a la izquierda de cada conjunto de transferencias.

Fig. 3

	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
95-2	1.6e5	3.0e-4	1.9e-9
83-128	1.9e5	7.3e-4	3.8e-9

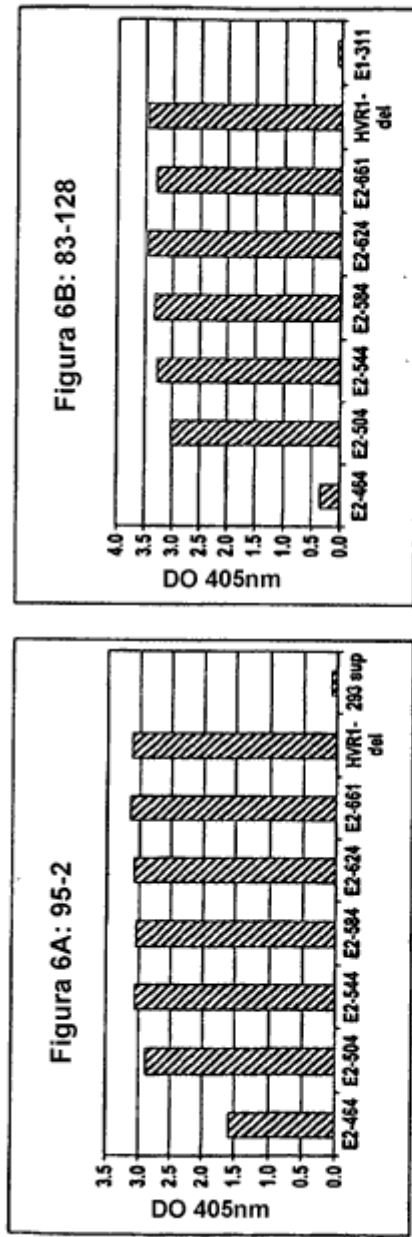
Determinación de afinidad de 95-2 y 83-128 para el epitopo 412-423 de E2 expresado como proteína de fusión bacteriana. El anticuerpo de cabra anti-Fc de IgG humana se acopló mediante amida al chip de Biacore. Los anticuerpos 95-2 y 83-128 se capturaron por separado sobre el chip y se hizo fluir la proteína expresada en bacterias E2-G que contenía los aminoácidos 412-423 de E2 a concentraciones variables. Se usó el software BIAevaluation para ajustar las curvas y calcular las constantes de afinidad.

Fig. 4



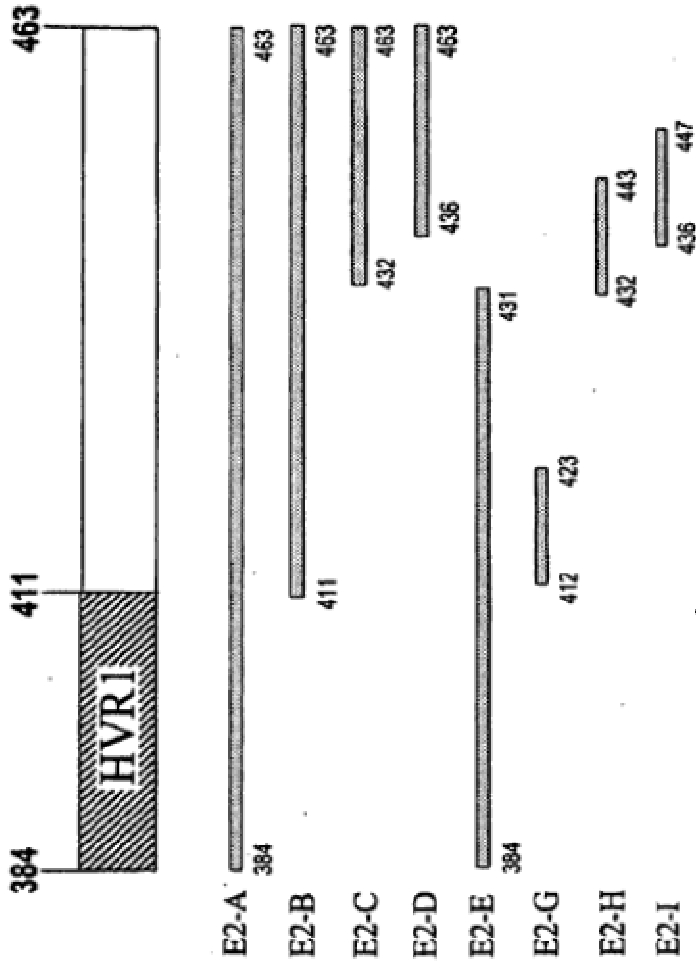
Proteínas expresadas en mamífero E1 y E2. La poliproteína E1 y E2 se indica en la parte superior mediante un largo recuadro blanco con los números de aminoácido indicados encima. Los dominios transmembrana (TM) se indican mediante recuadros de color gris claro y el dominio hipervariable 1 (HVR1) de E2 se indica mediante un recuadro de color gris oscuro. Las proteínas de mamífero expresadas a partir de constructos modificados mediante ingeniería genética se enumeran debajo como barras de color gris oscuro. Los sitios de escisión de peptidasa señal se indican mediante flechas. El nombre de cada proteína va seguido por los aminoácidos codificados; entre paréntesis y los aminoácidos totales en la proteína expresada.

