



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 312 418**

51 Int. Cl.:
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01912268 .8**
96 Fecha de presentación : **12.03.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1262548**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.12.2002**

54 Título: **Polipéptido inductor de apoptosis.**

30 Prioridad: **10.03.2000 US 523095**
17.04.2000 JP 2000-115246
20.10.2000 JP 2000-321822

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2009

73 Titular/es: **CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA**
5-1, Ukima 5-chome
Kita-ku, Tokyo, 115-8543, JP

72 Inventor/es: **Fukushima, Naoshi;**
Tsuchiya, Masayuki;
Oh-Eda, Masayoshi;
Uno, Shinsuke y
Kikuchi, Yasufumi

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 312 418 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

Polipéptido inductor de apoptosis.

5 Campo técnico

Esta invención se refiere a un polipéptido reconstruido con una propiedad de inducir la apoptosis de células sanguíneas nucleadas que tienen la proteína asociada a integrina (IAP) y no causar hemaglutinación. Más específicamente, la presente invención se refiere al polipéptido reconstruido que comprende dos o más regiones V de la cadena H y dos o más regiones V de la cadena L de un anticuerpo monoclonal que induce la apoptosis de células sanguíneas nucleadas que tienen IAP. Los polipéptidos reconstruidos son útiles como un agente terapéutico para la discrasia sanguínea tal como la leucemia.

15 Antecedentes de la invención

La solicitud de patente japonesa 9-67499 describe la preparación de un anticuerpo monoclonal específico usando una línea de células estromales esplénicas como un antígeno sensibilizador dirigido al desarrollo de anticuerpos específicos que pueden reconocer las células estromales esplénicas mencionadas, y la preparación de nuevos anticuerpos monoclonales que reconocen la proteína asociada a integrina de ratón (IAP de ratón) como un antígeno. La solicitud japonesa 9-67499 también describe que los anticuerpos monoclonales son capaces de inducir apoptosis de células mieloides.

El documento WO 99/12973 describe anticuerpos monoclonales cuyo antígeno es la proteína asociada a integrina humana (en lo sucesivo denominada IAP humana; su secuencia de aminoácidos y secuencia de nucleótidos están descritas en *J. Cell Biol.*, 123, 485-496, 1993; véase también *Journal of Cell Science*, 108, 3419-3425, 1995) y que son capaces de inducir la apoptosis de células sanguíneas nucleadas humanas (célula mieloides y linfocito) que tienen dicha IAP humana. Estos anticuerpos monoclonales se denominan anticuerpo MABL-1 y anticuerpo MABL-2, y los hibridomas que producen estos anticuerpos también se denominan MABL-1 (FERM BP-6100) y MABL-2 (FERM BP-6101), respectivamente.

La solicitud de patente japonesa 11-63557 describe la preparación de Fv de cadena sencilla que tienen regiones de Fv de cadena sencilla de los anticuerpos monoclonales cuyo antígeno es la IAP humana. Los Fv de cadena sencilla pueden inducir la apoptosis de células sanguíneas nucleadas que tienen IAP humana.

El anticuerpo monoclonal que reconoce la IAP como un antígeno induce la apoptosis de células sanguíneas nucleadas que tienen IAP humana, pero también produce hemaglutinación *in vitro*. Esto indica que la administración de una gran cantidad del anticuerpo monoclonal que reconoce la IAP como un antígeno, puede dar como resultado un efecto secundario como la hemaglutinación.

40 Descripción de la invención

Un objeto de esta invención es proporcionar polipéptidos reconstruidos con propiedad mejorada de inducción de la apoptosis de células sanguíneas nucleadas que tienen la proteína asociada a integrina (IAP) y con la propiedad de causar hemaglutinación reducida o completamente eliminada. Otro objeto de la presente invención es proporcionar agentes terapéuticos para la discrasia sanguínea, que comprenden la sustancia antes obtenida que induce la apoptosis de células sanguíneas nucleadas que tienen la proteína asociada a integrina (IAP).

Por lo tanto, la presente invención se refiere a los polipéptidos reconstruidos que se unen a la proteína asociada a integrina (IAP), inducen la apoptosis de células sanguíneas nucleadas que tienen IAP y no producen hemaglutinación.

La invención también se refiere a los polipéptidos reconstruidos, anticuerpos reformados.

El anticuerpo reformado puede incluir cualquier polipéptido reconstruido que comprenda una región V de la cadena L y una región V de la cadena H derivadas de un anticuerpo monoclonal, p. ej. el anticuerpo MABL-1, el anticuerpo MABL-2 o similares, que induce la apoptosis de células sanguíneas nucleadas que tienen IAP, preferiblemente IAP humana, cuyo polipéptido induce la apoptosis de células sanguíneas nucleadas que tienen IAP, preferiblemente IAP humana y no produce hemaglutinación. Además, la presente invención también incluye polipéptidos reconstruidos en los que una secuencia de aminoácidos de la región V está parcialmente alterada.

La presente invención también se refiere a la humanización del polipéptido reconstruido. El polipéptido reconstruido humanizado comprende una región V de la cadena L humanizada y/o una región V de la cadena H humanizada. Específicamente, el polipéptido humanizado de la invención consiste en la región V de la cadena L humanizada que comprende una región marco (FR) derivada de una región V de la cadena L del anticuerpo monoclonal humano y una CDR derivada de una región V de la cadena L de anticuerpo monoclonal de ratón y/o la región V de la cadena H humanizada que comprende una FR derivada de una región V de la cadena H de anticuerpo monoclonal humano y una CDR derivada de una región V de la cadena H de anticuerpo monoclonal de ratón. En este caso, las secuencias de aminoácidos de la FR o CDR pueden estar parcialmente alteradas, p. ej., eliminadas, sustituidas o añadidas.

ES 2 312 418 T3

Además, la presente invención se refiere a polipéptidos reconstruidos que pueden inducir apoptosis de células sanguíneas nucleadas que tienen IAP humana, cuyos polipéptidos comprenden una región C de la cadena L de anticuerpos humanos y una región V de la cadena L de anticuerpos monoclonales de ratón, y/o una región C de la cadena H de anticuerpos humanos y una región V de la cadena H de anticuerpos monoclonales de ratón.

5

La presente invención también se refiere a polipéptidos reconstruidos que inducen la apoptosis de células sanguíneas nucleadas que tienen IAP humana, cuyos polipéptidos comprenden una CDR derivada de un anticuerpo monoclonal de otros mamíferos distintos del ratón, tal como un ser humano, rata, animal bovino, oveja o similares, que corresponde a la CDR de ratón mencionada, o una región V de la cadena L y una región V de la cadena H que contiene la CDR mencionada. Dichas CDR, regiones V de la cadena L y regiones V de la cadena H pueden incluir CDR derivadas de un anticuerpo monoclonal humano preparado a partir de, por ejemplo, un ratón transgénico o similar, y regiones V de la cadena L y regiones V de la cadena H derivadas de un anticuerpo monoclonal humano que contiene la CDR mencionada.

10

15 La invención también se refiere a ADN que codifican los diferentes polipéptidos reconstruidos mencionados antes y a técnicas de ingeniería genética para producir vectores recombinantes que comprenden los ADN.

La invención también se refiere a células huésped transformadas con los vectores recombinantes. Los ejemplos de células huésped son células de mamíferos tales como células humanas, células de ratón o similares, y microorganismos tales como *E. coli*, *Bacillus subtilis*, levaduras o similares.

20

La invención se refiere a un procedimiento para producir los polipéptidos reconstruidos, que comprende cultivar los huéspedes mencionados antes y extraer los polipéptidos reconstruidos del cultivo de los mismos.

25

La presente invención se refiere además a un procedimiento para producir un dímero del Fv de cadena sencilla, que comprende cultivar células animales huésped que producen el Fv de cadena sencilla en un medio sin suero para que segreguen el Fv de cadena sencilla en el medio, y aislar el dímero de Fv de cadena sencilla formado en el medio.

La presente invención se refiere a agentes terapéuticos para la discrasia sanguínea que comprenden como un principio activo el polipéptido reconstruido obtenido antes, que induce la apoptosis de células sanguíneas nucleadas que tienen la proteína asociada a integrina (IAP). Los agentes terapéuticos para la discrasia sanguínea de la invención son útiles para el tratamiento de la discrasia sanguínea, por ejemplo, leucemia tal como leucemia mieloide aguda, leucemia mielógena crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfoblástica crónica, leucemia de células T en adultos, mieloma múltiple, leucemia mixta y leucemia de células pilosas, linfoma maligno (enfermedad de Hodgkin, linfoma de no Hodgkin), anemia aplásica, síndrome mielodisplásico y policitemia vera.

30

35

Los polipéptidos reconstruidos de la presente invención preferiblemente comprenden dos regiones V de la cadena H y dos regiones V de la cadena L derivadas de anticuerpos monoclonales. La estructura de los polipéptidos reconstruidos puede ser un dímero de Fv de cadena sencilla que comprende una región V de la cadena H y una región V de la cadena L o un polipéptido que comprende dos regiones V de la cadena H y dos regiones V de la cadena L. En los polipéptidos reconstruidos de la invención, la región V de la cadena H y la región V de la cadena L están preferiblemente unidas por un conector peptídico que consiste en uno o más aminoácidos. Los polipéptidos reconstruidos resultantes contienen regiones variables de los anticuerpos originales y retienen su región determinante de la complementariedad (CDR), y por lo tanto se unen al antígeno con la misma especificidad que los anticuerpos monoclonales originales.

40

45

Región V de la cadena H

En la presente invención, la región V de la cadena H derivada del anticuerpo monoclonal puede ser la región V de la cadena H del anticuerpo monoclonal que induce la apoptosis de células sanguíneas nucleadas que tienen IAP o la región V de la cadena H cuya secuencia de aminoácidos está parcialmente modificada, preferiblemente la región V de la cadena H del anticuerpo monoclonal que reconoce la IAP humana y que induce la apoptosis de células sanguíneas nucleadas que tienen IAP o la región V de la cadena H cuya secuencia de aminoácidos está parcialmente modificada. Preferiblemente, es la región V de la cadena H derivada del anticuerpo MABL-1 o el anticuerpo MABL-2, o la región V de la cadena H en la que la secuencia de aminoácidos de la región V de la cadena H está parcialmente modificada. Más preferiblemente, es la región V de la cadena H humanizada que comprende la FR de una región V de la cadena H de anticuerpo monoclonal humano, y la CDR de la región V de la cadena H de anticuerpo monoclonal de ratón. La región V de la cadena H además puede ser una región V de la cadena H derivada de un anticuerpo monoclonal humano que corresponde a la región V de la cadena H mencionada del anticuerpo monoclonal de ratón, que se puede producir por una técnica de recombinación. La región V de la cadena H de la invención puede ser un fragmento de la región V de la cadena H mencionada, cuyo fragmento conserva la capacidad de unión al antígeno.

50

55

60

Región V de la cadena L

La región V de la cadena L de la presente invención puede ser la región V de la cadena L del anticuerpo monoclonal que induce la apoptosis de células sanguíneas nucleadas que tienen IAP o la región V de la cadena L en la que la secuencia de aminoácidos de la región V de la cadena L está parcialmente modificada, preferiblemente la región V de la cadena L del anticuerpo monoclonal que reconoce la IAP humana y que induce la apoptosis de células sanguíneas nucleadas que tienen IAP o la región V de la cadena L cuya secuencia de aminoácidos está parcialmente modificada.

65

ES 2 312 418 T3

Preferiblemente, es la región V de la cadena L derivada del anticuerpo MABL-1 o el anticuerpo MABL-2, o su región V de la cadena L cuya secuencia de aminoácidos está parcialmente modificada. Más preferiblemente, es la región V de la cadena L humanizada que comprende la FR de una región V de la cadena L de anticuerpo monoclonal humano, y la CDR de la región V de la cadena L de anticuerpo monoclonal de ratón. Las regiones V de la cadena L además pueden ser una región V de la cadena L derivada de anticuerpo monoclonal humano que corresponde a la región V de la cadena L mencionada del anticuerpo monoclonal de ratón, que se puede producir por una técnica de recombinación. Las regiones V de la cadena L de la invención pueden ser fragmentos de la región V de la cadena L mencionada, cuyos fragmentos conservan la capacidad de unión al antígeno.

10 *Región determinante de la complementaridad (CDR)*

Cada región V de la cadena L y la cadena H forma un sitio de unión al antígeno. La región variable de las cadenas L y H está compuesta de cuatro regiones marco comunes conservadas comparativamente unidas a tres regiones hipervariables o regiones determinantes de la complementaridad (Kabat, E.A. y col., "Sequences of Protein of Immunological Interest", US Dept. Health and Human Services, 1983).

Las partes principales en las cuatro regiones marco (FR) forman estructuras de lámina β y así tres CDR forman un bucle. Las CDR pueden formar una parte de la estructura de lámina β en determinados casos. Las tres CDR se mantienen en posiciones estéricamente cercanas entre sí mediante las FR, que contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno junto con las tres CDR.

Estas CDR se pueden identificar comparando la secuencia de aminoácidos de la región V del anticuerpo obtenido con las secuencias de aminoácidos de las regiones V de anticuerpos conocidos de acuerdo con la norma empírica de Kabat E.A. y col., "Sequences of Protein of Immunological Interest".

Fv de cadena sencilla

Un Fv de cadena sencilla es un monómero polipéptido que comprende una región V de la cadena H y una región V de la cadena L unidas entre sí, que derivan de anticuerpos monoclonales. Los Fv de cadena sencilla resultantes contienen regiones variables de los anticuerpos monoclonales originales y conservan sus regiones determinantes de la complementaridad, y por lo tanto los Fv de cadena sencilla se unen al antígeno con la misma especificidad que la de los anticuerpos monoclonales originales (solicitud japonesa 11-63557). Una parte de la región variable y/o la CDR del Fv de cadena sencilla de la invención o una parte de la secuencia de aminoácidos de las mismas pueden estar parcialmente alterados, por ejemplo, eliminada, sustituida o añadida. La región V de la cadena H y la región V de la cadena L que componen el Fv de cadena sencilla de la invención se han mencionado antes, y pueden estar unidas directamente o por un conector, preferiblemente un conector peptídico. La constitución del Fv de cadena sencilla puede ser [región V de la cadena H]-[región V de la cadena L] o [región V de la cadena L]-[región V de la cadena H]. En la presente invención, el Fv de cadena sencilla puede formar un dímero, trímero o puede ser un tetrámero incluido en el polipéptido reconstruido de la invención.

45 *Polipéptido reconstruido de cadena sencilla*

Los polipéptidos reconstruidos de cadena sencilla de la presente invención que comprenden dos o más regiones V de la cadena H y dos o más regiones V de la cadena L, comprenden dos o más regiones V de la cadena H y regiones V de la cadena L, como se ha mencionado antes. Cada región del péptido debe estar dispuesta de modo que el polipéptido reconstruido de cadena sencilla forme una estructura estérica específica, en concreto que mimetice una estructura estérica formada por el dímero de Fv de cadena sencilla. Por ejemplo, las regiones V están dispuestas ordenadas de la siguiente forma:

[región V de la cadena H]-[región V de la cadena L]-[región V de la cadena H]-[región V de la cadena L]; o

55 [región V de la cadena L]-[región V de la cadena H]-[región V de la cadena L]-[región V de la cadena H];

en las que estas regiones están conectadas por un conector peptídico, respectivamente.

60 *Conector*

En esta invención, los conectores para la conexión entre la región V de la cadena H y la región V de la cadena L puede ser cualquier conector peptídico que se pueda introducir por un procedimiento de ingeniería genética o cualquier conector químicamente sintetizado. Por ejemplo, se pueden usar los conectores descritos en la bibliografía, p. ej., *Protein Engineering*, 9(3), 299-305, 1996. Los ejemplos de los conectores peptídicos pueden incluir, por ejemplo:

Ser**Gly-Ser**

5

Gly-Gly-Ser**Ser-Gly-Gly**

10

Gly-Gly-Gly-Ser**Ser-Gly-Gly-Gly**

15

Gly-Gly-Gly-Gly-Ser**Ser-Gly-Gly-Gly-Gly**

20

Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser**Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly**

25

Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser**Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly**

30

(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_n y**(Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)_n**

35 en los que n es un número entero no menor de 1. La longitud del conector peptídico está en el intervalo de 1 a 15 aminoácidos, preferiblemente 2 a 12 aminoácidos, más preferiblemente 3 a 10 aminoácidos. Se mencionan procedimientos para introducir estos conectores en la explicación del ADN que codifica el polipéptido reconstruido de la invención.

40 Los conectores sintetizados químicamente, es decir, los agentes químicos de reactividad cruzada, de acuerdo con la invención pueden ser cualesquiera conectores usados de forma convencional para la unión de péptidos. Los ejemplos de conectores pueden incluir N-hidroxi-succinimida (NHS), suberato de disuccinimidilo (DSS), bis(sueroato de sulfosuccinimidilo) (BS³), ditiobis(propionato de succinimidilo) (DSP), ditiobis(propionato de sulfosuccinimidilo) (DTSSP), etilenglicol-bis(succinato de succinimidilo) (EGS), etilenglicol-bis(succinato de sulfosuccinimidilo) (sulfo-EGS), tartrato de disuccinimidilo (DST), tartrato de disulfosuccinimidilo (sulfo-DST), bis[2-(succinimido-oxicarbo-

45 niloxi)etil]sulfona (BSOCOES), bis[2-(sulfosuccinimido-oxicarbonilo)etil]sulfona (sulfo-BSOCOES) o similares. Estos están disponibles en el comercio.

50 Para formar un dímero del Fv de cadena sencilla se prefiere seleccionar un conector adecuado para que dimerice en solución tal como un medio de cultivo, más de 20%, preferiblemente más de 50%, más preferiblemente más de 80%, lo más preferiblemente más de 90% del Fv de cadena sencilla producido en las células huésped. Específicamente, se prefiere un conector compuesto de 2 a 12 aminoácidos, preferiblemente de 3 a 10 aminoácidos u otros conectores que se correspondan con estos.

55 *Preparación de polipéptidos reconstruidos*

60 Los polipéptidos reconstruidos que se unen a células con IAP humana se pueden obtener conectando una región V de la cadena H y una región V de la cadena L derivadas de anticuerpos monoclonales contra la IAP humana a través del conector mencionado. Los ejemplos de Fv de cadena sencilla son MABL1-scFv que comprende la región V de la cadena H y la región V de la cadena L derivadas del anticuerpo MABL-1, y MABL2-scFv que comprende la región V de la cadena H y la región V de la cadena L derivadas del anticuerpo MABL-2.

65 Para preparar el polipéptido reconstruido, se puede unir un péptido señal al extremo N-terminal del polipéptido si se desea que el polipéptido sea un péptido secretorio. Se puede unir una secuencia de aminoácidos conocida útil para la purificación del polipéptido tal como la secuencia FLAG, para la purificación eficaz del polipéptido. El polipéptido se puede purificar de forma eficaz con el anticuerpo anti-FLAG.

ES 2 312 418 T3

Para preparar el polipéptido reconstruido de la invención hay que obtener un ADN que codifica el polipéptido reconstruido, es decir un ADN que codifica el Fv de cadena sencilla o un ADN que codifica el monómero del polipéptido reconstruido. Estos ADN se pueden obtener a partir de los ADN que codifican la región V de la cadena H y la región V de la cadena L de MABL1-scFv y/o MABL2-scFv. También se pueden obtener por amplificación de una ADN que codifica la secuencia de aminoácidos deseada dentro de la secuencia mencionada por PCR usando el ADN como un molde y una pareja de cebadores correspondientes a ambos extremos de la misma.

En el caso de que se desee que cada región V tenga la secuencia de aminoácidos parcialmente modificada, las regiones V en las que se modifican, es decir, eliminan, sustituyen o añaden, uno o más aminoácidos, se pueden obtener por un procedimiento conocido en la técnica usando la PCR. Una parte de la secuencia de aminoácidos en la región V preferiblemente se modifica por la PCR conocida en la técnica con el fin de preparar el polipéptido reconstruido que sea suficientemente activo contra el antígeno específico.

Para determinar los cebadores para la amplificación por PCR, es necesario decidir el tipo de cadena H y cadena L del anticuerpo MABL-1 y/o anticuerpo MABL-2. Sin embargo, se ha publicado que el anticuerpo MABL-1 tiene cadenas L de tipo κ y cadenas H de tipo $\gamma 1$ y el anticuerpo MABL-2 tiene cadenas L de tipo κ y cadenas H de tipo $\gamma 2a$ (solicitud JP 11-63557). Para la amplificación por PCR del ADN que codifica la cadena H y la cadena L del anticuerpo MABL-1 y/o el anticuerpo MABL-2, se pueden usar los cebadores descritos por Jones, S.T. y col., *Bio/Technology*, 9, 88-89, 1991.

Para amplificar las regiones V de la cadena L del anticuerpo MABL-1 y el anticuerpo MABL-2 usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), los cebadores oligonucleótidos del extremo 5' y extremo 3' se deciden como se ha mencionado antes. De la misma forma, se deciden los cebadores oligonucleótidos del extremo 5' y extremo 3' para la amplificación de las regiones V de la cadena H del anticuerpo MABL-1 y anticuerpo MABL-2.

En realizaciones de la invención se usan los cebadores del extremo 5' que contienen una secuencia "GANTC" que proporciona el sitio de digestión de la enzima de restricción Hinf I en las proximidades de su extremo 5' y se usan los cebadores del extremo 3' que contienen una secuencia de nucleótidos "CCCGGG" que proporciona el sitio de digestión de XmaI en las proximidades de su extremo 5'. Se pueden usar otros sitios de digestión de enzimas de restricción en lugar de estos sitios, siempre que se usen para la subclonación de un fragmento de ADN deseado en un vector de clonación.

Se usan cebadores específicamente diseñados para la PCR para que proporcionen las secuencias de nucleótidos adecuadas en el extremo 5' y el extremo 3' de los ADNc que codifican las regiones V de los anticuerpos MABL-1 y MABL-2, de modo que los ADNc se insertan fácilmente en el vector de expresión y funcionan adecuadamente en el vector de expresión (p. ej., esta invención planea aumentar la eficacia de la transcripción insertando la secuencia Kozak). Las regiones V de los anticuerpos MABL-1 y MABL-2 obtenidas por amplificación por PCR usando estos cebadores se insertan en el vector de expresión HEF que contiene la región C humana deseada (véase el documento WO 92/19759). Los ADN clonados se pueden secuenciar usando cualquier procedimiento convencional que comprenda, por ejemplo, insertar los ADN en un vector adecuado y después secuenciar usando un secuenciador de ADN automático (Applied Biosystems).

Se puede introducir un conector tal como un conector peptídico en el polipéptido reconstruido de la invención de la siguiente forma. Se diseñan cebadores que tienen secuencia parcialmente complementaria con los cebadores para las regiones V de la cadena H y las regiones V de la cadena L descritas antes y que codifican el extremo N-terminal y el extremo C-terminal del conector. Después, se puede llevar a cabo el procedimiento de la PCR usando estos cebadores para preparar un ADN que codifica el conector peptídico que tiene la secuencia y longitud de aminoácidos deseados. Los ADN que codifican la región V de la cadena H y la región V de la cadena L se pueden conectar por el ADN resultante para producir el ADN que codifica el polipéptido reconstruido de la invención que tiene el conector peptídico deseado. Una vez que se ha preparado el ADN que codifica uno de los polipéptidos reconstruidos, los ADN que codifican los polipéptidos reconstruidos con o sin el conector peptídico deseado se pueden producir fácilmente diseñando diferentes cebadores para el conector y después llevando a cabo la PCR usando los cebadores y el ADN mencionado como molde.

Cada región V del polipéptido reconstruido de la presente invención se puede humanizar usando técnicas convencionales (p. ej., Sato, K. y col., *Cancer Res.*, 53, 851-856 (1993)). Una vez que se ha preparado un ADN que codifica cada uno de los Fv humanizados, se puede producir fácilmente un Fv de cadena sencilla humanizado, un fragmento del Fv de cadena sencilla humanizado, un anticuerpo monoclonal humanizado y un fragmento del anticuerpo monoclonal humanizado, de acuerdo con procedimientos convencionales. Preferiblemente las secuencias de aminoácidos de sus regiones V se pueden modificar parcialmente, si es necesario.

Además, se puede producir un ADN derivado de otro origen mamífero, por ejemplo, un ADN de ser humano, de la misma forma usada para producir el ADN que codifica la región V de la cadena H y la región V de la cadena L derivadas de ratón, mencionada antes. El ADN resultante se puede usar para preparar una región V de la cadena H y una región V de la cadena L de otro mamífero, en especial de origen humano, un Fv de cadena sencilla derivado de ser humano y un fragmento del mismo, y un anticuerpo monoclonal de origen humano y un fragmento del mismo.

ES 2 312 418 T3

Como se ha mencionado antes, cuando se preparan los ADN objetivo que codifican las regiones V de los polipéptidos reconstruidos y las regiones V de los polipéptidos reconstruidos humanizados, los vectores de expresión que los contienen y los huéspedes transformados con los vectores se pueden obtener de acuerdo con procedimientos convencionales. Además, los huéspedes se pueden cultivar de acuerdo con un procedimiento convencional para producir el Fv de cadena sencilla reconstruido, el Fv de cadena sencilla humanizado reconstruido, los anticuerpos monoclonales humanizados y los fragmentos de los mismos. Se pueden aislar de células o un medio y se pueden purificar en una masa homogénea. Para este propósito, se puede usar cualquier procedimiento de aislamiento y purificación usados de forma convencional para proteínas, p. ej., cromatografía, ultrafiltración, precipitación por adición de sal y diálisis, si es necesario en combinación, sin limitación.

Cuando el Fv de cadena sencilla reconstruido de la presente invención se produce por cultivo de una célula animal tal como células COS7 o células CHO, preferiblemente células CHO, en un medio sin suero, el Fv de cadena sencilla reconstruido se hace dimerizar eficazmente en el medio. El dímero del Fv de cadena sencilla formado antes se puede aislar de forma estable y eficaz y conservar durante un periodo de tiempo largo en la forma de dímero. El medio sin suero usado en la invención puede ser cualquier medio usado de forma convencional para la producción de una proteína recombinante, sin limitación.

Para producir los polipéptidos reconstruidos que se unen a células con IAP humana de la presente invención, se puede usar cualquier sistema de expresión, por ejemplo, células eucariotas, tales como células animales, p. ej., líneas de células de mamífero establecidas, hongos filamentosos y levaduras, y células procariotas tales como células bacterianas, p. ej. *E. coli*. Preferiblemente, los polipéptidos reconstruidos de la invención se expresan en células de mamíferos, por ejemplo células COS7 o células CHO.

En estos casos, se pueden usar promotores convencionales útiles para la expresión en células de mamíferos. Preferiblemente, se usa el promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano (HCMV). Los vectores de expresión que contienen el promotor de HCMV incluyen HCMV-VH-HC γ 1, HCMV-VL-HCK y similares que derivan de pSV2neo (documento WO92/19759).

Además, otros promotores para la expresión de genes en células de mamíferos que se pueden usar en la invención incluyen promotores de virus derivados de retrovirus, poliomavirus, adenovirus y virus de simio 40 (SV40) y promotores derivados de mamíferos tales como el factor de elongación de la cadena polipeptídica humano 1 α (HEF-1 α). El promotor de SV40 se puede usar fácilmente de acuerdo con el procedimiento de Mulligan, R.C., y col. (*Nature* 277, 108-114 (1979)) y el promotor de HEF-1 α también se puede usar de acuerdo con los procedimientos de Mizushima, S. y col. (*Nucleic Acids Research*, 18, 5322 (1990)).

El origen de replicación (ori) que se puede usar en la invención incluye el ori derivado de SV40, poliomavirus, adenovirus, virus del papiloma bovino (BPV) y similares. Para el propósito de la amplificación del número de copias de genes en el sistema de células huésped y similares, un vector de expresión puede contener, como marcador de selección, el gen de la fosfotransferasa (3') II o I (neo), el gen de la timidina quinasa (TK), el gen de la xantina fosforribosil transferasa de *E. coli* (Ecogpt) o el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR).

La actividad de unión al antígeno del polipéptido reconstruido preparado antes, se puede evaluar usando la capacidad inhibitoria de la unión de los anticuerpos de ratón, MABL-1 y MABL-2, a la IAP humana como un índice. En concreto, la actividad se evalúa en términos de la ausencia o presencia de inhibición de la unión del anticuerpo MABL-2 de ratón al antígeno IAP humano como un índice.

Más en detalle, se cultivan células animales transformadas con un vector de expresión que contiene un ADN que codifica el polipéptido reconstruido de la invención, p. ej., células COS7 o células CHO. Las células cultivadas y/o el líquido sobrenadante del medio o el polipéptido reconstruido purificado de los mismos, se usan para determinar la unión al antígeno. Como control se usa un líquido sobrenadante del medio de cultivo en el que se han cultivado células transformadas sólo con el vector de expresión. Se añade una muestra de ensayo del polipéptido reconstruido de la invención o el líquido sobrenadante del control a la línea de células de leucemia de ratón, células L1210, que expresan la proteína asociada a integrina (IAP) humana y después se lleva a cabo un ensayo, tal como citometría de flujo, para evaluar la actividad de unión al antígeno.

El efecto inductor de apoptosis *in vitro* se evalúa de la siguiente forma: se añade una muestra de ensayo del polipéptido reconstruido anterior a las células en las que se ha introducido el gen de la IAP humana y se evalúa su capacidad de inducción de muerte celular específica de IAP humana en las células.

El efecto inductor de apoptosis *in vivo* se evalúa de la siguiente forma: se prepara un moldeo de ratón de mieloma humano. Se administra al ratón por vía intravenosa el anticuerpo monoclonal o el polipéptido reconstruido de la invención que induce apoptosis de células sanguíneas nucleadas que tienen IAP. A los ratones de un grupo de control se les administra solo PBS. La inducción de apoptosis se evalúa en términos de efecto antitumoral basado en el cambio de contenido de IgG humana en el suero del ratón y en su tiempo de supervivencia.

El efecto de hemaglutinación se ensaya de la siguiente forma: se prepara una suspensión de eritrocitos de sangre de donantes sanos. Se añaden muestras de ensayo de diferentes concentraciones a la suspensión, y después se incuban para determinar la hemaglutinación.

ES 2 312 418 T3

Los polipéptidos reconstruidos de la invención, que comprenden dos o más regiones V de la cadena H y dos o más regiones V de la cadena L, pueden ser un dímero, trímero o tetrámero del Fv de cadena sencilla que comprende una región V de la cadena H y una región V de la cadena L, o un polipéptido en el que dos o más regiones V de la cadena H y dos o más regiones V de la cadena L están conectadas. Se considera que debido a esta construcción, el péptido imita la estructura tridimensional del sitio de unión al antígeno del anticuerpo monoclonal original y por lo tanto retiene una excelente propiedad de unión al antígeno.

El polipéptido de la invención tiene una movilidad superior a los tejidos o tumores frente a la IgG entera y un efecto secundario notablemente menor o no tiene efecto de hemaglutinación. Por lo tanto, se espera que el péptido de la invención se pueda usar como un agente terapéutico para la discrasia sanguínea, por ejemplo, leucemia tal como leucemia mieloide aguda, leucemia mielógena crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfoblástica crónica, leucemia de células T en adultos, mieloma múltiple, leucemia mixta y leucemia de células pilosas, linfoma maligno (enfermedad de Hodgkin, linfoma de no Hodgkin), anemia aplásica, osteomielodisplasia y policitemia vera. Se espera además que el péptido de la invención se pueda usar como un agente de contraste por marcaje RI. El efecto del péptido se puede potenciar por unión de un compuesto RI o una toxina.

Mejor modo para llevar a cabo la invención

La presente invención se ilustrará concretamente con referencia a los siguientes ejemplos, los cuales no limitan de ninguna forma el alcance de la invención.

Para ilustrar el procedimiento de producción de los polipéptidos reconstruidos de la invención, a continuación se muestran ejemplos de producción de Fv de cadena sencilla. Se usaron anticuerpos de ratón frente a IAP humana, MABL-1 y MABL-2, en los ejemplos de producción de polipéptidos reconstruidos. Los hibridomas MABL-1 y MABL-2 que los producen respectivamente se depositaron internacionalmente como FERM BP-6100 y FERM BP-6101 en el Instituto Nacional de Biociencia y Tecnología Humana, Agencia de Ciencia Industrial y Tecnología, Ministerio de Comercio Internacional e Industria (1-3 Higasi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japón), un depositario para microorganismos autorizado, el 11 de septiembre de 1997.

Ejemplo 1

Clonación de los ADN que codifican la región V de anticuerpos monoclonales de ratón frente a IAP humana

Los ADN que codifican las regiones variables de los anticuerpos monoclonales de ratón frente a IAP humana, MABL-1 y MABL-2, se clonaron como sigue.

1.1 Preparación del ARN mensajero (ARNm)

Los ARNm de los hibridomas MABL-1 y MABL-2 se obtuvieron usando el kit de purificación de ARNm (Pharmacia Biotech).

1.2 Síntesis de ADNc bicatenario

El ADNc bicatenario se sintetizó a partir de aproximadamente 1 μ g del ARNm usando el kit de amplificación de ADNc Marathon (CLONTECH) y se unió un adaptador al mismo.

1.3 Amplificación por PCR de genes que codifican regiones variables de un anticuerpo por

PCR, se llevó a cabo usando un ciclador térmico (PERKIN ELMER).

(1) Amplificación de un gen que codifica la región V de la cadena L de MABL-1

Los cebadores usados para el procedimiento de la PCR son el cebador adaptador-1 (CLONTECH) mostrado en el ID SEC N° 1, que hibrida con una secuencia parcial del adaptador, y el cebador MKC (región constante kappa de ratón) (Bio/Technology, 9, 88-89, 1991) mostrado en el ID SEC N° 2, que hibrida con la región V de la cadena L de tipo kappa de ratón.

50 μ l de solución para la PCR contienen 5 μ l de 10 x tampón para la PCR II, MgCl₂ 2 mM, dNTP 0,16 mM (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), 2,5 unidades de una ADN polimerasa, AmpliTaq Gold (PERKIN ELMER), 0,2 μ M del cebador adaptador del ID SEC N° 1, 0,2 μ M del cebador MKC del ID SEC N° 2 y 0,1 μ g del ADNc bicatenario derivado de MABL-1. La solución se precalentó a 94°C de temperatura inicial durante 9 minutos y después se calentó a 94°C durante 1 minuto, a 60°C durante 1 minuto y a 72°C durante 1 minuto 20 segundos, en este orden. Este ciclo de temperatura se repitió 35 veces y después la mezcla de reacción se calentó más a 72°C durante 10 minutos.

ES 2 312 418 T3

(2) Amplificación del ADNc que codifican la región V de la cadena H de MABL-1

Se usaron el cebador adaptador-1 mostrado en el ID SEC N° 1, y el cebador MHC- γ 1 (región constante de cadena pesada de ratón) (Bio/Technology, 9, 88-89, 1991) mostrado en el ID SEC N° 3, como cebadores para la PCR.

La amplificación del ADNc se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento de amplificación del gen de la región V de la cadena L, que se ha descrito en el Ejemplo 1.3-(1), excepto que se usó 0,2 μ M del cebador MHC- γ 1 en lugar de 0,2 μ M del cebador MKC.

(3) Amplificación del ADNc que codifica la región V de la cadena L de MABL-2

Se usaron el cebador adaptador-1 del ID SEC N° 1, y el cebador MKC del ID SEC N° 2, como cebadores para la PCR.

La amplificación del ADNc se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento de amplificación del gen de la región V de la cadena L de MABL-1 que se ha descrito en el Ejemplo 1.3-(1), excepto que se usó 0,1 μ g de ADNc bicatenario derivado de MABL-2 en lugar de 0,1 μ g de ADNc bicatenario de MABL-1.

(4) Amplificación del ADNc que codifican la región V de la cadena H de MABL-2

Se usaron el cebador adaptador-1 del ID SEC N° 1, y el cebador MHC- γ 2a (Bio/Technology, 9, 88-89, 1991) mostrado en el ID SEC N° 4, como cebadores para la PCR.

La amplificación del ADNc se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento de amplificación del gen de la región V de la cadena L, que se ha descrito en el Ejemplo 1.3-(3), excepto que se usó 0,2 μ M del cebador MHC- γ 2a en lugar de 0,2 μ M del cebador MKC.

1.4 Purificación de los productos de la PCR

El fragmento de ADN amplificado por la PCR como se ha descrito antes, se purificó usando el kit de purificación de la PCR QIAquick (QIAGEN) y se disolvió en Tris-HCl 10 mM (pH 8,0) que contenía EDTA 1 mM.

1.5. Ligado y transformación

Se ligaron aproximadamente 140 ng del fragmento de ADN que comprendía el gen que codifica la región V de la cadena L de tipo kappa de ratón derivada de MABL-1 como se ha preparado antes, con 50 ng del vector pGEM-T Easy (Promega) en el tampón de reacción que comprendía Tris-HCl 30 mM (pH 7,8), MgCl₂ 10 mM, ditiotreitól 10 mM, ATP 1 mM y 3 unidades de ADN ligasa T4 (Promega) a 15°C durante 3 horas.

Después, se añadió 1 μ l de la mezcla de reacción a 50 μ l de células competentes DH α 5 de *E. coli* (Toyobo Inc.) y las células se almacenaron en hielo durante 30 minutos, se incubaron a 42°C durante 1 minuto y se almacenaron en hielo durante 2 minutos otra vez. Se añadieron 100 μ l de medio SOC (GIBCO BRL). Las células de *E. coli* se pusieron en placa en medio agar LB (Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Sambrook y col., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) que contenía ampicilina 100 μ g/ml (SIGMA) y se cultivaron a 37°C toda la noche para obtener el transformante de *E. coli*.

El transformante se cultivó en 3 ml de medio LB que contenía ampicilina 50 μ g/mol a 37°C toda la noche y el ADN plasmídico se preparó a partir del cultivo usando el kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN).

El plásmido resultante que comprendía el gen que codifica la región V de la cadena L de tipo Kappa de ratón derivada del hibridoma MABL-1 se denominó pGEM-M1L.

De la misma forma descrita antes, se preparó un plásmido que comprendía el gen que codifica la región V de la cadena H de ratón derivada del hibridoma MABL-1, a partir del fragmento de ADN purificado y se denominó pGEM.M1H.

Se preparó un plásmido que comprendía el gen que codifica la región V de la cadena L de tipo kappa de ratón derivada del hibridoma MABL-2, a partir del fragmento de ADN purificado y se denominó pGEM-M2L.

Se preparó un plásmido que comprendía el gen que codifica la región V de la cadena H de ratón derivada del hibridoma MABL-2 a partir del fragmento de ADN purificado y se denominó pGEM-M2H.

ES 2 312 418 T3

Ejemplo 2

Secuenciación del ADN

5 La secuencia de nucleótidos del ADNc que codifica la región en los plásmidos mencionados antes se determinó usando el Auto DNA Sequencer (Applied Biosystem) y el kit ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystem) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

10 La secuencia de nucleótidos del gen que codifica la región V de la cadena L del anticuerpo MABL-1 de ratón, que está incluida en el plásmido pGEM-M1L, se muestra en el ID SEC N° 5.

La secuencia de nucleótidos del gen que codifica la región V de la cadena H del anticuerpo MABL-1 de ratón, que está incluida en el plásmido pGEM-M1H, se muestra en el ID SEC N° 6.

15 La secuencia de nucleótidos del gen que codifica la región V de la cadena L del anticuerpo MABL-2 de ratón, que está incluida en el plásmido pGEM-M2L, se muestra en el ID SEC N° 7.

20 La secuencia de nucleótidos del gen que codifica la región V de la cadena H del anticuerpo MABL-2 de ratón, que está incluida en el plásmido pGEM-M2H, se muestra en el ID SEC N° 8.

Ejemplo 3

Determinación de la CDR

25 Las regiones V de la cadena L y la cadena H en general tienen estructuras similares y cada una de las cuatro regiones marco en las mismas están unidas por tres regiones hipervariables, es decir, regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Una secuencia de aminoácidos de la estructura marco está relativamente bien conservada, mientras que una secuencia de aminoácidos de la CDR tiene una variación extremadamente alta (Kabat, E.A., y col., "Sequences of Proteins of Immunological Interest", US Dept. Health and Human Services, 1983).

30 Basándose en estos hechos, las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de los anticuerpos monoclonales de ratón frente a la IAP humana se aplicaron a las bases de datos de secuencias de aminoácidos de los anticuerpos hechos por Kabat y col. para investigar la homología. Las regiones CDR se determinaron basándose en la homología mostrada en la Tabla 1.

35 TABLA 1

Plásmido	ID SEC N°	CDR (1)	CDR (2)	CDR (3)
40 pGEM-M1L	5	43-58	74-80	113-121
pGEM-M1H	6	50-54	69-85	118-125
45 pGEM-M2L	7	43-58	74-80	113-121
PGEM-M2H	8	50-54	69-85	118-125

Ejemplo 4

50 *Identificación de la expresión del ADNc clonado*

Preparación del anticuerpo MABL-1 quimérico y el anticuerpo MABL-2 quimérico

55 *4.1 Preparación de vectores que expresan el anticuerpo MABL-1 quimérico*

60 Los clones de ADNc, pGEM-M1L y pGEM-M1H, que codifican las regiones V de la cadena L y la cadena H del anticuerpo de ratón MABL-1, respectivamente, se modificaron por el procedimiento de la PCR y se introdujeron en el vector de expresión HEF (documento WO92/19759) para preparar los vectores que expresaban el anticuerpo MABL-1 quimérico.

65 Se diseñaron un cebador directo MLS (ID SEC N° 9) para la región V de la cadena L y un cebador directo MHS (ID SEC N° 10) para la región V de la cadena H, para que hibridaran con un ADN que codifica el inicio de la secuencia líder de cada una de las regiones V y que contengan la secuencia consenso Kozak (*J. Mol. biol.*, 196, 647-950, 1987) y el sitio de la enzima de restricción HindIII. Se diseñaron un cebador inverso MLAS (ID SEC N° 11) para la región V de la cadena L y un cebador inverso MHAS (ID SEC N° 12) para la región V de la cadena H, para que hibridaran con un ADN que codifica el extremo de la región J y que contuvieran la secuencia donadora de empalme y el sitio de la enzima de restricción BamHI.

ES 2 312 418 T3

100 μ l de una solución para la PCR que contenía 10 μ l de 10 x tampón para la PCR II, MgCl₂ 2 mM, dNTP 0,16 mM (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), 5 unidades de una ADN polimerasa AmpliTaq Gold, 0,4 μ M de cada uno de los cebadores y 8 ng del ADN molde (pGEM-M1L o pGEM-M1H) se precalentaron a 94°C de temperatura inicial durante 9 minutos y después se calentaron a 94°C durante 1 minuto, a 60°C durante 1 minuto y a 72°C durante 1 minuto 20 segundos, en este orden. Este ciclo de temperatura se repitió 35 veces y después la mezcla de reacción se calentó más a 72°C durante 10 minutos.

El producto de la PCR se purificó usando el kit de purificación de la PCR QIAquick (QIAGEN) y después se digirió con HindIII y BamHI. El producto de la región V de la cadena L se clonó en el vector de expresión HEF, HEF- κ , y el producto de la región V de la cadena H se clonó en el vector de expresión HEF, HEF- γ . Después de la secuenciación del ADN, los plásmidos que contienen un fragmento de ADN con una secuencia de ADN correcta se denominan HEF-M1L y HEF-M1H, respectivamente.

4.2 Preparación de vectores que expresan anticuerpos MABL-2 quiméricos

La modificación y clonación del ADNc se llevaron a cabo de la misma forma descrita en el Ejemplo 4.1, excepto que se usaron pGEM-M2L y pGEM-M2H como ADN molde en lugar de pGEM-M1L y pGEM-M1H. Después de la secuenciación del ADN, los plásmidos que contienen fragmentos de ADN con las secuencias de ADN correctas se denominan HEF-M2L y HEF-M2H, respectivamente.

4.3 Transfección a células COS7

Los vectores de expresión mencionados antes se probaron en células COS7 para observar la expresión transitoria de los anticuerpos MABL-1 y MABL-2 quiméricos.