Fig. 5



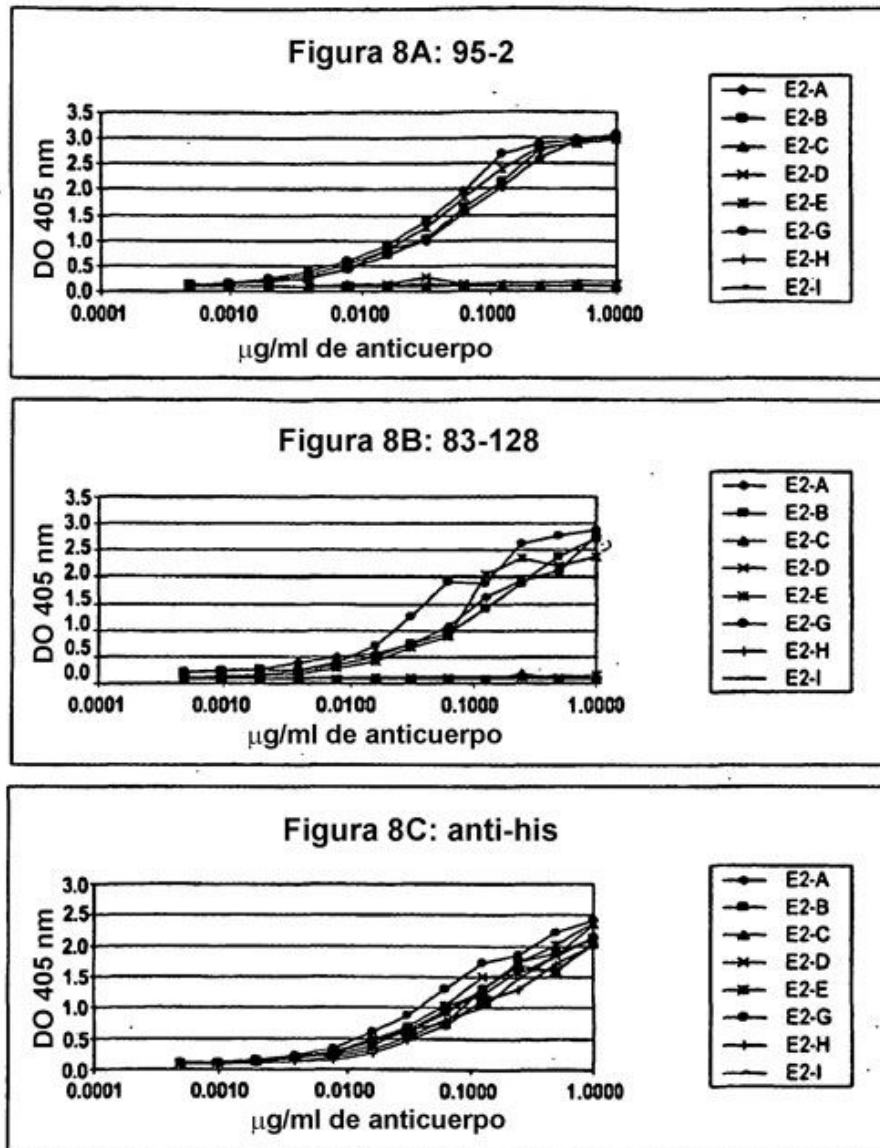
ELISA de captura de lectinas de truncamientos C-terminales expresados en mamífero de E2. Se recubrieron los sobrenadantes de cultivo celular que contenían truncamientos C-terminales expresados en mamífero de proteínas de fusión de E2 que contenían aminoácidos de E2 indicados en la figura 7 sobre una placa de ELISA y se examinaron con sonda con diluciones dobles de los anticuerpos humanos HuMab 95-2 y 83-128 y anticuerpo de ratón anti-cola de seis histidinas (cola de his). Se detectaron los anticuerpos unidos con anticuerpo de cabra anti-ser humano (95-2 y 83-128) o de cabra anti-ratón (cola de his) conjugado a fosfatasa alcalina y sustrato PNPP.