(1) Transfección con genes del anticuerpo MABL-1 quimérico

Se cotransformaron células COS7 con los vectores HEF-M1L y HEF-M1H por electroporación usando el aparato Gene Pulser (BioRad). Se añadieron cada uno de los ADN (10 μ g) y 0,8 ml de PBS con 1×10^7 células/ml a una cubeta. La mezcla se trató con pulsos a 1,5 kV, 25 μ F de capacidad eléctrica.

Después de restauración durante 10 minutos a temperatura ambiente, las células electroporadas se transfirieron a medio de cultivo DMEM (GIBCO BRL) que contenía suero bovino fetal sin γ -globulina al 10%. Después de cultivo durante 72 horas, se recogió el líquido sobrenadante, se centrifugó para separar los fragmentos celulares y se recuperó.

(2) Transfección con genes que codifican el anticuerpo MABL-2 quimérico

La cotransfección de células COS7 con los genes que codifican el anticuerpo MABL-2 quimérico se llevó a cabo de la misma forma descrita en el Ejemplo 4.3-(1) excepto que se usaron los vectores HEF-M2L y HEF-M2H en lugar de los vectores HEF-M1L y HEF-M1H. El líquido sobrenadante se recuperó de la misma forma.

4.4. Citometría de flujo

La citometría de flujo se llevó a cabo usando el líquido sobrenadante del cultivo de las células COS7 mencionado antes, para medir la unión al antígeno. Se añadieron el líquido sobrenadante del cultivo de las células COS7 que expresaban el anticuerpo MABL-1 quimérico o las células COS7 que expresaban el anticuerpo MABL-2 quimérico, o el anticuerpo IgG humano (SIGMA) como un control a 4×10^5 células de la línea celular de leucemia de ratón L1210 que expresa IAP humana y se incubaron en hielo. Después de lavar, se le añadió el anticuerpo anti-IgG humana marcado con FITC (Cappel). Después de incubar y lavar, se midió su intensidad de fluorescencia usando el aparato FACScan (BECTON DICKINSON).

Puesto que los anticuerpos MABL-1 y MABL-2 quiméricos se unían específicamente a células L1210 que expresan IAP humana, se confirma que estos anticuerpos quiméricos tienen estructuras adecuadas de las regiones V de los anticuerpos monoclonales de ratón MABL-1 y MABL-2, respectivamente (Figuras 1-3).

Ejemplo 5

Preparación de Fv de cadena sencilla reconstruido (scFv) del anticuerpo MABL-1 y el anticuerpo MABL-2

5.1 Preparación de Fv de cadena sencilla reconstruido del anticuerpo MABL-1

El Fv de cadena sencilla reconstruido del anticuerpo MABL-1 se preparó como sigue. La región V de la cadena H y la región V de la cadena L del anticuerpo MABL-1 y un conector, se amplificaron respectivamente por el procedimiento de la PCR y se conectaron para producir el Fv de cadena sencilla reconstruido del anticuerpo MABL-1. El procedimiento de producción se ilustra en la Figura 4. Se usaron seis cebadores (A-F) para la producción del Fv de cadena sencilla del anticuerpo MABL-1. Los cebadores A, C y E tienen una secuencia homocodificada y los cebadores B, D y F tienen una secuencia antisentido.

ES 2 312 418 T3

Se diseñó el cebador directo VHS para la región V de la cadena H (cebador A, ID SEC N° 13) para que hibridara con un ADN que codifica el extremo N-terminal de la región V de la cadena H y que contuviera el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción NcoI. Se diseñó el cebador inverso VHAS para la región V de la cadena H (cebador B, ID SEC N° 14) para que hibridara con un ADN que codifica el extremo C-terminal de la región V de la cadena H y que se superpusiera con el conector.

Se diseñó el cebador directo LS para el conector (cebador C, ID SEC N° 15) para que hibridara con un ADN que codifica el extremo N-terminal del conector y para que se superpusiera con un ADN que codifica el extremo C-terminal de la región V de la cadena H. Se diseñó el cebador inverso LAS para el conector (cebador D, ID SEC N° 16) para que hibridara con un ADN que codifica el extremo C-terminal del conector y para que se superpusiera con un ADN que codifica el extremo N-terminal de la región V de la cadena L.

Se diseñó el cebador directo VLS para la región V de la cadena L (cebador E, ID SEC N° 17) para que hibridara con un ADN que codifica el extremo C-terminal del conector y para que se superpusiera con un ADN que codifica el extremo N-terminal de la región V de la cadena L. Se diseñó el cebador inverso VLAS-FLAG para la región V de la cadena L (cebador F, ID SEC N° 18) para que hibridara con un ADN que codifica el extremo C-terminal de la región V de la cadena L y para que tuviera una secuencia que codifica el péptido FLAG (Hopp T.P. y col., *BioTechnology*, 6, 1204-1210, 1988), dos codones de parada y el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción EcoRI.

En la primera etapa de la PCR se llevaron a cabo tres reacciones, A-B, C-D y E-F, y los productos de la PCR de las mismas se purificaron. Tres productos de la PCR obtenidos de la primera etapa de la PCR se ensamblaron por su complementariedad. Después, se añadieron los cebadores A y F y se amplificó el ADN de longitud completa que codifica el Fv de cadena sencilla reconstruido del anticuerpo MABL-1 (segunda PCR). En la primera PCR, el plásmido pGEM-M1H que codifica la región V de la cadena H del anticuerpo MABL-1 (véase el Ejemplo 2), un plásmido pSC-DP1 que comprende una secuencia de ADN que codifica una región del conector que comprende: Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser (ID SEC N° 19) (Huston, J.S., y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 5879-5883, 1988) y el plásmido pGEM-M1L que codifica la región V de la cadena L del anticuerpo MABL-1 (véase el Ejemplo 2) se usaron respectivamente como molde.

50 μ l de solución en la primera etapa de la PCR comprenden 5 μ l de 10 x tampón para la PCR II, MgCl₂ 2 mM, dNTP 0,16 mM, 2,5 unidades de una ADN polimerasa, AmpliTaq Gold (PERKIN ELMER), 0,4 μ M de cada uno de los cebadores y 5 ng de cada ADN molde. La solución de la PCR se precalentó a 94°C de temperatura inicial durante 9 minutos y después se calentó a 94°C durante 1 minuto, a 65°C durante 1 minuto y a 72°C durante 1 minuto 20 segundos, en este orden. Este ciclo de temperatura se repitió 35 veces y después la mezcla de reacción se calentó más a 72°C durante 7 minutos.

Los productos de la PCR A-B (371 pb), C-D (63 pb) y E-F (384 pb) se purificaron usando el kit de purificación de la PCR QIAquick (QIAGEN) y se ensamblaron en la segunda PCR. En la segunda PCR, 98 μ l de una solución de PCR que comprendía 120 ng del producto A-B de la primera PCR, 20 ng del producto C-D de la PCR y 120 ng del producto E-F de la PCR, 10 μ l de 10 x tampón de la PCR II, MgCl₂ 2 mM, dNTP 0,16 mM, 5 unidades de ADN polimerasa AmpliTaq Gold (PERKIN ELMER), se precalentaron a 94°C de temperatura inicial durante 8 minutos y después se calentaron a 94°C durante 2 minutos, a 65°C durante 2 minutos y a 72°C durante 2 minutos, en este orden. Este ciclo de temperatura se repitió dos veces y después se añadieron a la reacción respectivamente 0,4 μ M de cada uno de los cebadores A-F. La mezcla se precalentó a 94°C de temperatura inicial durante 1 minuto y después se calentó a 94°C durante 1 minuto, a 65°C durante 1 minuto y a 72°C durante 1 minuto 20 segundos, en este orden. Este ciclo de temperatura se repitió 35 veces y después la mezcla de reacción se calentó más a 72°C durante 7 minutos.

Un fragmento de ADN de 843 pb producido por la segunda PCR se purificó y se digirió con NcoI y EcoRI. El fragmento de ADN resultante se clonó en el vector pSCFVT7. El vector de expresión pSCFVT7 contiene una secuencia señal pelB adecuada para el sistema de expresión periplásmico de *E. coli* (Lei, S.P. y col., *J. Bacteriology*, 169, 4379-4383, 1987). Después de la secuenciación del ADN, el plásmido que contiene el fragmento de ADN que codifica la secuencia de aminoácidos correcta del Fv de cadena sencilla reconstruido del anticuerpo MABL-1 se denomina "pscM1" (véase la Figura 5). La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos del Fv de cadena sencilla reconstruido del anticuerpo MABL-1 contenida en el plásmido pscM1 se muestran en el ID SEC N° 20.

El vector pscM1 se modificó por el procedimiento de la PCR para preparar un vector que expresaba el Fv de cadena sencilla reconstruido del anticuerpo MABL-1 en células de mamífero. El fragmento de ADN resultante se introdujo en el vector de expresión pCHO1. Este vector de expresión, pCHO1, se construyó haciendo digerir DHFR- Δ E-rvH-PM1-f (documento WO92/19759) con EcoRI y SmaI para eliminar el gen de anticuerpo y conectar el adaptador EcoRI-NotI-BamHI (Takara Shuzo) al mismo.

Como cebador directo para la PCR se diseñó el cebador Sal-VHS mostrado en el ID SEC N° 21 para que hibridara con un ADN que codifica el extremo N-terminal de la región V de la cadena H y para que contuviera el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción SalI. Como cebador inverso para la PCR, se diseñó el cebador FRH1anti mostrado en el ID SEC N° 22 para que hibridara con un ADN que codifica el extremo de la primera secuencia marco.

100 μ l de solución para la PCR que comprendía 10 μ l de 10 x tampón para la PCR II, MgCl₂ 2 mM, dNTP 0,16 mM, 5 unidades de una ADN polimerasa, AmpliTaq Gold, 0,4 μ M de cada uno de los cebadores y 8 ng del ADN molde

ES 2 312 418 T3

(pscM1) se precalentaron a 95°C de temperatura inicial durante 9 minutos y después se calentaron a 95°C durante 1 minuto, a 60°C durante 1 minuto y a 72°C durante 1 minuto 20 segundos, en este orden. Este ciclo de temperatura se repitió 35 veces y después la mezcla de reacción se calentó más a 72°C durante 7 minutos.

5 El producto de la PCR se purificó usando el kit de purificación QIAquick (QIAGEN) y se digirió con Sall y MboII para obtener un fragmento de ADN que codifica el extremo N-terminal del Fv de cadena sencilla reconstruido del anticuerpo MABL-1. El vector pscM1 se digirió con MboII y EcoRI para obtener un fragmento de ADN que codifica el extremo C-terminal del Fv de cadena sencilla reconstruido del anticuerpo MABL-1. El fragmento de ADN Sall-MboII y el fragmento de ADN MboII-EcoRI se clonaron en el vector pCHO1-Igs. Después de secuenciar el ADN, el
10 plásmido que comprendía la secuencia de ADN deseada se denominó "pCHOM1" (véase la Figura 6). El vector de expresión pCHO1-Igs, contiene una secuencia señal IgG1 de ratón adecuada para el sistema de expresión-secreción en células de mamífero (*Nature*, 322, 323-327, 1988). La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos del Fv de cadena sencilla reconstruido del anticuerpo MABL-1 contenida en el plásmido pCHOM1 se muestran en el ID SEC N° 23.

15

5.2. Preparación del Fv de cadena sencilla reconstruido del anticuerpo MABL-2

El Fv de cadena sencilla reconstruido del anticuerpo MABL-2 se preparó de acuerdo con el Ejemplo 5.1 mencionado antes. En la etapa de la primera PCR se usó el plásmido pGEM-M2H que codificaba la región V de la cadena H de MABL-2 (véase el Ejemplo 2) en lugar de pGEM-M1H y el plásmido pGEM-M2L que codifica la región V de la cadena L de MABL-2 (véase el Ejemplo 2) en lugar de pGEM-M1L, para obtener un plásmido pscM2 que comprende un fragmento de ADN que codifica la secuencia de aminoácidos deseada del Fv de cadena sencilla del anticuerpo MABL-2. La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos del Fv de cadena sencilla reconstruido del anticuerpo MABL-2 contenida en el plásmido pscM2 se muestran en el ID SEC N° 24.

25

El vector pscM2 se modificó por el procedimiento de la PCR para preparar un vector, pCHOM2, para la expresión en células de mamífero, que contiene el fragmento de ADN que codifica la secuencia correcta de aminoácidos del Fv de cadena sencilla reconstruido del anticuerpo MABL-2. La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos del Fv de cadena sencilla reconstruido del anticuerpo MABL-2 contenida en el plásmido pCHOM2 se muestran en el ID SEC N° 25.

30

5.3 Transfección a células COS7

El vector pCHOM2 se probó en células COS7 para observar la expresión transitoria del Fv de cadena sencilla reconstruido del anticuerpo MABL-2.

35

Las células COS7 se transformaron con el vector pCHOM2 por electroporación usando el aparato Gene Pulser (BioRad). Se añadieron el ADN (10 µg) y 0,8 ml de PBS con 1×10^7 células/ml a una cubeta. La mezcla se trató con pulsos a 1,5 kV, 25 µF de capacidad eléctrica.

40

Después de restauración durante 10 minutos a temperatura ambiente, las células electroporadas se transfirieron a medio de cultivo IMDM (GIBCO BRL) que contenía suero bovino fetal al 10%. Después de cultivo durante 72 horas, se recogió el líquido sobrenadante, se centrifugó para separar los fragmentos celulares y se recuperó.

45 5.4 Detección del Fv de cadena sencilla reconstruido del anticuerpo MABL-2 en el líquido sobrenadante del cultivo de células COS7

La existencia del Fv de cadena sencilla del anticuerpo MABL-2 en el líquido sobrenadante del cultivo de células COS7 que se habían transfectado con el vector pCHOM2 se confirmó por el procedimiento de transferencia Western.

50

El líquido sobrenadante del cultivo de células COS7 transfectadas con el vector pCHOM2 y el líquido sobrenadante del cultivo de células COS7 transfectadas con el vector pCHO1 como control, se sometieron a electroforesis en SDS y se transfirieron a una membrana REINFORCED NC (Schleicher & Schuell). La membrana se bloqueó con leche desnatada al 5% (Morinaga Nyu-gyo), se lavó con Tween 20-PBS al 0,05% y se mezcló con un anticuerpo anti-FLAG (SIGMA). La membrana se incubó a temperatura ambiente, se lavó y se mezcló con anticuerpo IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (Zymed). Después de incubar y lavar a temperatura ambiente, se añadió la solución de sustrato (Kirkegaard Perry Laboratories) para el revelado de color (Figura 7).

55

Se detectó una proteína específica del péptido FLAG solamente en el líquido sobrenadante del cultivo de las células COS7 en las que se había introducido el vector pCHOM2, y por lo tanto, se confirma que el Fv de cadena sencilla reconstruido del anticuerpo MABL-2 era segregado en este líquido sobrenadante de cultivo.

60

5.5 Citometría de flujo

La citometría de flujo se llevó a cabo usando el líquido sobrenadante del cultivo de células COS7 antes mencionadas para medir la unión al antígeno. Se añadió el líquido sobrenadante del cultivo de células COS7 que expresan el Fv de cadena sencilla reconstruido del anticuerpo MABL-2 o el líquido sobrenadante del cultivo de células COS7 transformadas con el vector pCHO1 como control a 2×10^5 células de la línea celular de leucemia de ratón L1210

65

ES 2 312 418 T3

que expresa la proteína asociada a integrina (IAP) humana o de la línea celular L1210 transformada con pCOS1 como control. Después de incubar sobre hielo y lavar, se añadió el anticuerpo anti-FLAG de ratón (SIGMA). Después las células se incubaron y se lavaron. Después se le añadió el anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con FITC (BECTON DICKINSON) y las células se incubaron y lavaron otra vez. Posteriormente, se midió la intensidad de la fluorescencia usando el aparato FACScan (BECTON DICKINSON).

Puesto que el Fv de cadena sencilla del anticuerpo MABL-2 se unía específicamente a las células L1210 que expresaban la IAP humana, se confirma que el Fv de cadena sencilla reconstruido del anticuerpo MABL-2 tiene una afinidad por la proteína asociada a la integrina humana (IAP) (Véase las Figuras 8-11).

5.6 ELISA competitivo

Se midió la actividad de unión del Fv de cadena sencilla reconstruido del anticuerpo MABL-2, basándose en la actividad inhibidora frente a la unión de anticuerpos monoclonales de ratón al antígeno.

Se añadió el anticuerpo anti-FLAG ajustado a $1 \mu\text{g/ml}$ a cada uno de los pocillos de una placa de 96 pocillos y se incubó a 37°C durante 2 horas. Después de lavar, se llevó a cabo el bloqueo con BSA-PBS al 1%. Después de incubar y lavar a temperatura ambiente el líquido sobrenadante del cultivo de las células COS7 en las que se había introducido el gen del antígeno de la IAP humana de tipo secreción (ID SEC N° 26) se diluyó con PBS en el doble de volumen y se añadió a cada pocillo. Después de incubar y lavar a temperatura ambiente, se añadió a cada pocillo una mezcla de $50 \mu\text{l}$ del anticuerpo MABL-2 biotinilado ajustado a 100 ng/ml y $50 \mu\text{l}$ del líquido sobrenadante diluido de forma secuencial de las células COS7 que expresaban el Fv de cadena sencilla reconstruido del anticuerpo MABL-2. Después de incubar y lavar a temperatura ambiente, se añadió a cada pocillo la estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina (Zymed). Después de incubar y lavar a temperatura ambiente, se añadió la solución de sustrato (SIGMA) y se midió la absorbancia de la mezcla de reacción en cada pocillo a 405 nm .

Los resultados pusieron de manifiesto que el Fv de cadena sencilla reconstruido del anticuerpo MABL-2 (MABL2-scFv) inhibía de forma evidente de forma dependiente de la concentración la unión del anticuerpo MABL-2 de ratón al antígeno IAP humano en comparación con el líquido sobrenadante del cultivo de células COS7 a las que se había introducido PCHO1 como control (Figura 12). Por consiguiente, se sugiere que el Fv de cadena sencilla reconstruido del anticuerpo MABL-2 tiene la estructura correcta de cada una de las regiones V del anticuerpo monoclonal de ratón MABL-2.

5.7 Efecto de inducción de apoptosis *in vitro*

Se examinó una acción de inducción de apoptosis del Fv de cadena sencilla reconstruido del anticuerpo MABL-2 mediante tinción con Anexina-V (Boehringer Mannheim) usando las células L1210 transfectadas con el gen de IAP humana, las células L1210 transfectadas con el vector pCOS1 como control y células CCRF-CEM.

A cada una de 1×10^5 células de las células anteriores se añadió el líquido sobrenadante del cultivo de células COS7 que expresaban el Fv de cadena sencilla reconstruido del anticuerpo MABL-2 o el líquido sobrenadante del cultivo de células COS7 transfectadas con el vector pCHO1 como control, con una concentración final de 50% y las mezclas se cultivaron durante 24 horas. Después se llevó a cabo la tinción con Anexina-V y se midió la intensidad de la fluorescencia usando el aparato FACScan (BECTON DICKINSON).

Los resultados de la tinción con Anexina-V se muestran en las Figuras 13-18, respectivamente. Los puntos en la región inferior izquierda representan células vivas y los puntos en la región inferior derecha representan células en la etapa temprana de apoptosis, y los puntos en la región superior derecha representan células en la etapa tardía de apoptosis. Los resultados muestran que el Fv de cadena sencilla reconstruido del anticuerpo MABL-2 (MABL2-scFv) inducía notablemente la muerte celular de células L1210 específicas para el antígeno IAP humana (Figuras 13-16) y que el Fv de cadena sencilla reconstruido también inducía notablemente la muerte celular de células CCRF-CEM en comparación con el control (Figuras 17-18).

5.8 Expresión de Fv de cadena sencilla derivado de MABL-2 en células CHO

Se transfectaron células CHO con el vector pCHOM2 para establecer una línea de células CHO que exprese de forma constante el Fv de cadena sencilla (polipéptido) derivado del anticuerpo MABL-2.

Se transformaron células CHO con el vector pCHOM2 por electroporación usando el aparato Gene Pulser (Bio-Rad). Se añadió una mezcla de ADN ($10 \mu\text{g}$) y $0,7 \text{ ml}$ de PBS con células CHO (1×10^7 células/ml) a una cubeta. La mezcla se trató con pulsos a $1,5 \text{ kV}$, $25 \mu\text{F}$ de capacidad eléctrica. Después de restauración durante 10 minutos a temperatura ambiente, las células electroporadas se transfirieron a medio α -MEM sin ácido nucleico (GIBCO BRL) que contenía suero bovino fetal al 10% y se cultivaron. La expresión de la proteína deseada en los clones resultantes se confirmó por SDS-PAGE y se seleccionó un clon con un nivel de expresión alto como una línea celular que producía el Fv de cadena sencilla derivado del anticuerpo MABL-2. La línea celular se cultivó en medio CHO-S-SFM II sin suero (GIBCO BRL) que contenía metotrexato 10 nM (SIGMA). Después se recogió el líquido sobrenadante del cultivo, se centrifugó para separar los fragmentos celulares y se recuperó.

ES 2 312 418 T3

5.9 Purificación del Fv de cadena sencilla derivado de MABL-2 producido en células CHO

El líquido sobrenadante del cultivo de la línea celular CHO que expresaba el Fv de cadena sencilla obtenido en el Ejemplo 5.8 se concentró hasta veinte veces usando un cartucho para la diálisis artificial (PAN130SF, ASAHI MEDICALS). La solución concentrada se almacenó a -20°C y se descongeló en la purificación.

La purificación del Fv de cadena sencilla del líquido sobrenadante del cultivo de células CHO se llevó a cabo usando tres tipos de cromatografía, es decir, en Sefarosa azul, un hidroxapatito y una filtración en gel.

10 (1) Cromatografía en columna en Sefarosa azul

El líquido sobrenadante concentrado se diluyó diez veces con tampón de acetato 20 mM (pH 6,0) y se centrifugó para separar los materiales insolubles (10000 x rpm, 30 minutos). El líquido sobrenadante se aplicó en una columna de Sefarosa azul (20 ml) equilibrada con el mismo tampón. Después de lavar la columna con el mismo tampón, las proteínas adsorbidas en la columna se eluyeron por un gradiente gradual de NaCl en el mismo tampón, 0,1, 0,2, 0,3, 0,5 y hasta 1,0 M. La fracción de paso continuo y cada fracción eluida se analizaron por SDS-PAGE. Las fracciones en las que se confirmó el Fv de cadena sencilla (las fracciones eluidas con NaCl 0,1 a 0,3 M) se juntaron y se concentraron hasta aproximadamente 20 veces usando CentriPrep-10 (AMICON).