Fig. 6



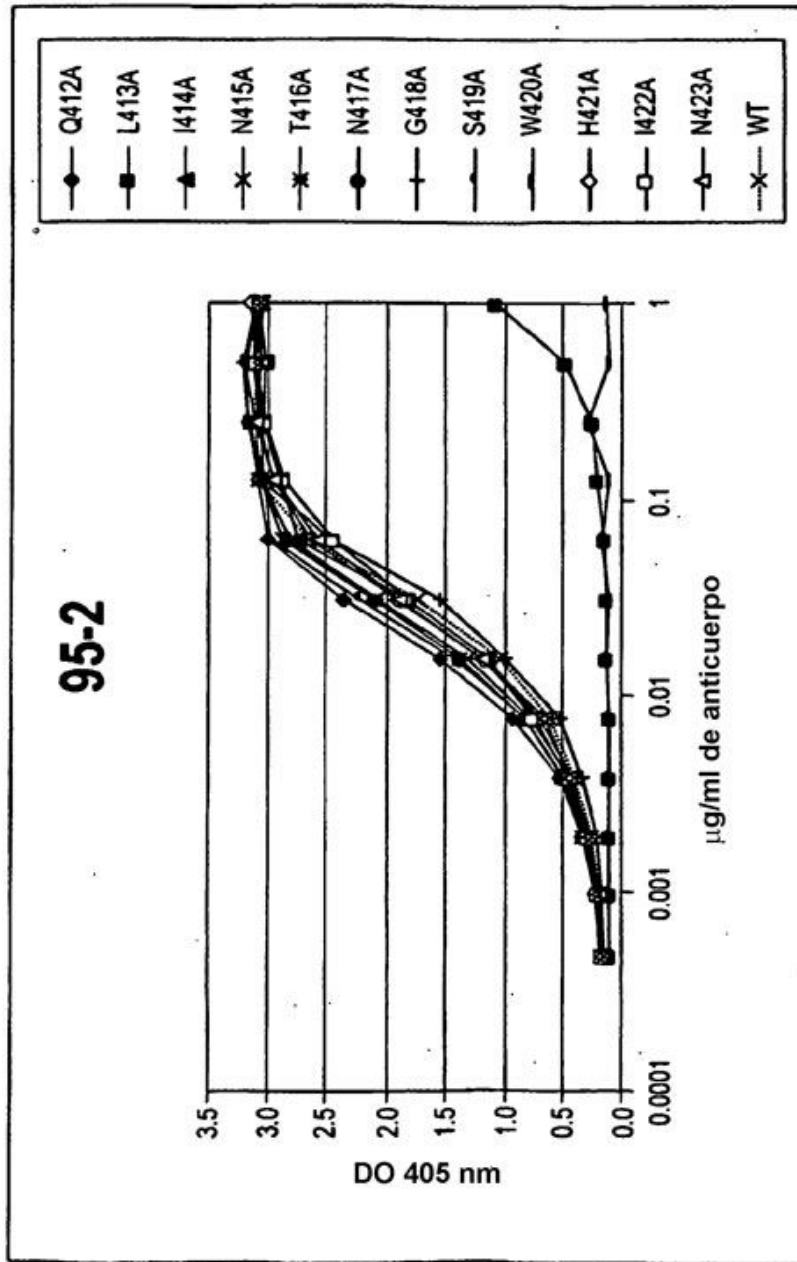
Proteínas expresadas en bacterias que abarcan los 80 aminoácidos amino-terminales de E2. Los primeros 80 aminoácidos de la proteína E2 se representan en la parte superior mediante un recuadro blanco con los números de los aminoácidos encima. La región hipervariable 1 (HVR1) de 27 aminoácidos en el extremo amino-terminal se indica mediante un recuadro de color gris oscuro. Las proteínas expresadas a partir de constructos modificados mediante ingeniería genética indican mediante barras de color gris claro con los nombres a la izquierda de la barra y los números de aminoácido para el inicio y el final de la proteína enumerados debajo de la barra.

Fig. 7



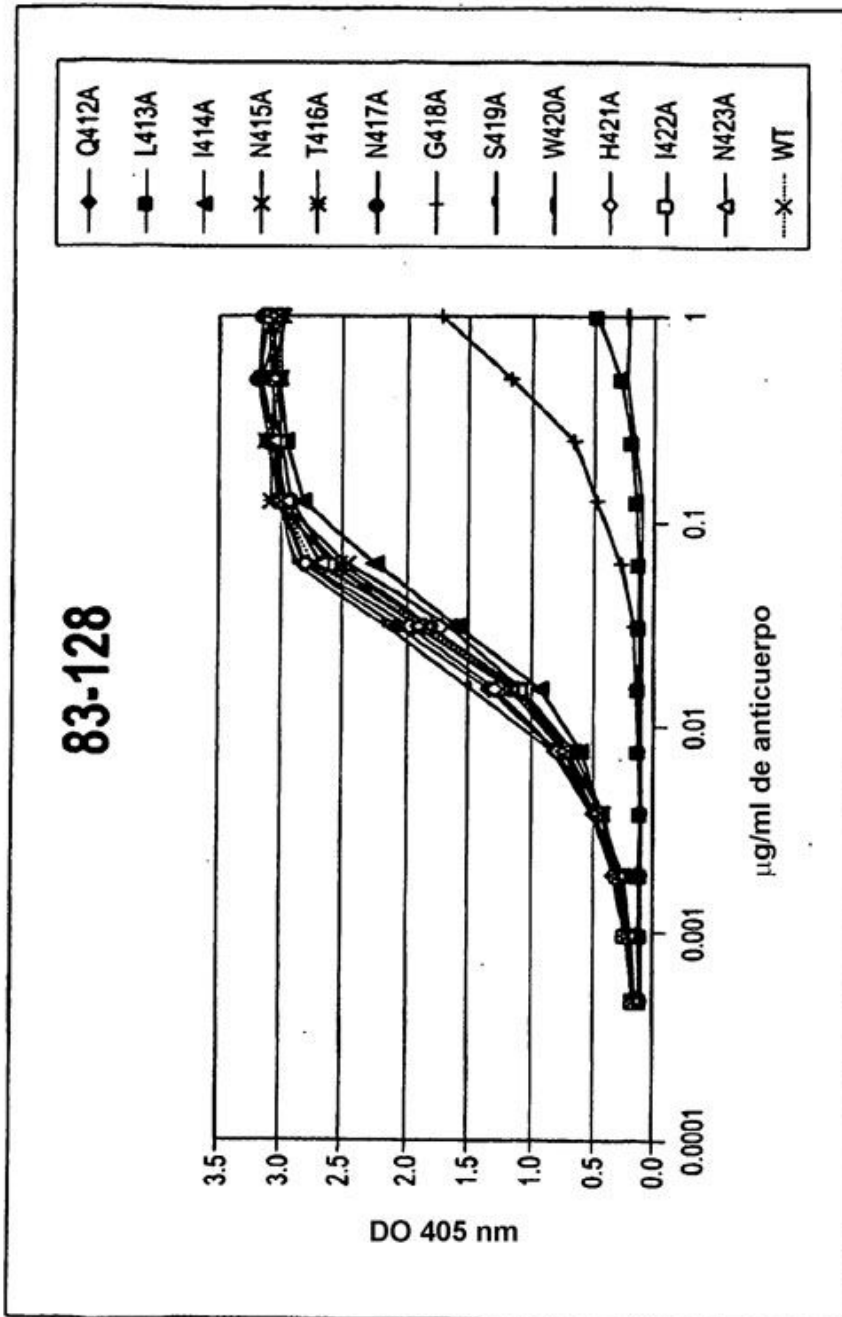
ELISA de trozos expresados en bacterias de los primeros 80 aminoácidos de E2. Se recubrieron proteínas de fusión expresadas en bacterias que contenían aminoácidos de E2 indicados en la figura 7 sobre una placa de ELISA y se examinaron con sonda con diluciones dobles de anticuerpos HuMab 95-2 y 83-128 y anticuerpo anti-cola de seis histidinas (cola de his) de ratón. Se detectaron los anticuerpos unidos con anticuerpo de cabra anti-ser humano (95-2 y 83-128) o de cabra anti-ratón (cola de his) conjugado a fosfatasa alcalina y sustrato PNPP.