20 (2) Hidroxapatito

La solución concentrada obtenida en (1) se diluyó hasta 10 veces con tampón de fosfato 10 mM (pH 7,0) y se aplicó en la columna de hidroxapatito (20 ml, BIORAD). La columna se lavó con 60 ml de tampón de fosfato 10 mM (pH 7,0). Después las proteínas adsorbidas en la columna se eluyeron con un gradiente lineal de tampón de fosfato sódico hasta 200 mM (véase la Figura 19). El análisis de cada fracción por SDS-PAGE confirmó el Fv de cadena sencilla en la fracción A y fracción B.

(3) Filtración en gel

Cada una de las fracciones A y B en (2) se concentró por separado con CentriPrep-10 y se aplicó a la columna TSKgel G3000SWG (21,5 x 600 mm) equilibrada con tampón de acetato 20 mM (pH 6,0) que contenía NaCl 0,15 M. Los cromatogramas se muestran en la Figura 20. El análisis de las fracciones por SDS-PAGE confirmó que ambos picos mayoritarios (AI y BI) son del Fv de cadena sencilla deseado. En el análisis de la filtración en gel, la fracción A eluyó a 36 kDa de peso molecular aparente y la fracción B eluyó a 76 kDa. Los Fv de cadena sencilla purificados (AI, BI) se analizaron en gel de poliacrilamida con SDS al 15%. Las muestras se trataron en ausencia o presencia de un reductor y se llevó a cabo la electroforesis de acuerdo con el procedimiento de Laemmli. Después la proteína se tiñó con azul brillante de Coomassie. Como se muestra en la Figura 21, tanto AI como BI dieron una sola banda a 35 kDa de peso molecular aparente, independientemente de la ausencia o presencia del reductor. A partir de lo anterior, se concluye que AI es un monómero de Fv de cadena sencilla y BI es un dímero unido no covalentemente del Fv de cadena sencilla. El análisis de la filtración en gel de las fracciones AI y BI con la columna TSKgel G3000SWG (7,5 x 60 mm) puso de manifiesto que se detecta un pico del monómero sólo en la fracción AI y se detecta un pico del dímero sólo en la fracción BI (Figura 22). La fracción de dímero (fracción BI) daba cuenta de 4 por ciento (%) de los Fv de cadena sencilla totales. Más del 90% del dímero en la fracción de dímero se conservaba establemente durante más de un mes a 4°C.

45 5.10 Construcción del vector que expresa el Fv de cadena sencilla derivado del anticuerpo MABL-2 en células de *E. coli*

El vector pscM2 se modificó por el procedimiento de la PCR para preparar un vector que expresara eficazmente el Fv de cadena sencilla del anticuerpo MABL-2 en células de *E. coli*. El fragmento de ADN resultante se introdujo en el vector de expresión pSCFVT7.

Como cebador directo para la PCR se diseñó el cebador Nde-VHSm02 mostrado en el ID SEC N° 27 para que hibridara con un ADN que codifica el extremo N-terminal de la región V de la cadena H y para que contuviera un codón de iniciación y el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción NdeI. Como cebador inverso para la PCR, se diseñó el cebador VAS mostrado en el ID SEC N° 28 para que hibridara con un ADN que codifica el extremo C-terminal de la región V de la cadena L y para que contuviera dos codones de parada y el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción EcoRI. El cebador directo, Nde-VHSm02, comprende cinco mutaciones puntuales en la parte que hibrida con el ADN que codifica el extremo N-terminal de la región V de la cadena H para la expresión eficaz en *E. coli*.

100 µl de una solución para la PCR que comprendía 10 µl de 10 x tampón de PCR n° 1, MgCl₂ 1 mM, dNTP 0,2 mM, 5 unidades de ADN polimerasa KOD (todos de TOYOBO), 1 µM de cada cebador y 100 ng de un ADN molde (pscM2) se calentaron a 98°C durante 15 segundos, a 65°C durante 2 segundos y a 74°C durante 30 segundos, en este orden. Este ciclo de temperatura se repitió 25 veces.

El producto de la PCR se purificó usando el kit de purificación de PCR QIAquick (QIAGEN) y se digirió con NdeI y EcoRI, y después el fragmento de ADN resultante se clonó en el vector pSCFVT7, del cual se había eliminado

ES 2 312 418 T3

la secuencia señal pelB por digestión con NdeI y EcoRI. Después de secuenciar el ADN, el plásmido resultante que comprende un fragmento de ADN con la secuencia de ADN deseada se denomina “pscM2DEm02” (véase la Figura 23). La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos del Fv de cadena sencilla derivado del anticuerpo MABL-2 contenida en el plásmido pscM2DEm02 se muestran en el ID SEC N° 29.

5.11 Expresión del Fv de cadena sencilla derivado del anticuerpo MABL-2 en células *E. coli*

BL21(DE3)pLysS de *E. coli* (STRATAGENE) se transformó con el vector pscM2DEm02 para obtener una cepa de *E. coli* que expresaba el Fv de cadena sencilla derivado del anticuerpo MABL-2. Se examinó en los clones resultantes la expresión de la proteína deseada usando SDS-PAGE, y se seleccionó un clon con un nivel de expresión alto como una cepa productora del Fv de cadena sencilla derivado del anticuerpo MABL-2.

5.12 Purificación del Fv de cadena sencilla derivado del anticuerpo MABL-2 producido por *E. coli*

Se cultivó una colonia individual de *E. coli* obtenida por la transformación, en 3 ml de medio LB a 28°C durante 7 horas y después en 70 ml de medio LB a 28°C toda la noche. Este precultivo se trasplantó a 7 litros de medio LB y se cultivó a 28°C con agitación a 300 rpm usando el fermentador de tanque. Cuando la absorbancia del medio alcanzó una DO = 1,5, se indujeron las bacterias con IPTG 1 mM y después se cultivaron durante 3 horas.

El medio de cultivo se centrifugó (10000 x g, 10 minutos) y se recuperaron las bacterias precipitadas. Se añadió a las bacterias tampón Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) que contenía EDTA 5 mM, NaCl 0,1 M y Triton X-100 al 1% y las bacterias se alteraron por ultrasonidos (salida: 4; ciclo de trabajo: 70%, 1 minuto x 10 veces). La suspensión de las bacterias alteradas se centrifugó (12000 x g, 10 minutos) para precipitar el cuerpo de inclusión. El cuerpo de inclusión aislado se mezcló con tampón Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) que contenía EDTA 5 mM, NaCl 0,1 M y Triton X-100 al 4%, se trató por ultrasonidos (salida: 4, ciclo de trabajo: 50%, 30 segundos x 2 veces) otra vez y se centrifugó (12000 x g, 10 minutos) para aislar la proteína deseada como precipitado y separar las proteínas contenidas en el líquido sobrenadante.

El cuerpo de inclusión que comprendía la proteína deseada se lisó en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) que contenía urea 6 M, EDTA 5 mM y NaCl 0,1 M y se aplicó en columna de filtración en gel Sephacryl S-300 (5 x 90 cm, Amersham Pharmacia) equilibrada con tampón de Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) que contenía urea 4 M, EDTA 5 mM, NaCl 0,1 M y mercaptoetanol 10 mM con un caudal de 5 ml/minuto para separar los Fv de cadena sencilla con peso molecular alto asociados. Las fracciones obtenidas se analizaron con SDS-PAGE y las fracciones con pureza alta de la proteína se diluyeron con el tampón usado en la filtración en gel hasta DO₂₈₀=0,25. Después, las fracciones se dializaron tres veces frente a tampón de Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) que contenía EDTA 5 mM, NaCl 0,1 M, Arg 0,5 M, glutatión 2 mM en la forma reducida y glutatión 0,2 mM en la forma oxidada con el fin de volver a plegar la proteína. Además, la fracción se dializó tres veces frente a tampón de acetato 20 mM (pH 6,0) que contenía NaCl 0,15 M para intercambiar el tampón.

El producto dializado se aplicó en la columna de filtración en gel Superdex 200 pg (2,6 x 60 cm, Amersham Pharmacia) equilibrada con tampón de acetato 20 mM (pH 6,0) que contenía NaCl 0,15 M para separar una pequeña cantidad de proteína de alto peso molecular que estaba intermolecularmente entrecruzada por enlaces S-S. Como se muestra en la Figura 24, se eluyeron dos picos, principal y subpico, después de los picos anchos que supuestamente se atribuían a un agregado de alto peso molecular. El análisis por SDS-PAGE (véase la Figura 21) y las posiciones de elución de los dos picos en el análisis de filtración en gel sugerían que el pico principal es el del monómero del Fv de cadena sencilla y el subpico es el del dímero unido no covalentemente del Fv de cadena sencilla. El dímero unido no covalentemente daba cuenta del 4 por ciento de los Fv de cadena sencilla totales.

5.13 Actividad de inducción de apoptosis *in vitro* de Fv de cadena sencilla derivado del anticuerpo MABL-2

Se examinó la acción de inducción de apoptosis del Fv de cadena sencilla del anticuerpo MABL-2 (MABL2-scFv) producido por las células CHO y *E. coli* de acuerdo con dos protocolos por tinción con Anexina-V (Boehringer Mannheim) usando las células L1210 (hIAP/L1210) en las que se había introducido el gen de IAP humana.

En el primer protocolo, se añadieron los anticuerpos de las muestras con una concentración final de 3 µg/ml a 5 x 10⁴ células de hIAP/L1210 y se cultivaron durante 24 horas. Se analizaron los anticuerpos de las muestras, es decir, el monómero y el dímero de Fv de cadena sencilla de MABL-2 de las células CHO obtenidas en el Ejemplo 5.9, el monómero y el dímero del Fv de cadena sencilla de MABL-2 de *E. coli* obtenido en el ejemplo 5.12, y el anticuerpo IgG de ratón como control. Después del cultivo, se llevó a cabo la tinción con Anexina-V y se midió la intensidad de fluorescencia usando el aparato FACScan (BECTON DICKINSON).

En el segundo protocolo, los anticuerpos de las muestras con una concentración final de 3 µg/ml se añadieron a 5 x 10⁴ células de la línea celular hIAP/L1210, se cultivaron durante 2 horas y se mezclaron con anticuerpo anti-FLAG (SIGMA) con una concentración final de 15 µg/ml y después se cultivaron durante 22 horas. Se analizaron los anticuerpos de las muestras del monómero del Fv de cadena sencilla de MABL-2 de células CHO obtenidos en el Ejemplo 5.9 y el anticuerpo IgG de ratón como control. Después del cultivo, se llevó a cabo la tinción con Anexina-V y se midió la intensidad de fluorescencia usando el aparato FACScan.

ES 2 312 418 T3

Los resultados de los análisis por tinción con Anexina-V se muestran en las Figuras 25-31. Los resultados muestran que los dímeros del polipéptido Fv de cadena sencilla de MABL-2 producidos en las células CHO y *E. coli* inducían notablemente la muerte celular (Figuras 26, 27) en comparación con el control (Figura 25), mientras que no se observó inducción de la apoptosis en los monómeros del polipéptido Fv de cadena sencilla de MABL-2 producidos en las células CHO y *E. coli* (Figuras 28, 29). Cuando se usó junto con el anticuerpo anti-FLAG, el monómero del polipéptido Fv de cadena sencilla derivado del anticuerpo MABL-2 producido en las células CHO inducía notablemente la muerte celular (Figura 31) en comparación con el control (Figura 30).

5.14 Efecto antitumoral del monómero y el dímero del polipéptido scFv/CHO con un modelo de ratón de mieloma humano

(1) Medición cuantitativa de IgG humana en el suero de ratón

La medición de IgG humana (proteína M) producida por células de mieloma humano y contenida en el suero de ratón, se llevó a cabo mediante el siguiente ELISA. Se añadieron 100 μ l de anticuerpo anti-IgG humana de cabra (BIOSOURCE, lote n° 7902) diluidos a 1 μ g/ml con tampón de bicarbonato al 0,1% (pH 9,6) a cada pocillo en una placa de 96 pocillos (Nunc) y se incubó a 4°C toda la noche de modo que se inmovilizara el anticuerpo. Después del bloqueo, se añadieron 100 μ l de suero de ratón diluido gradualmente o de la IgG humana (CAPPEL, lote n° 00915) como patrón a cada pocillo y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de lavar, se añadieron 100 μ l de anticuerpo anti-IgG humana marcado con fosfatasa alcalina (BIOSOURCE, lote n° 6202) que se había diluido 5000 veces, y se llevó a cabo la incubación durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar, se añadió una solución de sustrato. Después de incubación, se midió la absorbancia a 405 nm usando el lector MICROPLATE READER Modelo 3550 (BioRad). La concentración de IgG humana en el suero de ratón se calculó basándose en la curva de calibración obtenida con los valores de absorbancia de la IgG humana como patrón.

(2) Preparación de anticuerpos para la administración

El monómero y el dímero del polipéptido de scFv/CHO se diluyeron respectivamente a 0,4 mg/ml o 0,25 mg/ml con PBS(-) esterilizado por filtración el día de la administración para preparar las muestras para la administración.

(3) Preparación de un modelo de ratón de mieloma humano

Se preparó un modelo de ratón de mieloma humano como sigue. Células KPMM2 pasadas *in vivo* (documento JP-Appl. 7-236475) por un ratón SCID (Japan Clare) se suspendieron en medio RPMI1640 (GIBCO-BRL) que contenía suero bovino fetal al 10% (GIBCO-BRL) y se ajustaron a 3×10^7 células/ml. Se trasplantaron 200 μ l de la suspensión de células KPMM2 (6×10^6 células/ratón) al ratón SCID (macho, 6 semanas de edad) por la vena caudal del mismo, al que se le había inyectado por vía subcutánea el anticuerpo asialo-GM1 (WAKO JUNYAKU, 1 vial disuelto en 5 ml) un día antes del trasplante.

(4) Administración de anticuerpos

Las muestras de los anticuerpos preparadas en (2), el monómero (250 μ l) y el dímero (400 μ l), se administraron al ratón modelo de mieloma humano preparado en (3) por la vena caudal del mismo. La administración se inició tres días después del trasplante de las células KPMM2 y se llevó a cabo dos veces al día durante tres días. Como control, se administraron de la misma forma 200 μ l de PBS(-) esterilizado por filtración, dos veces al día durante tres días, por la vena caudal. Cada grupo consistía en 7 ratones.

(5) Evaluación del efecto antitumoral del monómero y el dímero del polipéptido scFv/CHO con el modelo de ratón de mieloma humano

El efecto antitumoral del monómero y el dímero del polipéptido scFv/CHO con el ratón modelo de mieloma humano se evaluó en términos de cambio de la concentración de IgG humana (proteína M) en el suero de ratón y el tiempo de supervivencia del ratón. El cambio de concentración de IgG humana se determinó midiéndola en el suero de ratón recogido 24 días después del trasplante de células KPMM2, por el ELISA descrito antes en (1). La cantidad de IgG humana (proteína M) en el suero del grupo al que se le había administrado PBS(-) (control) aumentó a aproximadamente 8500 μ g/ml, mientras que la cantidad de IgG humana del grupo al que se le había administrado el dímero de scFv/CHO era notablemente baja, es decir, tan baja como una décima parte o menos que la del grupo de control. Por lo tanto, los resultados muestran que el dímero de scFv/CHO inhibe fuertemente el crecimiento de las células KPMM2 (Figura 32). Como se muestra en la Figura 33, se observó una prolongación notable del tiempo de supervivencia en el grupo al que se le había administrado el dímero de scFv/CHO comparado con el grupo al que se le había administrado PBS(-).

A partir de lo anterior se confirma que el dímero de scFv/CHO tiene un efecto antitumoral para el modelo de ratón de mieloma humano. Se considera que el efecto antitumoral del dímero de scFv/CHO, el polipéptido reconstruido de la invención, resulta de la acción inductora de apoptosis del polipéptido reconstruido.

ES 2 312 418 T3

5.15 Ensayo de hemaglutinación

El ensayo de hemaglutinación y la determinación de la hemaglutinación se llevaron a cabo de acuerdo con “Immuno-Biochemical Investigation”, Zoku-Seikagaku Jikken Koza, editado por la Sociedad Bioquímica de Japón, publicado por Tokyo Kagaku Dojin.

Se tomó sangre de un donante sano usando jeringuillas tratadas con heparina y se lavó con PBS(-) tres veces, y después se preparó una suspensión de eritrocitos con una concentración final de 2% en PBS(-). Las muestras de ensayo eran el anticuerpo MABL-2, el monómero y el dímero del polipéptido Fv de cadena sencilla producido por las células CHO, y el monómero y el dímero del polipéptido Fv de cadena sencilla producido por *E. coli*, y el control era IgG de ratón (ZYMED). Para la investigación del efecto de hemaglutinación, se usaron placas de 96 pocillos de fondo redondo disponibles en Falcon. Se añadieron y mezclaron en el pocillo 50 μ l por pocillo de las muestras de anticuerpos mencionadas antes y 50 μ l de suspensión de eritrocitos al 2%. Después de incubación durante 2 horas a 37°C, las mezclas de reacción se almacenaron a 4°C toda la noche y se determinó la hemaglutinación de las mismas. Como control, se usaron 50 μ l por pocillo de PBS(-) y el ensayo de hemaglutinación se llevó a cabo de la misma manera. La IgG de ratón y el anticuerpo MABL-2 se usaron con 0,01, 0,1, 1,0, 10,0 ó 100,0 μ g/ml de la concentración final de los anticuerpos. Los Fv de cadena sencilla se usaron con 0,004, 0,04, 0,4, 4,0, 40,0 ó 80,0 μ g/ml de la concentración final y además a 160 μ g/ml sólo en el caso del dímero del polipéptido producido por *E. coli*. Los resultados se muestran en la Tabla 2. En el caso del anticuerpo MABL-2, la hemaglutinación se observó con una concentración de más de 0,1 μ g/ml, mientras que no se observó hemaglutinación para el monómero ni para el dímero del Fv de cadena sencilla.

TABLA 2

Ensayo de hemaglutinación

	Control	0,01	0,1	1	10	100	μg/ml	
mIgG	-	-	-	-	-	-		
MABL-2 (intacto)	-	-	+	+++	+++	++		
	Control	0,004	0,04	0,4	4	40	80	μg/ml
monómero de scFv/CHO	-	-	-	-	-	-	-	
dímero de scFv/CHO	-	-	-	-	-	-	-	
	Control	0,004	0,04	0,4	4	40	80	160
monómero de scFv/ <i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	μg/ml
dímero de scFv/ <i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-

55 Ejemplo 6

Polipéptido reconstruido sc(Fv)₂ que comprende dos regiones V de la cadena H y dos regiones V de la cadena L y scFv de anticuerpo MABL-2 que tiene conectores de diferente longitud

60 6.1 Construcción del plásmido que expresa sc(Fv)₂ del anticuerpo MABL-2

Para preparar un plásmido que expresa el polipéptido reconstruido [sc(Fv)₂] que comprende dos regiones V de la cadena H y dos regiones v de la cadena L derivadas del anticuerpo MABL-2, el pCHOM2 mencionado antes, que comprende el ADN que codifica el scFv derivado de MABL-2 descrito antes, se modificó por el procedimiento de la PCR como se menciona a continuación y el fragmento de ADN resultante se introdujo en pCHOM2.

Los cebadores usados para la PCR son el cebador EF1 (ID SEC N°: 30) como cebador homosentido, que se diseñó para que hibridara con un ADN que codifica EF1 α y un cebador antisentido (ID SEC N°: 19) que se diseñó para que

ES 2 312 418 T3

hibridara con el ADN que codifica el extremo C-terminal de la región V de la cadena L y para que contuviera una secuencia de ADN para una región conectora, y el cebador VLLAS que contiene el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción Sall (ID SEC N° 31).

- 5 100 μ l de solución para la PCR comprenden 10 μ l de 10 x tampón de PCR n° 1, MgCl₂ 1 mM, dNTP 0,2 mM (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), 5 unidades de ADN polimerasa KOD (Toyobo, Inc.), 1 μ M de cada uno de los cebadores y 100 ng del ADN molde (pCHOM2). La solución de la PCR se calentó a 94°C durante 30 segundos, a 50°C durante 30 segundos y a 74°C durante 1 minuto, en este orden. Este ciclo de temperatura se repitió 30 veces.
- 10 El producto de la PCR se purificó usando el kit de purificación QIAquick (QIAGEN) y se digirió con Sall. El fragmento de ADN resultante se clonó en el vector pBluescript KS⁺ (Toyobo, Inc.). Después de secuenciación del ADN, se digirió un plásmido que comprendía la secuencia de ADN deseada con Sall y el fragmento de ADN obtenido se conectó usando el kit Rapid DNA Ligation (BOEHRINGER MANNHEIM) a pCHOM2 hecho digerir con Sall. Después de secuenciación del ADN, el plásmido que comprende la secuencia de ADN deseada se denomina “pCHOM2(Fv)₂”
- 15 (véase la Figura 34). La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos de la región sc(Fv)₂ del anticuerpo MABL-2 contenida en el plásmido pCHOM2(Fv)₂ se muestran en el ID SEC N° 32.

6.2 Preparación del plásmido que expresa scFv del anticuerpo MABL-2 que tienen conectores de diferentes longitudes

- 20 Los scFv que contienen conectores con diferentes longitudes y las regiones V que se diseñan en el orden [cadena H]-[cadena L] (en lo sucesivo “HL”) o [cadena L]-[cadena H] (en lo sucesivo “LH”) se prepararon usando como molde ADNc que codifican la cadena H y la cadena L derivadas de MABL-2 como se menciona a continuación.