Fig. 8



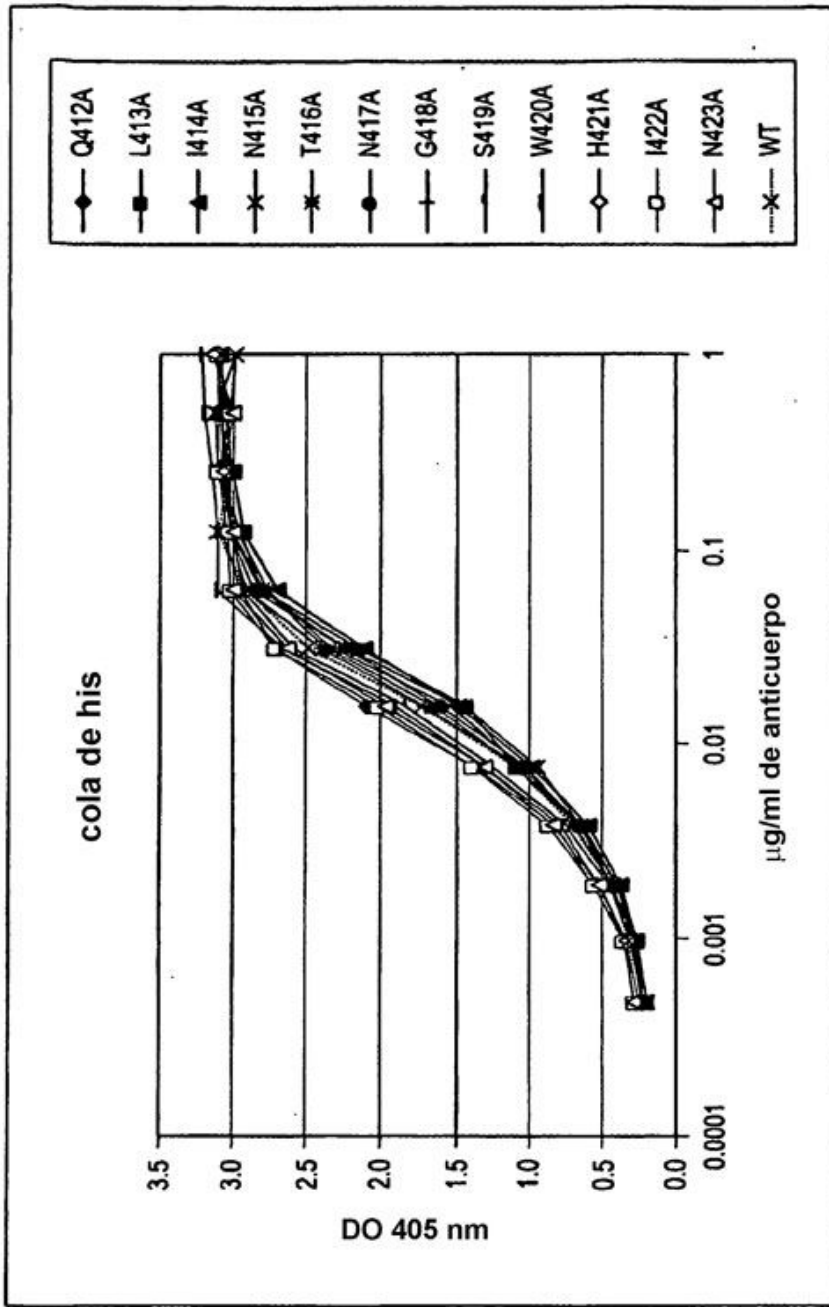
ELISA de mutantes por barrido de alanina de 412-423 de E2. Se recubrieron proteínas de fusión expresadas en bacterias que contenían los aminoácidos 412-423 de E2 con los aminoácidos indicados mutados a una alanina o que no contenían mutaciones (WT) sobre una placa de ELISA y se examinaron con sonda con diluciones dobles de anticuerpos HuMab 95-2 y 83-128 y anticuerpo anti-cola de seis histidinas (cola de his) de ratón. Se detectaron los anticuerpos unidos con anticuerpo de cabra anti-ser humano (95-2 y 83-128) o de cabra anti-ratón (cola de his) conjugado a fosfatasa alcalina y sustrato PNPP.

Fig. 9A



ELISA de mutantes por barrido de alanina de 412-423 de E2. Se recubrieron proteínas de fusión expresadas en bacterias que contenían los aminoácidos 412-423 de E2 con los aminoácidos indicados mutados a una alanina o que no contenían mutaciones (WT) sobre una placa de ELISA y se examinaron con sonda con diluciones dobles de anticuerpos HuMab 95-2 y 83-128 y anticuerpo anti-cola de seis histidinas (cola de his) de ratón. Se detectaron los anticuerpos unidos con anticuerpo de cabra anti-ser humano (95-2 y 83-128) o de cabra anti-ratón (cola de his) conjugado a fosfatasa alcalina y sustrato PNPP.

Fig. 9B



ELISA de mutantes por barrido de alanina de 412-423 de E2. Se recubrieron proteínas de fusión expresadas en bacterias que contenían los aminoácidos 412-423 de E2 con los aminoácidos indicados mutados a una alanina o que no contenían mutaciones (WT) sobre una placa de ELISA y se examinaron con sonda con diluciones dobles de anticuerpos HuMab 95-2 y 83-128 y anticuerpo anti-cola de seis histidinas (cola de his) de ratón. Se detectaron los anticuerpos unidos con anticuerpo de cabra anti-ser humano (95-2 y 83-128) o de cabra anti-ratón (cola de his) conjugado a fosfatasa alcalina y sustrato PNPP.

Fig. 9C

Fig. 10

	Recuento		Porcentaje
QLINTNGSWHIN (1a)	(SEQ ID NO:59)	78	48.1
--V-----	(1b) (SEQ ID NO:60)	48	29.6
--V-S-----	(SEQ ID NO:61)	8	4.9
-----S-----	(SEQ ID NO:62)	5	3.1
H-----	(SEQ ID NO:63)	4	2.5
---K-----	(SEQ ID NO:64)	3	1.9
--V-----V-	(SEQ ID NO:65)	1	0.6
-FV-----	(SEQ ID NO:66)	1	0.6
---KNGS-----	(SEQ ID NO:67)	1	0.6
--VK-----	(SEQ ID NO:68)	1	0.6
H-V-----	(SEQ ID NO:69)	1	0.6
H-V-S-----	(SEQ ID NO:70)	1	0.6
---E-----	(SEQ ID NO:71)	1	0.6
--VK-E-N-----	(SEQ ID NO:72)	1	0.6
N--K-----	(SEQ ID NO:73)	1	0.6
---Y-----	(SEQ ID NO:74)	1	0.6
-----L-	(SEQ ID NO:75)	1	0.6
Y-----	(SEQ ID NO:76)	1	0.6
S-----	(SEQ ID NO:77)	1	0.6
N-----	(SEQ ID NO:78)	1	0.6

Secuencias totales = 160
 Número de variantes = 20

Alineaciones de los aminoácidos 412-423 de E2 de la base de datos de VHC de Los Alamos soportada por NIH. Se enumera el código de aminoácido de una letra para la secuencia de genotipo 1a para la secuencia de genotipo 1a prototipo para los aminoácidos 412-423 en la parte superior izquierda del diagrama en color rojo (1a). Se indica cualquier aminoácido que sea idéntico a la secuencia de 1a con un guión y se enumera el aminoácido para cualquier posición que sea diferente de la secuencia de genotipo 1a prototipo. Se enumera el número de veces que se encuentra esta secuencia de doce aminoácidos en la base de datos condensada bajo recuento y se enumera el porcentaje del total bajo porcentaje. Las secuencias de las proteínas E2 solubles 1a y 1b aparecen en color rojo.