Para la construcción de scFv de tipo HL, el procedimiento de la PCR se llevó a cabo usando pCHOM2 (Fv)₂ como molde. En la etapa de la PCR, se usaron una pareja de cebador CFHL-F1 (ID SEC N°: 33) y cebador CFHL-R2 (ID SEC N°: 34) o una pareja de cebador CFHL-F2 (ID SEC N°: 35) y cebador CFHL-R1 (ID SEC N°: 36) y polimerasa KOD. El procedimiento de la PCR se llevó a cabo repitiendo 30 veces un ciclo de temperatura que consistía en 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto con el fin de producir un ADNc para la cadena H que contenía una secuencia líder en el extremo 5' o un ADNc para la cadena L que contenía la secuencia FLAG en su extremo 3'. Los ADNc resultante para la cadena H y la cadena L se mezclaron y se llevó a cabo la PCR repitiendo 5 veces el ciclo de temperatura que consistía en 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto, en este orden, usando la mezcla como moldes y la polimerasa KOD. Se añadieron a la mezcla de reacción los cebadores CFHL-F1 y CFHL-R1 y después la reacción PCR se llevó a cabo repitiendo 30 veces el ciclo de temperatura mencionado antes para producir el ADNc para el tipo HL-0 sin conector.

35 Para construir el scFv de tipo LH, la reacción PCR se llevó a cabo usando, como molde pGEM-M2L y pGEM-M2H que contienen los ADNc que codifican la región V de la cadena L y la región V de la cadena H del anticuerpo MABL-2, respectivamente (véase el documento JP-Apl. 11-63557). Se usaron una pareja del cebador T7 (ID SEC N°: 37) y el cebador CFLH-R2 (ID SEC N°: 38) o una pareja del cebador CFLH-F2 (ID SEC N°: 39) y CFLH-R1 (ID SEC N°: 40) y la polimerasa KOD (Toyobo Inc.). La reacción PCR se llevó a cabo repitiendo 30 veces el ciclo de temperatura que consistía en 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto en un orden secuencial para producir un ADNc de una cadena L que contiene una secuencia líder en el extremo 5' o un ADNc de una cadena H que contiene la secuencia FLAG en su extremo 3'. Los ADNc resultantes de la cadena L y la cadena H se mezclaron y se llevó a cabo la PCR usando esta mezcla como moldes y la polimerasa KOD, repitiendo

45 5 veces el ciclo de temperatura que consistía en 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto, en este orden. A la mezcla de reacción se añadieron los cebadores T7 y CFLH-R1 y la reacción se llevó a cabo repitiendo 30 veces el ciclo de temperatura mencionado antes. El producto de reacción se usó como molde y la PCR se llevó a cabo usando una pareja del cebador CFLH-F4 (ID SEC N°: 41) y el cebador CFLH-R1 repitiendo 30 veces el ciclo de temperatura que consistía en 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto, en este orden, para producir un ADNc de tipo LH-0 sin conector.

Los ADNc resultantes de los tipos LH-0 y HL-0 se digirieron con las enzimas de restricción EcoRI y BamHI (Takara Shuzo) y los ADNc digeridos se introdujeron en un plásmido de expresión INPEP4 para células de mamífero usando Ligation High (Toyobo Inc.), respectivamente. Se transformó JM109 de *E. coli* competente (Nippon Gene)

55 con cada uno de los plásmidos, y los plásmidos deseados se aislaron de *E. coli* transformada usando el kit QIAGEN Plasmid Maxi (QIAGEN). De esta forma se prepararon los plásmidos pCF2LH-0 y pCF2HL-0.

Para construir los plásmidos de expresión de tipo HL que contienen conectores con tamaños diferentes, se usaron pCF2HL-0 como molde y CFHL-X3 (ID SEC N°: 42), CFHL-X4 (ID SEC N°: 43), CFHL-X5 (ID SEC N°: 44), CFHL-X6 (ID SEC N°: 45) o CFHL-X7 (ID SEC N°: 46), como un cebador homocentido, y el cebador BGH-1 (ID SEC N°:47) como un cebador antisentido, que es complementario con la secuencia del vector. La reacción de la PCR se llevó a cabo usando la polimerasa KOD repitiendo 30 veces el ciclo de temperatura que consistía en 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto, en este orden, y los productos de reacción se digirieron con las enzimas de restricción XhoI y BamHI (Takara Shuzo). Los fragmentos digeridos se introdujeron entre los sitios XhoI y BamHI en pCF2HL-0 usando Ligation High (Toyobo Inc.), respectivamente. Se transformó JM109 de *E. coli* competente con cada uno de los plásmidos, y los plásmidos deseados se aislaron de *E. coli* transformada usando el kit Qiagen Plasmid Maxi. Así, se prepararon los plásmidos de expresión pCF2HL-3, pCF2HL-4, pCF2HL-5, pCF2HL-6 y pCF2HL-7.

ES 2 312 418 T3

Para construir el plásmido de expresión para la expresión transitoria en células COS7 los plásmidos pCF2HL-0, pCF2HL-3, pCF2HL-4, pCF2HL-5, pCF2HL-6 y pCF2HL-7 se digirieron con las enzimas de restricción EcoRI y BamHI (Takara Shuzo) y los fragmentos resultantes de aproximadamente 800 pb se purificaron con electroforesis en gel de agarosa. Los fragmentos obtenidos se introdujeron entre los sitios EcoRI y BamHI en un plásmido de expresión pCOS1 para la expresión en células de mamífero usando Ligation High (Toyobo Inc.), respectivamente. Se transformó DH α 5 de *E. coli* competente (Toyobo Inc.) con cada uno de los plásmidos, y los plásmidos deseados se aislaron de *E. coli* transformada usando el kit Qiagen Plasmid Maxi. Así, se prepararon los plásmidos CF2HL-0/pCOS1, CF2HL-3/pCOS1, CF2HL-4/pCOS1, CF2HL-5/pCOS1, CF2HL-6/pCOS1 y CF2HL-7/pCOS1.

Como ejemplo típico de estos plásmidos, se ilustra en la Figura 35 la construcción del plásmido CF2HL-0/pCOS1 y la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos de MABL2-scFv <HL-0> contenida en el plásmido, se muestran en el ID SEC N° 48. Las secuencias de nucleótidos y las secuencias de aminoácidos de las regiones del conector en estos plásmidos también se muestran en la Fig. 36.

Para construir los plásmidos de expresión de tipo LH que contienen conectores de tamaño diferente, se usaron pCF2LH-0, como un molde, y CFLH-X3 (ID SEC N°: 49), CFLH-X4 (ID SEC N°: 50), CFLH-X5 (ID SEC N°: 51), CFLH-X6, (ID SEC N°: 52) o CFLH-X7 (ID SEC N°: 53), como un cebador homocentido, y el cebador BGH-1 como un cebador antisentido, que es complementario con la secuencia del vector usado. La reacción de la PCR se llevó a cabo usando la polimerasa KOD, repitiendo 30 veces el ciclo de temperatura que consistía en 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto, en este orden, y los productos de reacción se digirieron con las enzimas de restricción XhoI y BamHI. Los fragmentos digeridos se introdujeron en pCF2LH-0 entre los sitios XhoI y BamHI usando Ligation High, respectivamente. Se transformó DH α 5 de *E. coli* competente (Toyobo Inc.) con cada uno de los plásmidos, y los plásmidos deseados se aislaron de *E. coli* transformada usando el kit Qiagen Plasmid Maxi. Así, se prepararon los vectores de expresión pCF2LH-3, pCF2LH-4, pCF2LH-5, pCF2LH-6 y pCF2LH-7.

Para construir el plásmido de expresión para la expresión transitoria en células COS7 los plásmidos pCF2LH-0, pCF2LH-3, pCF2LH-4, pCF2LH-5, pCF2LH-6 y pCF2LH-7 se digirieron con las enzimas de restricción EcoRI y BamHI (Takara Shuzo) y los fragmentos resultantes de aproximadamente 800 pb se purificaron por electroforesis en gel de agarosa. Los fragmentos obtenidos se introdujeron entre los sitios XhoI y BamHI en un plásmido de expresión pCOS1 para la expresión en células de mamífero usando Ligation High, respectivamente. Se transformó DH α 5 de *E. coli* competente (Toyobo Inc.) con cada uno de los plásmidos y los plásmidos deseados se aislaron de *E. coli* transformada usando el kit Qiagen Plasmid Maxi. Por consiguiente, se prepararon los plásmidos CF2LH-0/pCOS1, CF2LH-3/pCOS1, CF2LH-4/pCOS1, CF2LH-5/pCOS1, CF2LH-6/pCOS1 y CF2LH-7/pCOS1.

Como ejemplo típico de estos plásmidos, en la Figura 37 se ilustra la construcción del plásmido CF2LH-0/pCOS1 y la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos de MABL2-scFv <LH-0> contenida en el plásmido, se muestran en el ID SEC N° 54. Las secuencias de nucleótidos y las secuencias de aminoácidos de las regiones del conector en estos plásmidos también se muestran en la Fig. 38.

6.3 Expresión de los scFv y sc(Fv)₂ en células COS7

(1) Preparación del líquido sobrenadante del cultivo usando medio de cultivo que contiene suero

Los scFv y sc(Fv)₂ de tipo HL y tipo LH se expresaron transitoriamente en células COS7 (JCRB9127, Japan Health Sciences Foundation). Las células COS7 se subcultivaron en medio DMEM (GIBCO BRL) que contenía suero bovino fetal al 10% serum (HyClone) a 37°C en un incubador en atmósfera de dióxido de carbono. Las células COS7 se transfectaron con los vectores CF2HL-0, 3~7/pCOS1, o CF2LH-0/3~7/pCOS1 preparados en el Ejemplo 6.2 o los vectores pCHOM2(Fv)₂ por electroporación usando el aparato Gene Pulser (BioRad). Se añadieron a la cubeta el ADN (10 μ g) y 0,25 ml de 2 x 10⁷ células/ml en medio de cultivo DMEM que contenía FBS al 10% y BES 5 mM (SIGMA). Después de reposar durante 10 minutos las mezclas se trataron con pulsos a 0,17 kV, 950 μ F de capacidad eléctrica. Después de restauración durante 10 minutos a temperatura ambiente, las células electroporadas se transfirieron al medio de cultivo DMEM (FBS al 10%) en un matraz de 75 cm³. Después de cultivar durante 72 horas, se recogió el líquido sobrenadante del cultivo y se centrifugó para separar los fragmentos celulares. El líquido sobrenadante del cultivo se sometió a filtración usando un filtro superior de botella de 0,22 μ m (FALCON) para obtener el líquido sobrenadante del cultivo (en lo sucesivo "CM").

(2) Preparación del líquido sobrenadante del cultivo usando medio sin suero

Las células transfectadas de la misma forma que en (1) se transfirieron al medio DMEM (FBS al 10%) en un matraz de 75 cm³ y se cultivaron toda la noche. Después del cultivo, se descartó el líquido sobrenadante y las células se lavaron con PBS y después se añadieron al medio CHO-S-SFM II (GIBCO BRL). Después de cultivar durante 72 horas, se recogió el líquido sobrenadante del cultivo, se centrifugó para separar los fragmentos celulares y se filtró usando un filtro superior de botella de 0,22 μ m (FALCON) para obtener el CM.

6.4 Detección de los scFv y sc(Fv)₂ en los CM de COS7

Los diferentes MABL2-scFv y sc(Fv)₂ en el CM de COS7 preparado en el Ejemplo 6.3 (2) mencionado antes, se detectaron por el procedimiento de transferencia Western.

ES 2 312 418 T3

Cada CM de COS7 se sometió a electroforesis en SDS-PAGE y se transfirió a una membrana REINFORCED NC (Schleicher & Schuell). La membrana se bloqueó con leche desnatada al 5% (Morinaga Nyu-gyo) y se lavó con TBS. Después se añadió a la misma un anticuerpo anti-FLAG (SIGMA). La membrana se incubó a temperatura ambiente y se lavó. Se añadió un anticuerpo IgG de ratón marcado con peroxidasa (Jackson Immuno Research). Después de 5 incubar y lavar a temperatura ambiente, se añadió la solución de sustrato (Kirkegaard Perry Laboratories) para el desarrollo de color (Fig. 39).

6.5 Citometría de flujo

La citometría de flujo se llevó a cabo usando los líquidos sobrenadantes del cultivo de células COS7 preparadas en el Ejemplo 6.3 (1), para medir la unión de MABL2-scFv y sc(Fv)₂ al antígeno proteína asociada a integrina (IAP) humana. Se añadieron los líquidos sobrenadantes del cultivo que se iban a ensayar o un líquido sobrenadante del cultivo de células COS7 como un control a 2×10^5 células de la línea celular de leucemia de ratón L1210 que expresa la IAP humana. Después de incubar sobre hielo y lavar, se añadieron 10 µg/ml del anticuerpo anti-FLAG de ratón (SIGMA) y 15 después las células se incubaron y se lavaron. Después, se le añadió el anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con FITC (BECTON DICKINSON) y las células se incubaron y lavaron otra vez. Se midió la intensidad de la fluorescencia usando el aparato FACScan (BECTON DICKINSON). Los resultados de la citometría de flujo muestran que los MABL2-scFv que tienen conectores con diferente longitud y los sc(Fv)₂ en los líquidos sobrenadantes del cultivo de COS7 tienen una alta afinidad por la IAP humana (Véanse las Figuras 40a y 40b).

6.6 Efecto de inducción de apoptosis *in vitro*

Se examinó la acción de inducción de apoptosis de los líquidos sobrenadantes del cultivo de COS7 preparados en el Ejemplo 6.3 (1) por tinción con Anexina-V (Boehringer Mannheim) usando las células L1210 transfectadas con el 25 gen de IAP humano (hIAP/L1210).

A 5×10^4 células de las células hIAP/L1210 se añadieron los líquidos sobrenadantes del cultivo de células COS7 transfectadas con cada uno de los vectores o un líquido sobrenadante del cultivo de células COS7 como control con una concentración final de 10% y las mezclas se cultivaron durante 24 horas. Después, se llevó a cabo la tinción con 30 Anexina-V/PI y se midió la intensidad de la fluorescencia usando el aparato FACScan (BECTON DICKINSON). Los resultados pusieron de manifiesto que los scFv <HL3, 4, 6, 7, LH3, 4, 6, 7> y sc(Fv)₂ en los CM de COS7 inducían de forma notable la muerte celular de las células hIAP/L1210. Estos resultados se muestran en la Figura 41.

6.7 Construcción de vectores para la expresión de scFv y sc(Fv)₂ en células CHO

Para aislar y purificar MABL2-scFv y sc(Fv)₂ del líquido sobrenadante del cultivo, se construyeron los vectores de 35 expresión para la expresión en células CHO como sigue.

Los fragmentos EcoRI-BamHI de pCF2HL-0, 3~7, y PCF2LH-0, 3~7 preparados en el Ejemplo 6.2 se introdujeron 40 entre los sitios EcoRI y BamHI en un vector de expresión pCHO1 para células CHO usando el Ligation High. Se transformaron DH5α de *E. coli* competentes con los mismos. Los plásmidos se aislaron de *E. coli* transformada usando el kit QIAGEN Plasmid Midi (QIAGEN) para preparar los plásmidos de expresión pCHOM2HL-0, 3~7, y pCHOM2LH-0, 3~7.

6.8 Producción de células CHO que expresan MABL2-scFv <HL-0, 3~7>, MABL2-SCFV <LH-0, 3~7> y sc(Fv)₂ y 45 preparación de los líquidos sobrenadantes del cultivo de las mismas

Las células CHO se transformaron con cada uno de los plásmidos de expresión pCHOM2HL-0, 3~7, y pCHOM2 50 LH-0, 3~7, construidos en el Ejemplo 6.7 y el vector pCHOM2(Fv)₂ para preparar las células CHO que expresan de forma constante cada polipéptido reconstruido. Como un ejemplo típico de las mismas, se ilustra a continuación la producción de células CHO que expresan de forma constante MABL2-scFv <HL-5> o sc(Fv)₂.

Los plásmidos de expresión pCHOM2HL-5 y pCHOM2(Fv)₂ se linealizaron por digestión con una enzima de 55 restricción PvuI y se sometieron a transfección a células CHO mediante electroporación usando el aparato Gene Pulser (BioRad). Se añadieron el ADN (10 µg) y 0,75 ml de PBS con 1×10^7 células/ml a una cubeta y se trataron con pulsos a 1,5 kV, 25 µF de capacidad eléctrica. Después de restauración durante 10 minutos a temperatura ambiente, las células electroporadas se transfirieron a medio de cultivo α-MEM que contenía ácido nucleico (GIBCO BRL) que contenía suero bovino fetal al 10% y se cultivaron. Después de cultivo durante toda la noche, el líquido sobrenadante se descartó. Las células se lavaron con PBS y se añadieron a medio de cultivo α-MEM sin ácido nucleico (GIBCO 60 BRL) que contenía suero bovino fetal al 10%. Después de cultivo durante dos semanas, las células se cultivaron en un medio que contenía metotrexato 10 nM (concentración final) (SIGMA), después metotrexato 50 nM y 100 nM. Las células resultantes se cultivaron en el medio CHO-S-SFM II sin suero (GIBCO BRL) en una botella giratoria. Se recogió el líquido sobrenadante del cultivo, se centrifugó para separar los fragmentos celulares y se filtró usando un filtro con un tamaño de poros de 0,22 µm para obtener el CM, respectivamente.

De acuerdo con lo anterior, se obtuvieron células CHO que expresan de forma constante MABL2-scFv <HL-0, -3, 65 -4, -6> -7> y <LH-0, -3, -4, -5, -6, -7> y los CM de las mismas.

ES 2 312 418 T3

6.9 Purificación del dímero de MABL2-scFv <HL-5> y sc(Fv)₂

Los MABL2-scFv <HL-5> y sc(Fv)₂ se purificaron a partir de los CM preparados en el Ejemplo 6.8 por dos tipos de procedimientos de purificación, como sigue.

Procedimiento de purificación 1

HL-5 y sc(Fv)₂ se purificaron por cromatografía en columna de afinidad de anticuerpo anti-FLAG, usando la secuencia FLAG localizada en el extremo C-terminal del polipéptido, y por filtración en gel. Un litro de CM obtenido en 6.8 se aplicó en una columna (7,9 ml) preparada con el gel de afinidad anti-FLAG M2 (SIGMA) equilibrada con tampón Tris-HCl 50 mM (TBS, pH 7,5) que contenía NaCl 150 mM. Después de lavar la columna con TBS, el scFv eluyó con tampón de glicina-HCl 0,1 M, pH 3,5. Las fracciones resultantes se analizaron por SDS-PAGE y se confirmó la elución del scFv. La fracción de scFv se mezcló con Tween 20 hasta 0,01% de la concentración final y se concentró usando el Centricon-10 (MILIPORE). El concentrado se aplicó en una columna TSKgel G300SWG (7,5 x 600 mm) equilibrada con tampón de acetato 20 mM (pH 6,0) que contenía NaCl 150 mM y Tween 20 al 0,01%. Con un caudal de 0,4 ml/minuto, el scFv se detectó por absorción a 280 nm. El HL-5 eluyó como la fracción principal en la posición del dímero y el sc(Fv)₂ eluyó en la posición del monómero.

Procedimiento de purificación 2

HL-5 y sc(Fv)₂ se purificaron usando tres etapas que comprendían cromatografía de intercambio iónico, hidroxipatito y filtración en gel. En la cromatografía de intercambio iónico se usó la columna de flujo rápido de sefaroza-Q (Pharmacia) para HL-5 y la columna de flujo rápido de sefaroza-SP para sc(Fv)₂. En y después de la segunda etapa, HL-5 y sc(Fv)₂ se procesaron por el mismo procedimiento.

Primera etapa para HL-5

El CM de HL-5 se diluyó dos veces con tampón de Tris-HCl 20 mM (pH 9,0) que contenía Tween 20 al 0,02% y después el pH se ajustó a 9,0 con Tris 1 M. La solución se aplicó en la columna de flujo rápido de sefaroza Q equilibrada con tampón de Tris-HCl 20 mM (pH 8,5) que contenía Tween 20 al 0,02%. Se eluyó un polipéptido adsorbido en la columna por un gradiente lineal de NaCl en el mismo tampón, de 0,1 a 0,55 M. Haciendo el seguimiento de las fracciones eluidas por SDS-PAGE, se recogieron las fracciones que contenían HL-5 y se sometieron al hidroxipatito de la segunda etapa.

Primera etapa para sc(Fv)₂

El CM de sc(Fv)₂ se diluyó dos veces con tampón de acetato 20 mM (pH 5,5) que contenía Tween 20 al 0,02% y después el pH se ajustó a 5,5 con ácido acético 1 M. La solución se aplicó en una columna de flujo rápido de sefaroza-SP equilibrada con tampón de acetato 20 mM (pH 5,5) que contenía Tween 20 al 0,02%. Eluyó un polipéptido adsorbido en la columna por un gradiente lineal de NaCl en el tampón, de 0 a 0,5 M. Haciendo el seguimiento de las fracciones eluidas por SDS-PAGE, se recogieron las fracciones que contenían sc(Fv)₂ y se sometieron al hidroxipatito de la segunda etapa.

Segunda etapa: Cromatografía en hidroxipatito de HL-5 y sc(Fv)₂

Las fracciones de HL-5 y sc(Fv)₂ obtenidas en la primera etapa se aplicaron por separado en la columna de hidroxipatito (Tipo I, BIORAD) equilibrada con tampón de fosfato 10 mM que contenía Tween 20 al 0,02%, pH 7,0. Después de lavar la columna con el mismo tampón, eluyeron los polipéptidos adsorbidos en la columna por un gradiente lineal de tampón de fosfato hasta 0,5 M. Haciendo el seguimiento de las fracciones eluidas por SDS-PAGE, se recogieron las fracciones que contenían los polipéptidos deseados.

Tercera etapa: Filtración en gel de HL-5 y sc(Fv)₂

Cada una de las fracciones obtenidas en la segunda etapa se concentró por separado con CentriPrep-10 (MILIPORE) y se aplicó en una columna Superdex (2,6 x 60 cm, Pharmacia) equilibrada con tampón de acetato 20 mM (pH 6,0) que contenía Tween 20 al 0,02% y NaCl 0,15 M. HL-5 eluyó en la posición del dímero y sc(Fv)HL-5 y sc(Fv)₂ eluyeron en la posición del monómero como un pico principal, respectivamente.