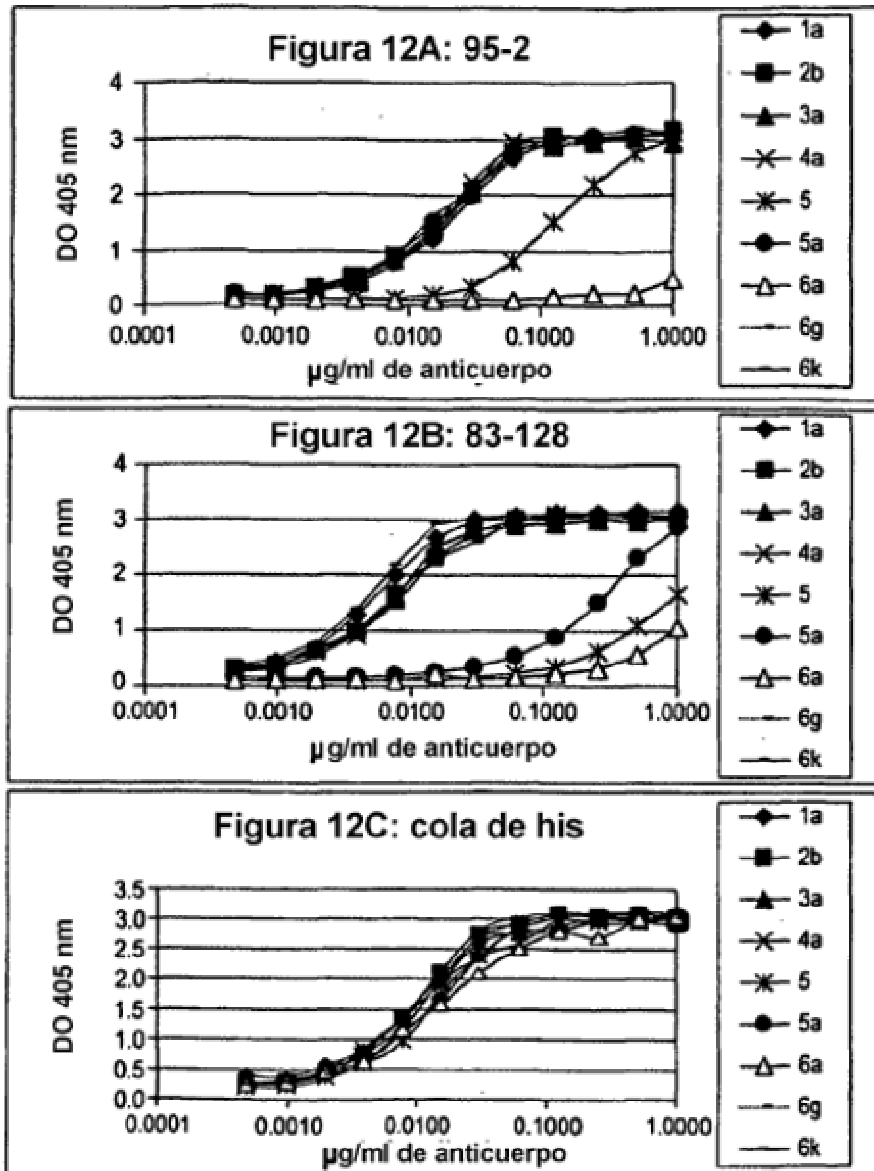
SEQ ID NO:59	Q <u>I</u> INTNGSWHIN	1a	(AF009606)
SEQ ID NO:79	H <u>I</u> VNSNGSWHIN	2b	(AY232748)
SEQ ID NO:80	Q <u>L</u> VNSSGSWHIN	3a	(AY957988)
SEQ ID NO:81	Q <u>L</u> INSNGSWHIN	4a	(Y11604)
SEQ ID NO:82	Q <u>L</u> I <u>Q</u> NGSSWHIN	5	(AY785283)
SEQ ID NO:83	Q <u>E</u> VNTNGSWHIN	5a	(Y13184)
SEQ ID NO:84	Q <u>L</u> I <u>K</u> NGSSWHIN	6a	(AY859526)
SEQ ID NO:85	Q <u>L</u> I <u>K</u> TNGSWHIN	6g	(D84264)
SEQ ID NO:86	Q <u>L</u> INSNGSWH <u>V</u> N	6k	(AY878650)

▣ = críticos para 95-2 y 83-128

■ = críticos para 83-128

Aminoácidos 412-423 de E2 de otros genotipos. Se enumera el código de aminoácido de una letra para los aminoácidos 412-423 para aislados que contenían cambios (subrayados en rojo) de la secuencia de genotipo 1a prototipo. Se enumera el nombre de genotipo a la derecha seguido por el número de registro Genbank entre paréntesis.

Fig. 11



ELISA de los aminoácidos 412-423 de E2 de otros genotipos Se recubrieron proteínas de fusión expresadas en bacterias que contenían los aminoácidos 412-423 de E2 con la secuencia del genotipo indicado sobre una placa de ELISA y se examinaron con sonda con diluciones dobles de anticuerpos HuMab 95-2 y 83-128 y anticuerpo anti-cola de seis histidinas (cola de his) de ratón. Se detectaron los anticuerpos unidos con anticuerpo de cabra anti-ser humano (95-2 y 83-128) o de cabra anti-ratón (cola de his) conjugado a fosfatasa alcalina y sustrato PNPP

Fig. 12

Secuencia de 1a H77 con codones optimizados de E1/E2 con extremos añadidos que contienen sitios de restricción (en letras minúsculas y en negrita), proyecciones adicionales para garantizar el corte por enzimas de restricción (en letras minúsculas y con subrayado), secuencia consenso Kozak (letras en minúsculas con subrayado y en negrita) y codón de iniciación ATG (letras en mayúscula con subrayado y en negrita) (SEQ ID NO:31)