Puesto que el monómero de HL-5 apenas se detectaba por ambos procedimientos de purificación, se demuestra que los dímeros de los Fv de cadena sencilla se forman con rendimientos altos cuando el conector para el Fv de cadena sencilla contiene alrededor de 5 aminoácidos. Además, el dímero de HL-5 y sc(Fv)₂ se conservaban establemente durante un mes a 4°C después de purificación.

ES 2 312 418 T3

6.10 Evaluación de la actividad de unión del dímero purificado de scFv <HL-5> y sc(Fv)₂ frente al antígeno

La citometría de flujo se llevó a cabo usando el dímero purificado MABL2-scFv <HL-5> y el sc(Fv)₂ purificado con el fin de evaluar la unión al antígeno proteína asociada a integrina humana (IAP). Se añadieron 10 µg/ml del dímero purificado de MABL2-scFv <HL-5>, el sc(Fv)₂ purificado, el anticuerpo MABL-2 como control positivo o una IgG de ratón (Zymed) como control negativo a 2 x 10⁵ células de la línea celular de leucemia de ratón L1210 que expresa la IAP humana (hIAP/L1210) o la línea celular L1210 transformada con pCOS1 (pCOS1/L1210) como control. Después de incubación sobre hielo y lavado, se añadieron 10 µg/ml del anticuerpo anti-FLAG de ratón (SIGMA) y después las células se incubaron y lavaron. Se añadieron a las mismas, anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con FITC (BECTON DICKINSON) y las células se incubaron y lavaron otra vez. Después, se midió la intensidad de la fluorescencia usando el aparato FACScan (BECTON DICKINSON).

Puesto que el dímero purificado de MABL2-scFv <HL-5> y el sc(Fv)₂ purificado se unían específicamente a las células hIAP/L1210, se confirma que el dímero de scFv <HL-5> y el sc(Fv)₂ tienen una alta afinidad por la IAP humana (véase la Fig. 42).

6.11 Actividad de inducción de apoptosis *in vitro* del dímero purificado de scFv <HL-5> y sc(Fv)₂

Se examinó la acción de inducción de apoptosis del dímero purificado de MABL2-scFv <HL-5> y el sc(Fv)₂ purificado por tinción con Anexina-V (Boehringer Mannheim) usando las células L1210 en las que se había introducido el gen de IAP humano y las células de la línea celular de leucemia humana CCRF-CEM.

Se añadieron diferentes concentraciones del dímero purificado de MABL2-scFv <HL-5>, el MABL2-sc(Fv)₂ purificado, el anticuerpo MABL-2 como control positivo o una IgG de ratón como control negativo, a 5 x 10⁴ células de la línea celular hIAP/L1210 o 1 x 10⁵ células de la línea celular CCRF-CEM. Después de cultivar durante 24 horas, se llevó a cabo la tinción con Anexina-V y se midió su intensidad de fluorescencia usando el aparato FACScan (BECTON DICKINSON). Como resultado, el dímero de MABL2-scFv <HL-5> y el MABL2-sc(Fv)₂ inducían notablemente la muerte celular de hIAP/L1210 y CCRF-CEM de una forma dependiente de la concentración (véase la Fig. 43).

6.12 Ensayo de hemaglutinación del dímero purificado de scFv <HL-5> y sc(Fv)₂

El ensayo de hemaglutinación se llevó a cabo usando concentraciones diferentes del dímero purificado de scFv <HL-5> y el sc(Fv)₂ purificado de acuerdo con el Ejemplo 5.15.

Se observó hemaglutinación con el anticuerpo MABL-2 como control positivo, mientras que no se observó hemaglutinación ni con el anticuerpo de cadena sencilla MABL2-sc(Fv)₂ ni el MABL2-scFv <HL-5>. Además, no había una diferencia sustancial en la hemaglutinación entre dos tampones usados con el anticuerpo MABL-2. Estos resultados se muestran en la Tabla 3.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 3

Ensayo de hemaglutinación

Diluyente: PBS (µg/ml)

	cont	28,9	14,45	7,225	3,6125	1,8063	0,9031	0,4516	0,2258	0,1129	0,0564	0,0282	0,0141	0,0071	0,0035	0,0018
MABL2-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SC (Fv) ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

	cont	28,0	14,0	7,0	3,5	1,75	0,875	0,4375	0,2188	0,1094	0,0547	0,0273	0,0137	0,0068	0,0034	0,0017
MABL2-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SC (Fv)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<HL5>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

	cont	80	40	20	10	5	2,5	1,25	0,625	0,3125	0,1563	0,0781	0,0391	0,0195	0,0098	0,0049
MABL2	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-	-	-	-	-
(intacto)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
mIgG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Diluyente: Acetato (µg/ml)

	cont	80	40	20	10	5	2,5	1,25	0,625	0,3125	0,1563	0,0781	0,0391	0,0195	0,0098	0,0049
MABL2	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
(Intacto)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ES 2 312 418 T3

6.13 Efecto antitumoral del dímero purificado de scFv <HL-5> y sc(Fv)₂ para un modelo de ratón de mieloma humano

Se ensayaron los efectos antitumorales del dímero de scFv <HL-5> y sc(Fv)₂ preparados y purificados en los Ejemplos 6.8 y 6.9. El ensayo se llevó a cabo usando el modelo de ratón para el mieloma humano producido en el Ejemplo 5.1 y determinando la cantidad de proteína M producida por las células de mieloma humano en el suero de ratón usando ELISA y examinando el tiempo de supervivencia del ratón. Después, se evaluaron los efectos antitumorales del dímero scFv <HL-5> y sc(Fv)₂ en términos del cambio de la cantidad de proteína M en el suero de ratón y el tiempo de supervivencia del ratón.

En el ensayo, se usaron HL-5 y sc(Fv)₂ en forma de una solución de 0,01, 0,1 ó 1 mg/ml en vehículo que consistía en NaCl 150 mM, Tween al 0,02% y tampón de acetato 20 mM, pH 6,0 y se administraron a los ratones con una dosificación de 0,1, 1 ó 10 mg/kg. Al grupo de ratones de control se les administró sólo vehículo.

El suero de ratón se recogió 26 días después del trasplante de las células de mieloma humano y se midió la cantidad de proteína M en el suero usando ELISA de acuerdo con el Ejemplo 5.14. Como resultado, la cantidad de proteína M en el suero de ambos grupos de ratones a los que se había administrado HL-5, el dímero y sc(Fv)₂, disminuyó de una forma dependiente de la dosis (véase la Figura 44). Además, se observó una prolongación significativa del tiempo de supervivencia en ambos grupos a los que se había administrado HL-5 (Fig. 45) y el sc(Fv)₂ (Fig. 46) en comparación con el grupo de control al que se había administrado vehículo. Estos resultados muestran que HL-5 y sc(Fv)₂ de la invención tienen un excelente efecto antitumoral *in vivo*.

Explicación de los dibujos

la fig. 1 muestra el resultado de la citometría de flujo, que ilustra que el anticuerpo IgG humano no se une a las células L1210 que expresan la IAP humana (hIAP/L1210);

la fig. 2 muestra el resultado de la citometría de flujo, que ilustra que el anticuerpo MABL-1 quimérico se une específicamente a las células L1210 que expresan la IAP humana (hIAP/L1210);

la fig. 3 muestra el resultado de la citometría de flujo, que ilustra que el anticuerpo MABL-2 quimérico se une específicamente a las células L1210 que expresan la IAP humana (hIAP/L1210);

la fig. 4 ilustra esquemáticamente el procedimiento para producir el Fv de cadena sencilla de acuerdo con la presente invención;

la fig. 5 ilustra una estructura de un plásmido de expresión que se puede usar para expresar un ADN que codifica el Fv de cadena sencilla de la invención en *E. coli*;

la fig. 6 ilustra una estructura de un plásmido de expresión que se usa para expresar un ADN que codifica el Fv de cadena sencilla de la invención en células de mamífero;

la fig. 7 muestra una fotografía que muestra el resultado de la transferencia Western en el Ejemplo 5.4. Desde la izquierda, un marcador de peso molecular (que indica 97,4, 66, 45, 31, 21,5 y 14,5 kDa desde la parte superior), el líquido sobrenadante del cultivo de células COS7 en las que se ha introducido pCHO1 y el líquido sobrenadante del cultivo de células COS7 en las que se ha introducido pCHOM2. Ilustra que el Fv de cadena sencilla reconstruido del anticuerpo MABL-2 (flecha) está contenido en el líquido sobrenadante del cultivo de las células en las que se ha introducido pCHOM2;

la fig. 8 muestra el resultado de la citometría de flujo, que ilustra que un anticuerpo en el líquido sobrenadante del cultivo de células pCHO1/COS7 como control, no se une a células pCOS1/L1210 como control;

la fig. 9 muestra el resultado de la citometría de flujo, que ilustra que un anticuerpo en el líquido sobrenadante del cultivo de células MABL2-scFv/COS7 no se une a células pCOS1/L1210 como control;

la fig. 10 muestra el resultado de la citometría de flujo, que ilustra que un anticuerpo en el líquido sobrenadante del cultivo de células pCOS1/COS7 como control no se une a células hIAP/L1210;

la fig. 11 muestra el resultado de la citometría de flujo, que ilustra que un anticuerpo en el líquido sobrenadante del cultivo de células MABL-2-scFv/COS7 se une específicamente a células hIAP/L1210;

la fig. 12 muestra el resultado del ELISA competitivo en el Ejemplo 5.6, en el que se demuestra la actividad de unión del Fv de cadena sencilla de la invención (MABL2-scFv) al antígeno, en términos de inhibición de la unión del anticuerpo MABL-2 monoclonal de ratón al antígeno como un índice, en comparación con el líquido sobrenadante del cultivo de células pCHO1/COS7 como control;

la fig. 13 muestra los resultados del efecto de la inducción de apoptosis en el Ejemplo 5.7, que ilustra que el anticuerpo en el líquido sobrenadante del cultivo de células pCHO1/COS7 como control no induce la apoptosis de células pCOS1/L1210 como control;

ES 2 312 418 T3

- la fig. 14 muestra los resultados del efecto de la inducción de apoptosis en el Ejemplo 5.7, que ilustra que el anticuerpo en el líquido sobrenadante del cultivo de células MABL2-scFv/COS7 no induce la apoptosis de células pCOS1/L1210 como control;
- 5 la fig. 15 muestra los resultados del efecto de inducción de la apoptosis en el Ejemplo 5.7, que ilustra que el anticuerpo en el líquido sobrenadante del cultivo de células pCHO1/COS7 como control no induce la apoptosis de células hIAP/L1210;
- la fig. 16 muestra los resultados del efecto de inducción de la apoptosis en el Ejemplo 5.7, que ilustra que el anticuerpo en el líquido sobrenadante del cultivo de células MABL2-scFv/COS7 induce específicamente la apoptosis de células hIAP/L1210;
- 10 la fig. 17 muestra los resultados del efecto de inducción de la apoptosis en el Ejemplo 5.7, que ilustra que el anticuerpo en el líquido sobrenadante del cultivo de células pCHO1/COS7 como control no induce la apoptosis de células CCRF-CEM (al 50% de la concentración final);
- 15 la fig. 18 muestra los resultados del efecto de inducción de la apoptosis en el Ejemplo 5.7, que ilustra que el anticuerpo en el líquido sobrenadante del cultivo de células MABL2-scFv/COS7 induce específicamente la apoptosis de células CCRF-CEM (al 50% de la concentración final);
- 20 la fig. 19 muestra el cromatograma obtenido en la purificación del Fv de cadena sencilla derivado del anticuerpo MABL-2 producido por las células CHO en el Ejemplo 5.9, que ilustra que la fracción A y la fracción B se obtuvieron como picos mayoritarios cuando la fracción de la columna de sefarosa-azul se purificó con la columna de hidroxipatito;
- 25 la fig. 20 muestra los resultados de la purificación por filtración en gel de la fracción A y la fracción B obtenidas en el Ejemplo 5.9-(2), que ilustra que los picos principales (AI y BI, respectivamente) eluyeron de la fracción A a aproximadamente 36 kD de peso molecular aparente y de la fracción B a aproximadamente 76 kD;
- 30 la fig. 21 es el análisis en SDS-PAGE de las fracciones obtenidas en la purificación del Fv de cadena sencilla derivado del anticuerpo MABL-2 producido por las células CHO en el Ejemplo 5.9, que ilustra que en ambas fracciones se observaba una sola banda de aproximadamente 35 kD de peso molecular;
- 35 la fig. 22 muestra los resultados del análisis de las fracciones AI y BI obtenidas por la filtración en gel, en la purificación de Fv de cadena sencilla derivado del anticuerpo MABL-2 producido por las células CHO, en la que la fracción AI comprende el monómero y la fracción BI comprende el dímero.
- la fig. 23 ilustra una estructura de un plásmido de expresión que se puede usar para expresar un ADN que codifica el Fv de cadena sencilla de la invención, en *E. coli*;
- 40 la fig. 24 muestra los resultados de la purificación en la columna de filtración en gel de los productos brutos del polipéptido Fv de cadena sencilla derivado del anticuerpo MABL-2 producido por *E. coli*, obtenido en el Ejemplo 5.12, en la que cada pico indica monómero o dímero, respectivamente, del Fv de cadena sencilla producido por *E. coli*;
- 45 la fig. 25 muestra los resultados del efecto de la inducción de apoptosis en el Ejemplo 5.13, que ilustran que el anticuerpo IgG de ratón como control no induce la apoptosis de las células hIAP/L1210 (concentración final de 3 $\mu\text{g/ml}$).
- 50 la fig. 26 muestra los resultados del efecto de la inducción de apoptosis en el Ejemplo 5.13, que ilustran que el dímero de MABL2-scFv producido por las células CHO induce notablemente la apoptosis de células hIAP/L1210 (concentración final de 3 $\mu\text{g/ml}$);
- 55 la fig. 27 muestra los resultados del efecto de la inducción de apoptosis en el Ejemplo 5.13, que ilustran que el dímero de MABL2-scFv producido por *E. coli* induce notablemente la apoptosis de células hIAP/L1210 (concentración final de 3 $\mu\text{g/ml}$);
- la fig. 28 muestra los resultados del efecto de la inducción de apoptosis en el Ejemplo 5.13, que ilustran que la inducción de apoptosis en células hIAP/L1210 por el monómero de MABL2-scFv producido por células CHO es del mismo nivel que el del control (concentración final de 3 $\mu\text{g/ml}$);
- 60 la fig. 29 muestra los resultados del efecto de la inducción de apoptosis en el Ejemplo 5.13, que ilustran que la inducción de apoptosis en células hIAP/L1210 del monómero de MABL2-scFv producido por *E. coli* es del mismo nivel que el del control (concentración final de 3 $\mu\text{g/ml}$);
- 65 la fig. 30 muestra los resultados del efecto de la inducción de apoptosis en el Ejemplo 5.13, que ilustran que el anticuerpo IgG de ratón usado como control no induce la apoptosis en células hIAP/L1210 incluso cuando se añade el anticuerpo anti-FLAG (concentración final de 3 $\mu\text{g/ml}$);

ES 2 312 418 T3

la fig. 31 muestra los resultados del efecto de la inducción de apoptosis en el Ejemplo 5.13, que ilustran que el monómero de MABL2-scFv producido por células CHO induce notablemente la apoptosis de células hIAP/L1210 cuando se añade el anticuerpo anti-FLAG (concentración final de 3 $\mu\text{g/ml}$);

5 la fig. 32 muestra los resultados de la medición cuantitativa de la IgG humana en el suero de un ratón al que se ha trasplantado una línea celular de mieloma humano KPMM2, que indican cantidades de IgG humana producida por las células de mieloma humano en el ratón. Ilustra que el dímero de scFv/CHO induce notablemente el crecimiento de células KPMM2;

10 la fig. 33 muestra el tiempo de supervivencia del ratón después del trasplante del tumor, que ilustra que el grupo al que se administró el dímero de scFv/CHO prolongaba notablemente el tiempo de supervivencia;

15 la fig. 34 ilustra una estructura de un plásmido de expresión que expresa un polipéptido reconstruido [sc(Fv)₂] que comprende dos regiones V de la cadena H y dos regiones V de la cadena L derivadas del anticuerpo MABL-2;

la fig. 35 ilustra una estructura de un plásmido que expresa un scFv (tipo HL) en el que las regiones V están unidas de la forma [cadena H]-[cadena L] sin un péptido conector;

20 la fig. 36 ilustra una estructura del polipéptido de tipo HL y las secuencias de aminoácidos de conectores peptídicos;

la fig. 37 ilustra una estructura de un plásmido que expresa un scFv (tipo LH) en el que las regiones V están unidas de la forma [cadena L]-[cadena H] sin un péptido conector;

25 la fig. 38 ilustra una estructura del polipéptido de tipo LH y las secuencias de aminoácidos de conectores peptídicos;

la fig. 39 muestra los resultados de la transferencia Western en el Ejemplo 6.4, que ilustra que se expresan el polipéptido reconstruido sc(Fv)₂ que comprende dos regiones V de la cadena H y dos cadenas V de la cadena L, y el MABL2-scFv que tiene conectores peptídicos con diferentes longitudes;

30 las figs. 40a y 40b muestran los resultados de la citometría de flujo usando el líquido sobrenadante del cultivo de células COS7 preparado en el Ejemplo 6.3 (1), que ilustra que MABL2-scFv y sc(Fv)₂ que tienen conectores peptídicos con diferentes longitudes tienen afinidades altas frente a la IAP humana;

35 las figs. 41 muestra los resultados del efecto de inducción de apoptosis en el Ejemplo 6.6, que ilustran que el scFv <HL3, 4, 6, 7, LH3, 4, 6 y 7> y el sc(Fv)₂ inducen notablemente la muerte celular de células hIAP/L1210;

la fig. 42 muestra los resultados de la evaluación de la capacidad de unión al antígeno en el Ejemplo 6.10, que ilustra que el dímero de scFv <HL5> y sc(Fv)₂ tienen afinidades altas frente a la IAP humana;

40 la fig. 43 muestra los resultados del efecto de la inducción de apoptosis *in vitro* en el Ejemplo 6.11, que ilustran que el dímero de scFv <HL5> y sc(Fv)₂ inducen la apoptosis de células hIAP/L1210 y células CCRF-CEM de forma dependiente de la concentración;

45 la fig.44 muestra los resultados de la medición cuantitativa de la proteína M producida por una línea celular de mieloma humano KPMM2 en el suero de ratón al que se ha trasplantado la línea celular de mieloma humano. Ilustra que el dímero de scFv <HL5> y sc(Fv)₂ inhiben notablemente el crecimiento de las células KPMM2;

50 la fig. 45 muestra el tiempo de supervivencia (días) de los ratones después del trasplante del tumor, que ilustra que el tiempo de supervivencia del grupo al que se había administrado scFv <HL5> se había prolongado notablemente;

la fig. 46 muestra el tiempo de supervivencia (días) de los ratones después del trasplante del tumor, que ilustra que el tiempo de supervivencia del grupo al que se había administrado sc(Fv)₂ se había prolongado notablemente.

Aplicabilidad industrial

55 Los polipéptidos reconstruidos de la invención tienen propiedades de inducción de la apoptosis de células sanguíneas nucleadas que tienen la proteína asociada a integrina (IAP) y no producen hemaglutinación, y son útiles como un agente terapéutico para la discrasia sanguínea, por ejemplo, leucemia tal como leucemia mieloide aguda, leucemia mielógena crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfoblástica crónica, leucemia de células T en adultos, mieloma múltiple, leucemia mixta y leucemia de células pilosas, linfoma maligno (enfermedad de Hodgkin, linfoma de no Hodgkin), anemia aplásica, síndrome mielodisplásico y policitemia vera.

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido reconstruido que se une a la proteína asociada a integrina (IAP), induce apoptosis de células sanguíneas nucleadas y no produce hemaglutinación,
- en el que el polipéptido reconstruido comprende dos regiones V de la cadena H y dos regiones V de la cadena L de un anticuerpo que se une a la IAP e induce apoptosis de células sanguíneas nucleadas, y
- 10 en el que el polipéptido reconstruido es un dímero de un Fv de cadena sencilla que comprende una región V de la cadena H y una región V de la cadena L o un polipéptido de cadena sencilla que comprende dos regiones V de la cadena H y dos regiones V de la cadena L.
- 15 2. El polipéptido reconstruido de la reivindicación 1, en el que el polipéptido reconstituido es un dímero purificado de un Fv de cadena sencilla.
3. El polipéptido reconstruido de la reivindicación 1 ó 2, en el que la región V de la cadena H y la región V de la cadena L están unidas con un conector que comprende al menos un aminoácido.
- 20 4. Un ADN que codifica el Fv de cadena sencilla de las reivindicaciones 1 ó 3.
5. Un ADN que codifica el polipéptido de las reivindicaciones 1 ó 3.
6. El polipéptido reconstruido de la reivindicación 1, en el que la región V de la cadena H y/o la región V de la cadena L están humanizadas.
- 25 7. Un ADN que codifica el polipéptido de la reivindicación 6.
8. Una célula animal que produce el polipéptido reconstruido de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 y 6.
- 30 9. Un microorganismo que produce el polipéptido reconstruido de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 y 6.
10. Un agente terapéutico para la discrasia sanguínea que comprende el polipéptido reconstruido de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3 y 6 como un principio activo.
- 35 11. El agente terapéutico de la reivindicación 10 **caracterizado** porque la discrasia sanguínea es leucemia.
12. El agente terapéutico de la reivindicación 10 **caracterizado** porque el principio activo es el dímero del Fv de cadena sencilla de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 40