cgctatagaagettgcccacc**ATG**CCACCCGGCAACCTGCCCGGCTGCTCCTTC
TCCATCTTCTGCTGGCCCTGCTGTCCTGCCTGACCGTGCCCGCCTCCGCCTACCAGGTGC
GCAACTCCTCCGGCCTGTACCACGTGACCAACGACTGCCCTAACTCCTCCATCGTGTACGA
GGCCGCCGACGCCATCCTGCACACTCCTGGCTGCGTGCCCTGCGTGCGGAGGGCAACGCC
TCCCGCTGCTGGGTGGCCGTGACTCCTACCGTGGCCACCCGCGACGGCAAGCTGCCACCA
CCCAGCTGCGCCGCCACATCGACCTGCTGGTGGGCTCCGCCACCCTGTGCTCCGCCCTGTA
CGTGGGCGACCTGTGCGGCTCCGTGTTCCGTGGTGGGCCAGCTGTTACCTTCTCTCCTCGC
CGCCACTGGACCACCCAGGACTGCAACTGCTCCATCTACCCTGGCCACATCACCGGCCACC
GCATGGCCGGGACATGATGATGAACTGGTCTCCACCGCCGCCCTGGTGGTGGCCAGCT
GCTGCGCATCCCTCAGGCCATCATGGACATGATCGCCGGCGCCCACTGGGGCGTCTCTGGCC
GGCATCGCCTACTTCTCCATGGTGGGCAACTGGGCCAAGGTGCTGGTGGTGTGCTGCTGCTGT
TCGCCGGCGTGGACGCCGAGACCCACGTGACGGGCGGCTCCGCCGGCCGACACCAGCCGG
CCTGGTGGGCCCTGTGACACCCGGCGCCAAGCAGAACATCCAGCTGATCAACACCAACGGC
TCCTGGCACATCAACTCCACCGCCCTGAACTGCAACGAGTCCCTGAACACCGGCTGGCTGG
CCGGCCTGTTCTACCAGCACAAGTCAACTCCTCCGGCTGTCCCAGCGCCTGGCCCTCCTG
CCGCCGCTGACCGACTTCGCCAGGGCTGGGGCCCTATCTCCTACGCCAACGGCTCCGGC
CTGGACGAGCGGCCCTACTGCTGGCACTACCCCTCCTCGCCCTTGCGGCATCGTGCCCGCA
AGTCCGTGTGCGGCCCTGTGTAAGTCTACTCCCTCTCCCGTGGTGGTGGGCACCACCGA
CCGCTCCGGCGCTCCACCTACTCCTGGGGCGCCAACGACACCGACCGTGTTCGTGCTGAAC
AACACCCGCCCTCCTCTGGGCAACTGGTTCGGCTGCACCTGGATGAACTCCACCGGCTTCA
CCAAGGTGTGCGGCGCGCCTCCCTGCGTGATCGGGCGGCTGGGCAACAACACCCCTGCTGTG
CCCTACCGACTGCTTCGCAAGCATCCCGAGGCCACCTACTCCCGCTGCGGCTCCGGGCCC
TGGATCACTCCTCGCTGCATGGTGGACTATCCCTACCGCTGTGGCACTATCCCTGCACCA
TCAACTACACCATCTTCAAGGTGCGCATGTACGTGGGCGGCGTGGAGCACCGCCTGGAGGC
GGCGTGCAACTGGACCCGCGGCGAGCGCTGCGACCTGGAGGACCGCGACCGCTCCGAGCTG
TCTCCTCTGCTGCTGTCCACCACCCAGTGGCAGGTGCTGCCCTGCTCCTTACCACCCCTGC
CCGCGCTGTCCACCGGCTGATCCACCTGCACCAGAACATCGTGGACGTGAGTACCTGTA
CGGCGTGGGCTCCTCCATCGCGTCTGGGCGATCAAGTGGGAGTACGTGGTGTGCTGCTGTT
CTGCTGCTGGCGGACGCGCGCGTGTGCTCCTGCTGTGGATGATGCTGCTGATCTCCAGG
CGGAGGCGtctagaggaqtca

Fig. 13

Alineaciones de aminoácidos de cadena ligera

073-1	(SEQ ID NO: 6)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA
95-38	(53)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA
95-2	(4)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA
95-14	(44)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA
83-128	(2)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA

073-1		RFSGSGGTDFLTITISLEPEDFAVYCCQQRSNWVTFGGTRLEIK
95-38		RFSGSGGTDFLTITISLEPEDFAVYCCQQRSNWVTFGGTRLEIK
95-2		RFSGSGGTDFLTITISLEPEDFAVYCCQQRSNWVTFGGTRLEIK
95-14		RFSGSGGTDFLTITISLEPEDFAVYCCQQRSNWVTFGGTRLEIK
83-128		RFSGSGGTDFLTITISLEPEDFAVYCCQQRSNWVTFGGTRLEIK

Fig. 15