45

50

55

60

65

Fig. 1

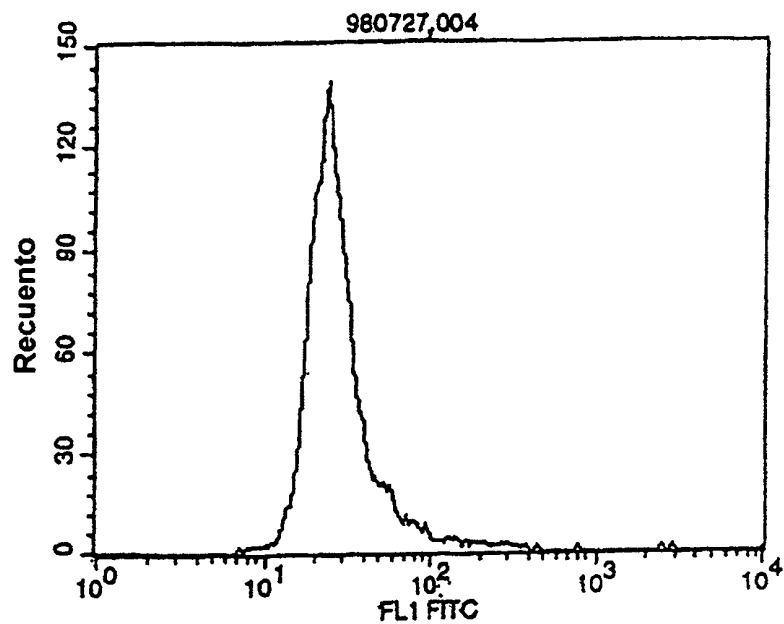


Fig. 2

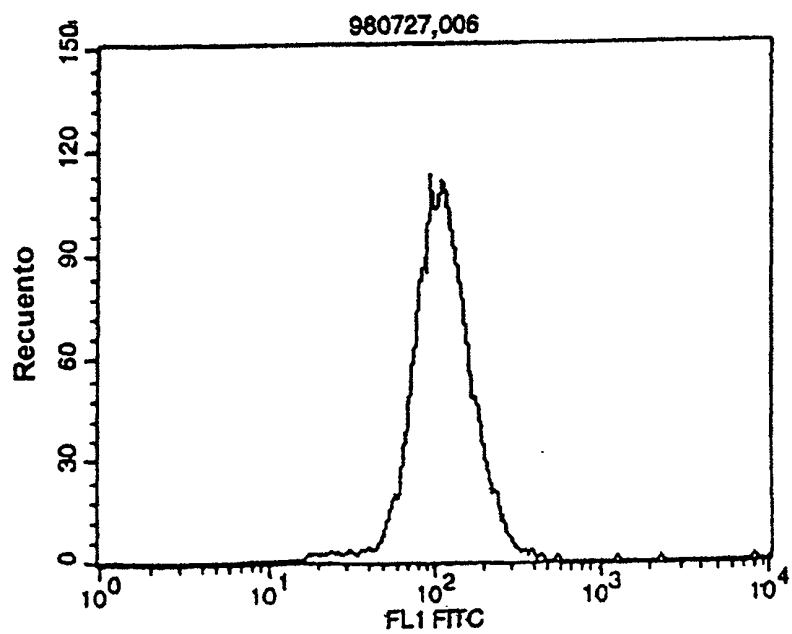


Fig. 3

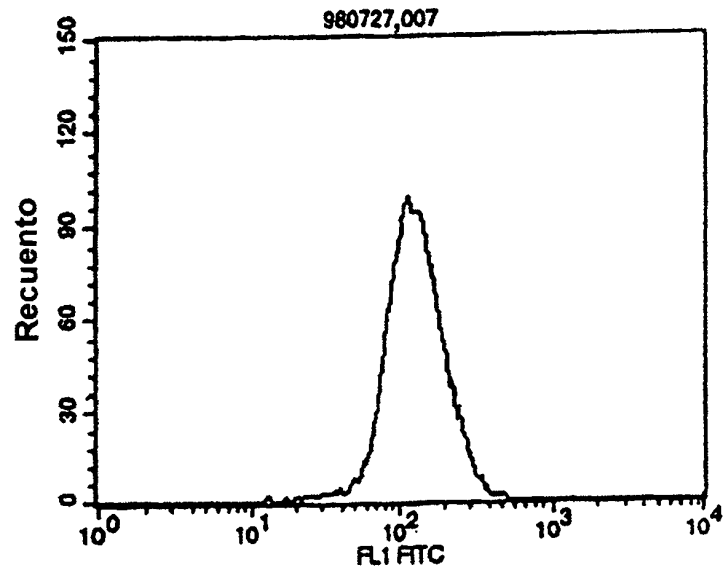


Fig. 4

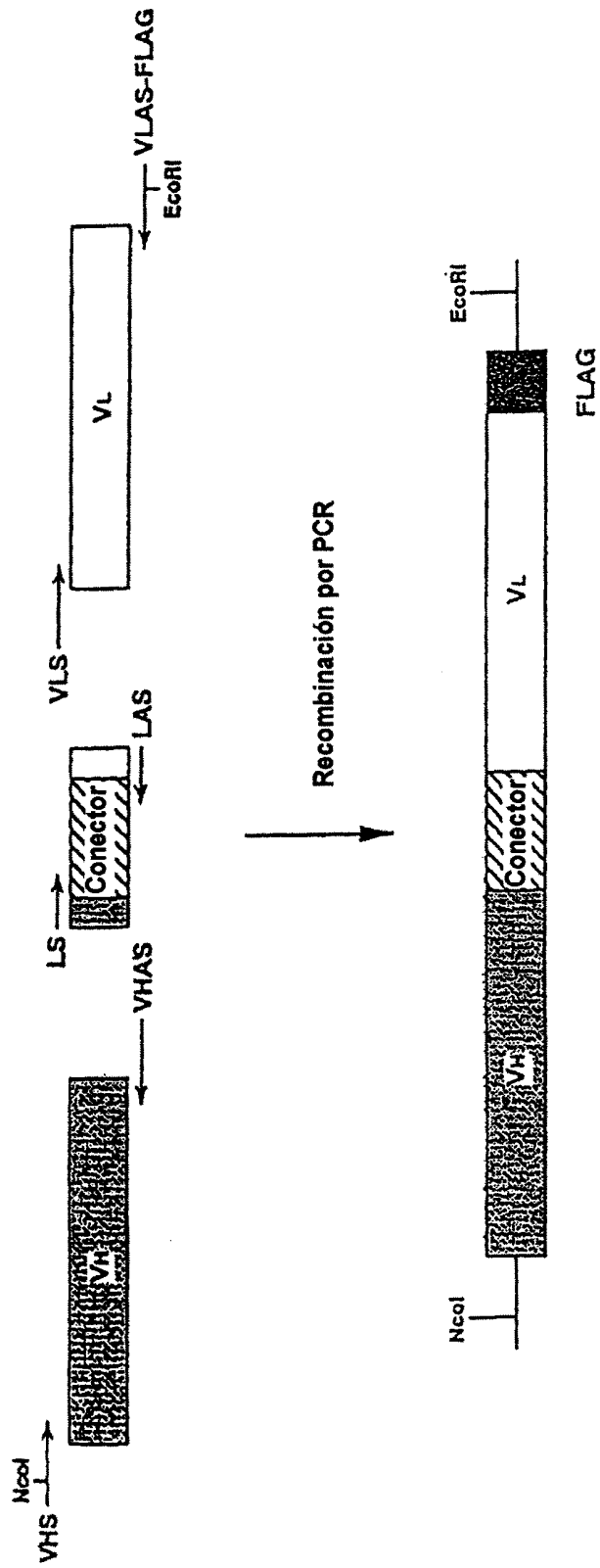


Fig. 5

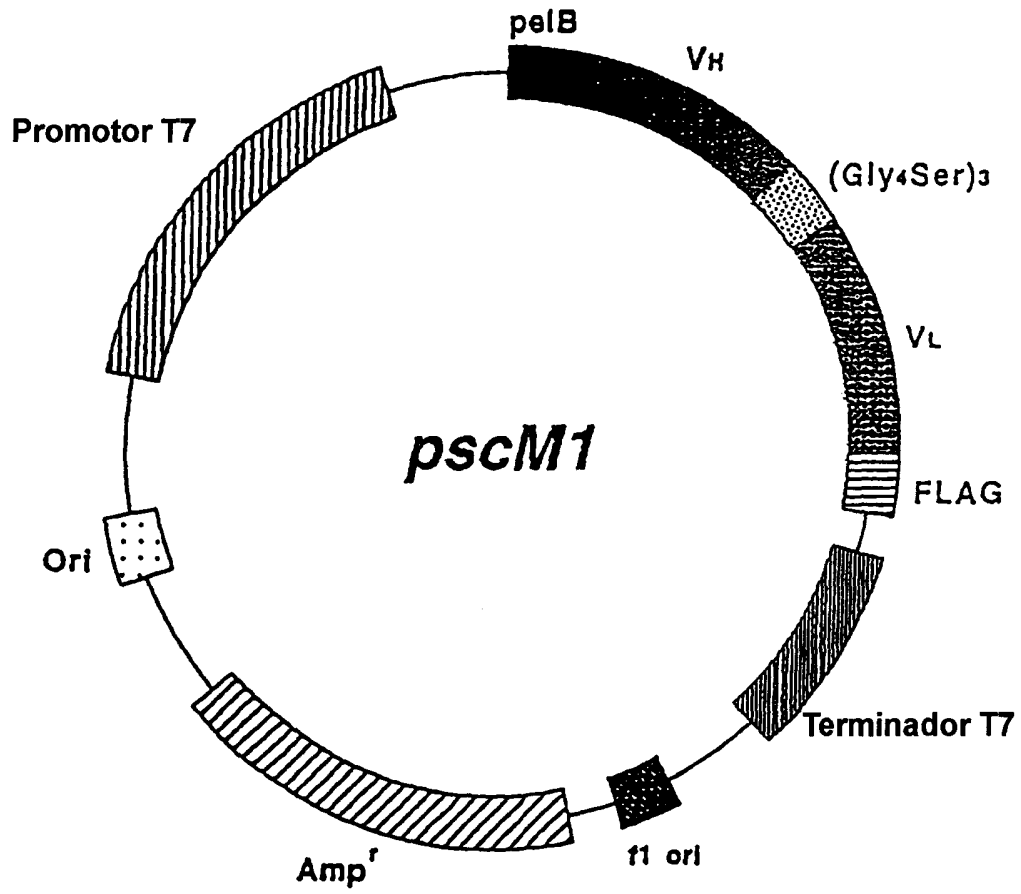


Fig. 6

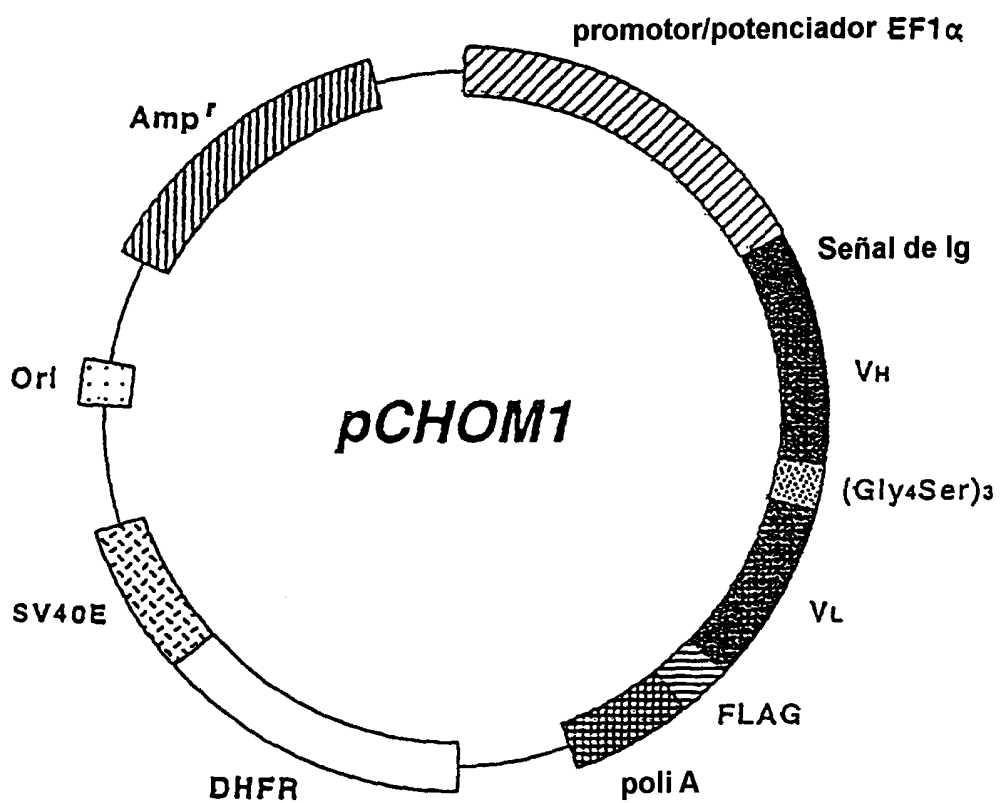


Fig. 7

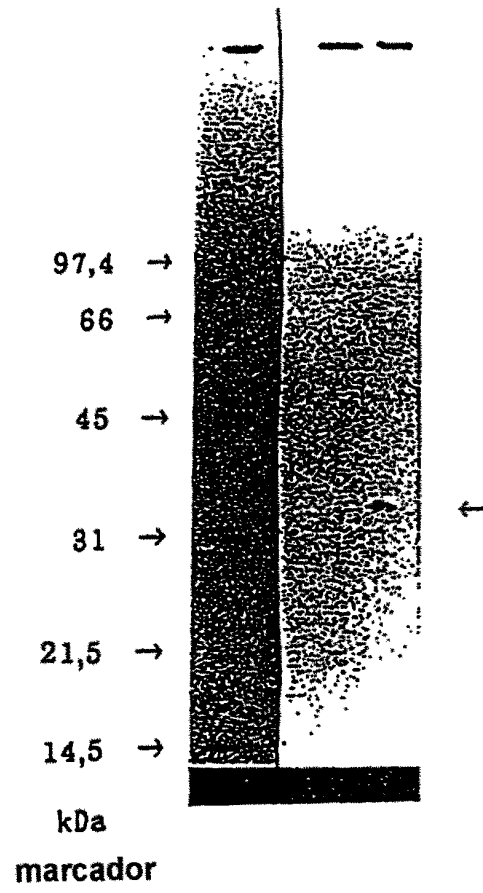


Fig. 8

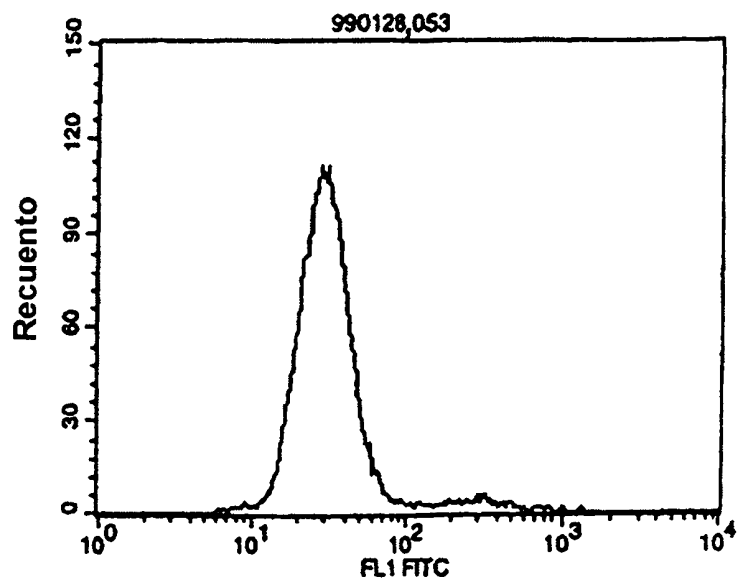


Fig. 9

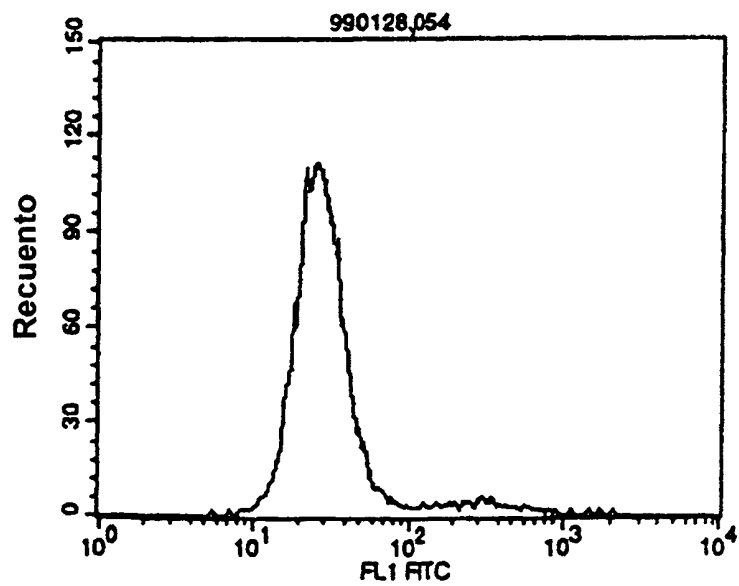


Fig. 10

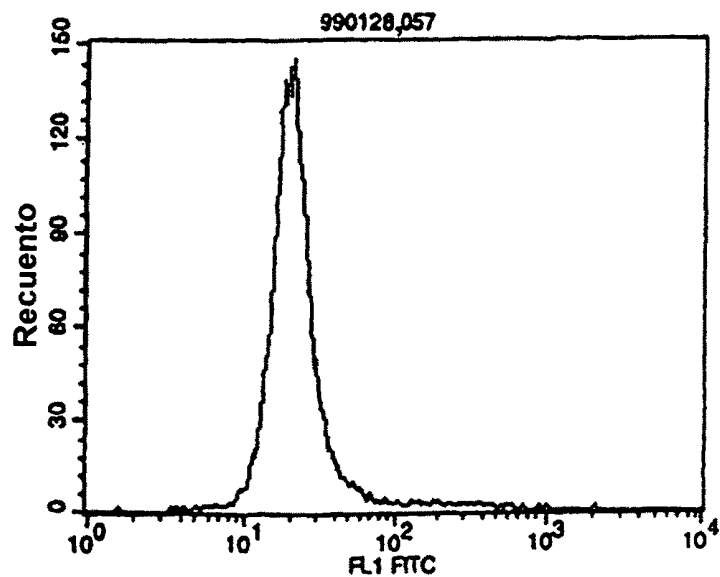


Fig. 11

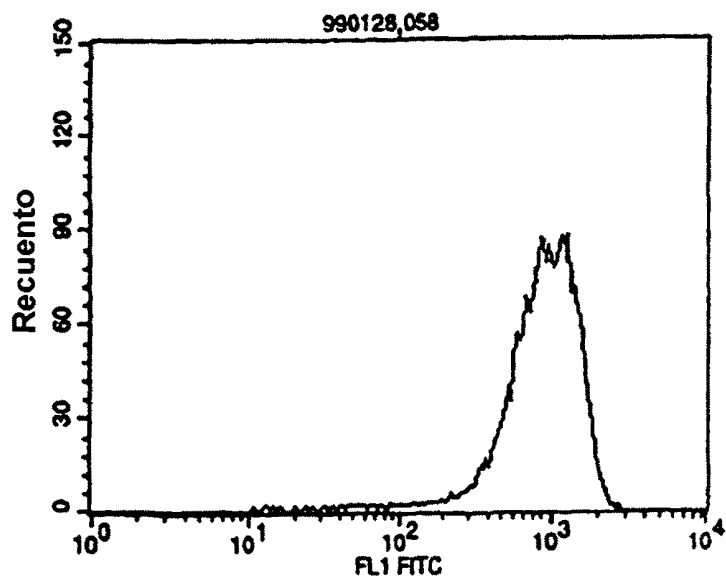


Fig. 12

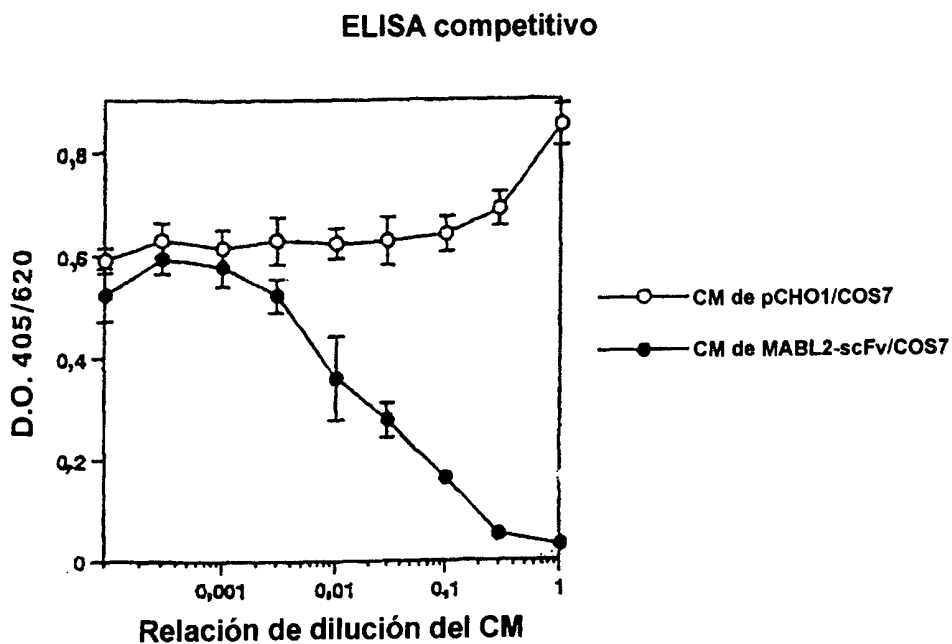


Fig. 13

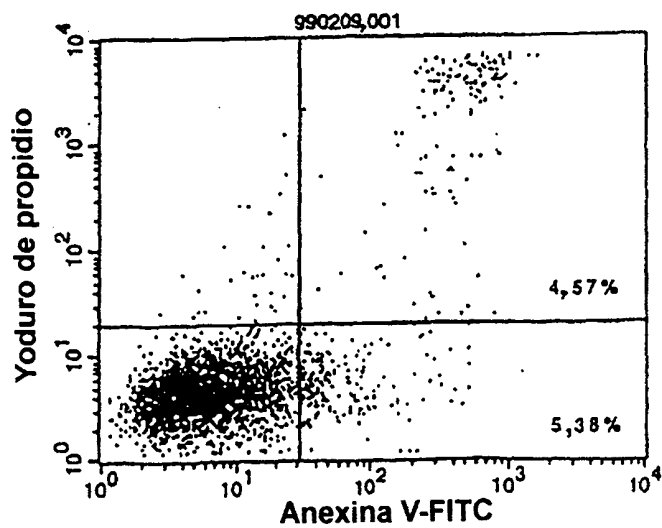


Fig. 14

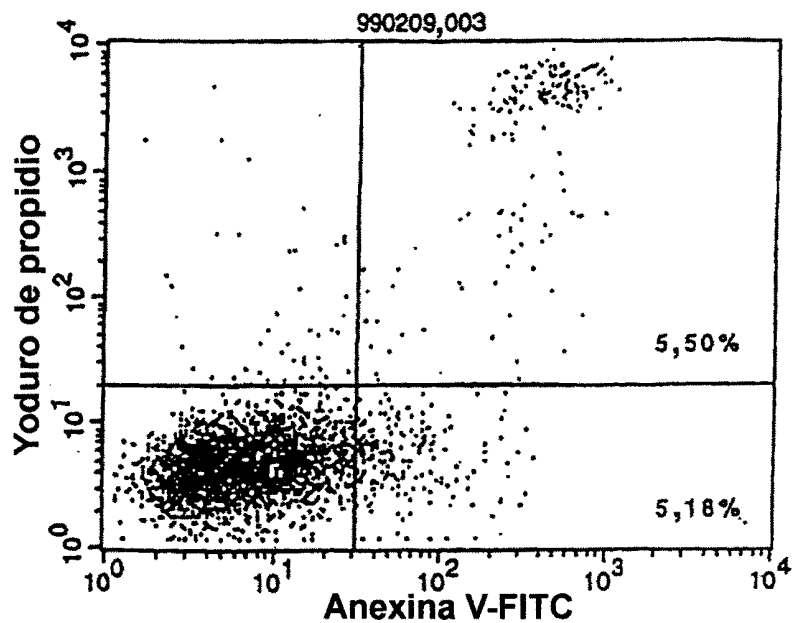


Fig. 15

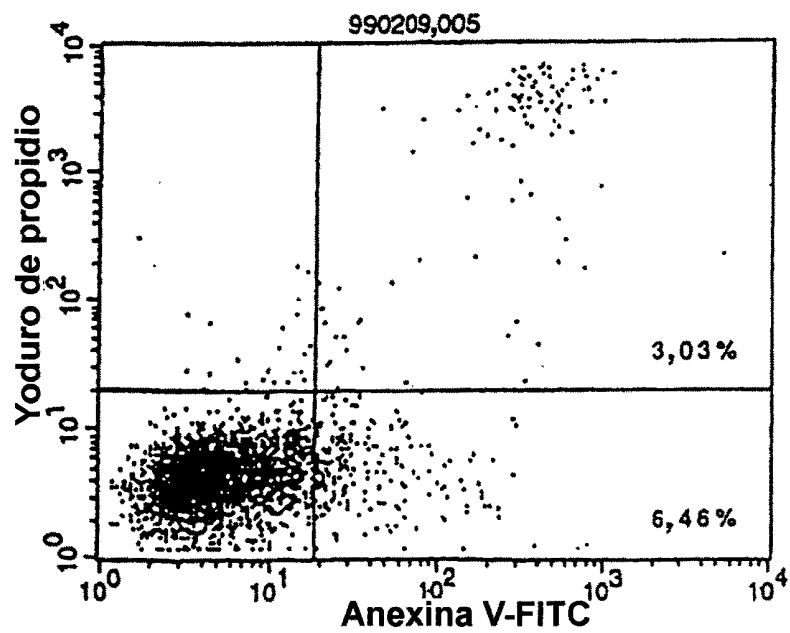


Fig. 16

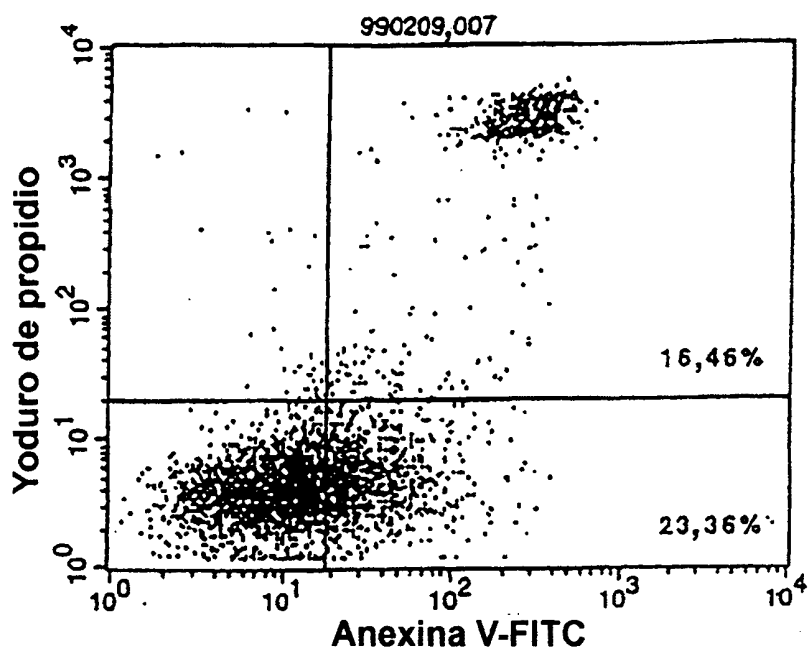


Fig. 17

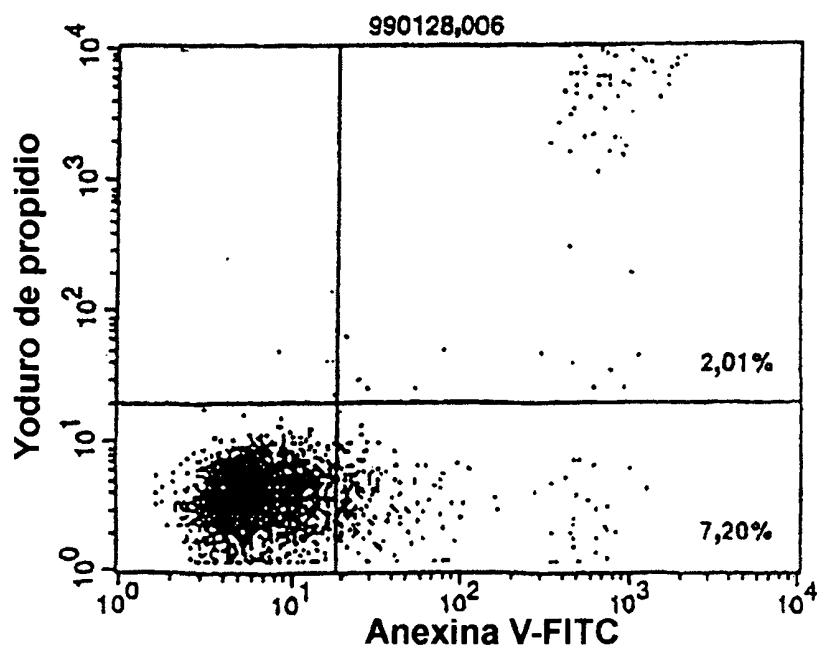


Fig. 18

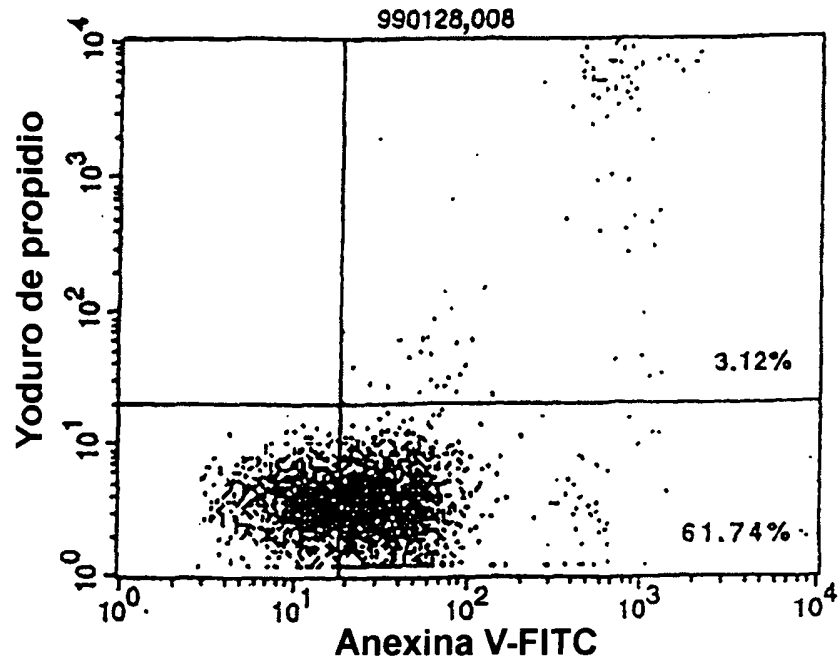


Fig. 19

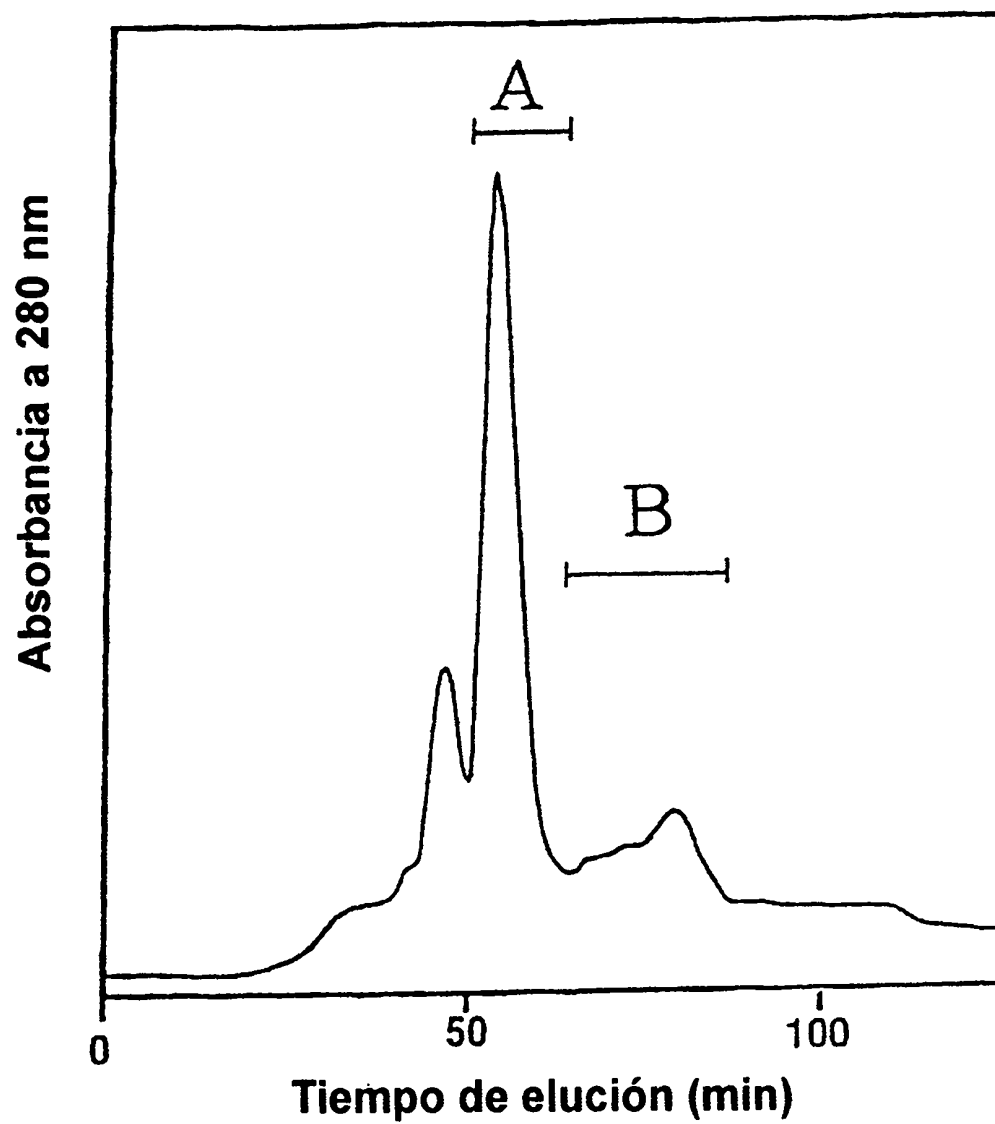


Fig. 20

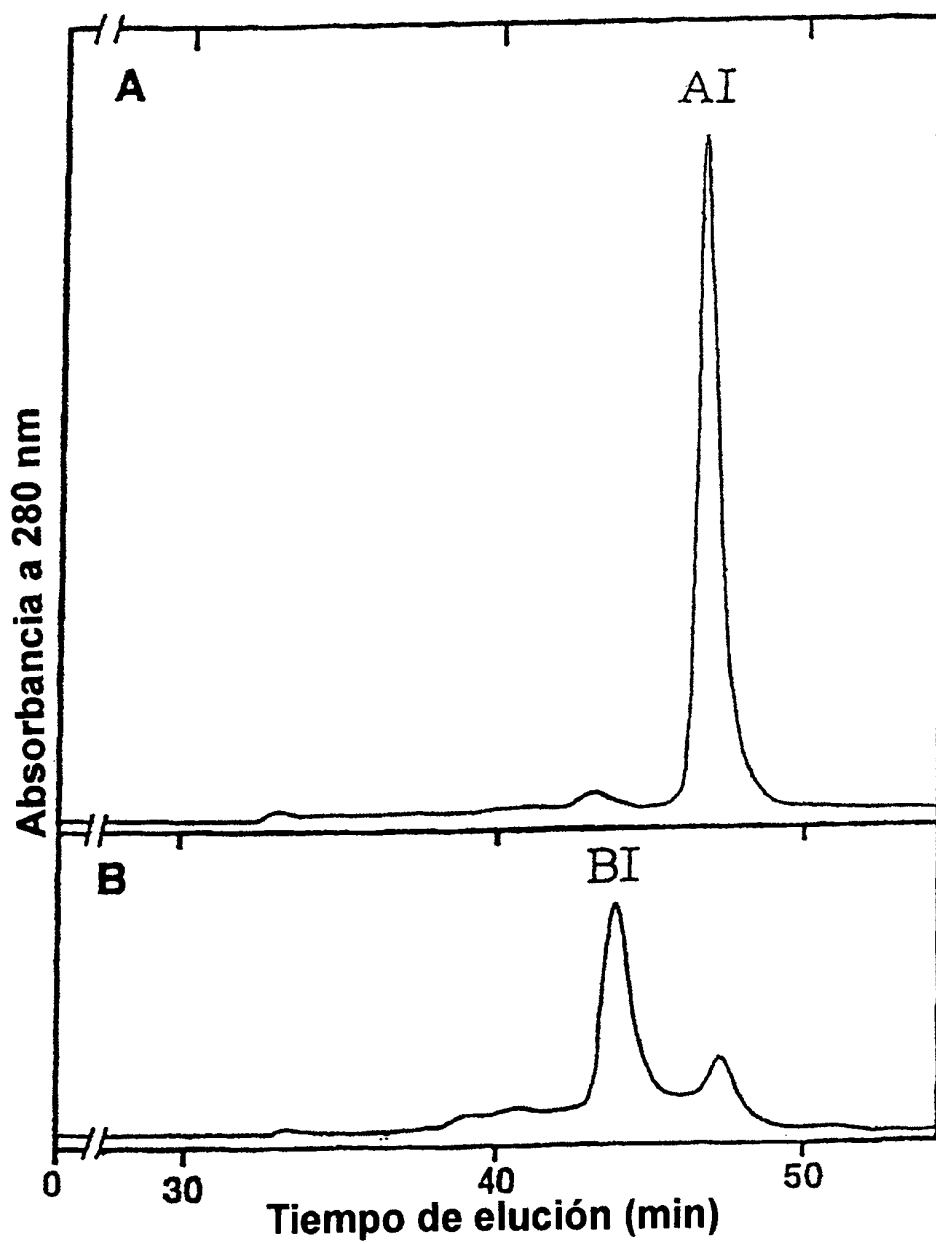


Fig. 21

Análisis por SDS-PAGE de MABL2-scFv

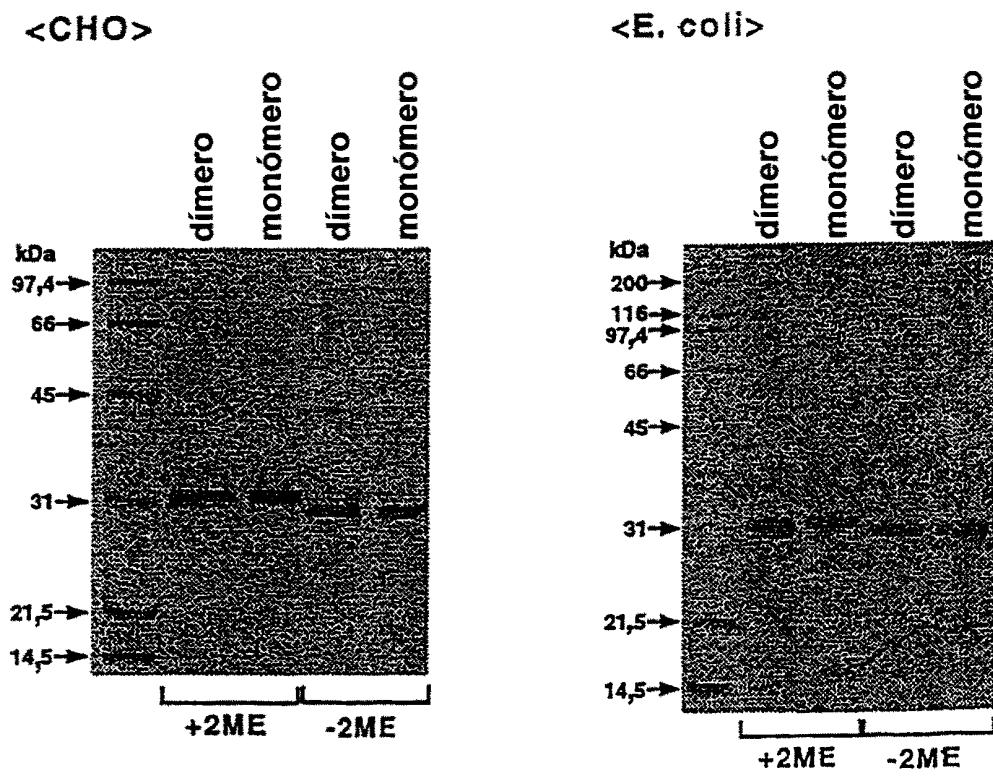


Fig. 22

Gel TSK G3000SW

Tampón de acetato 20 mM, NaCl 0,15 M, pH 6,0

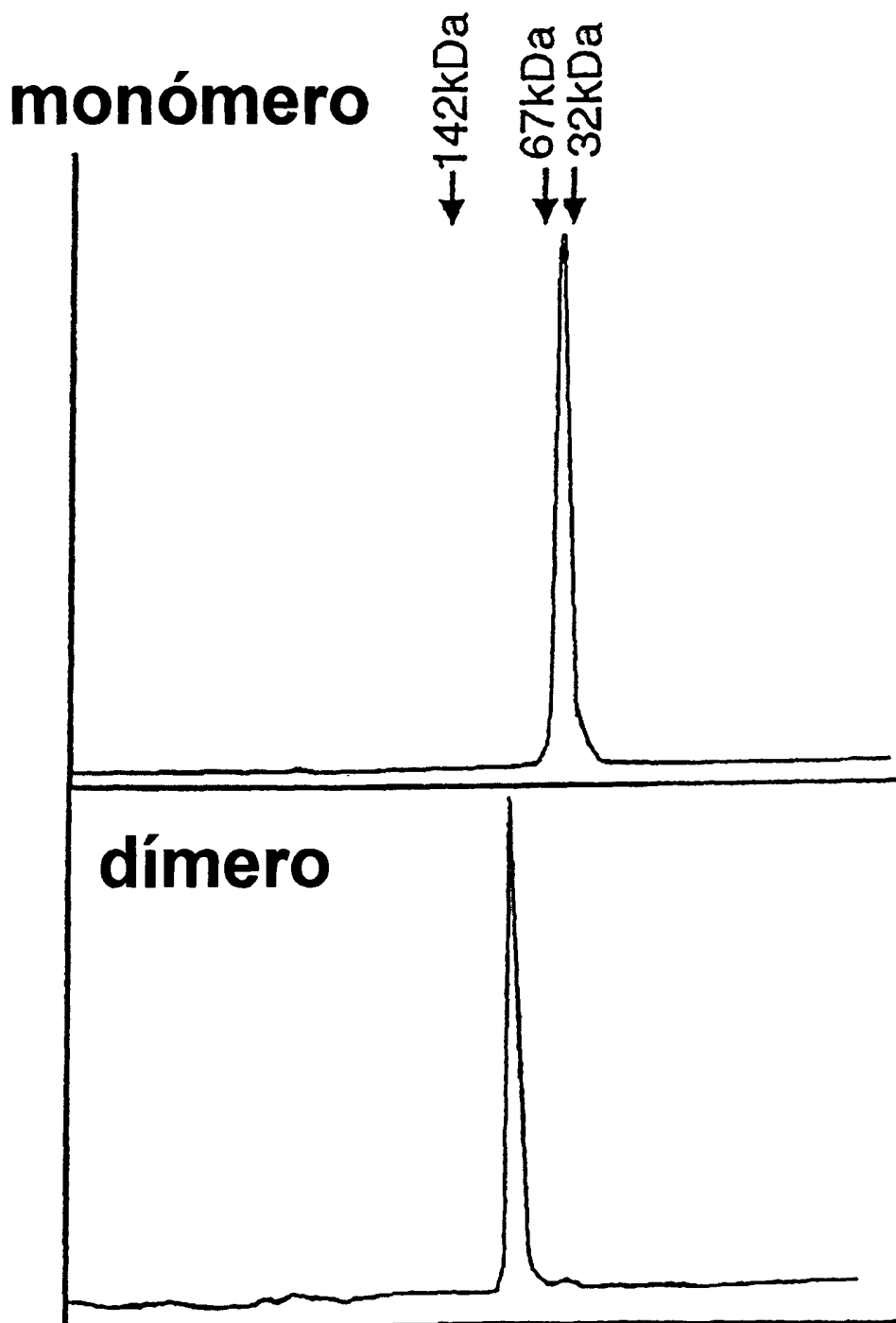
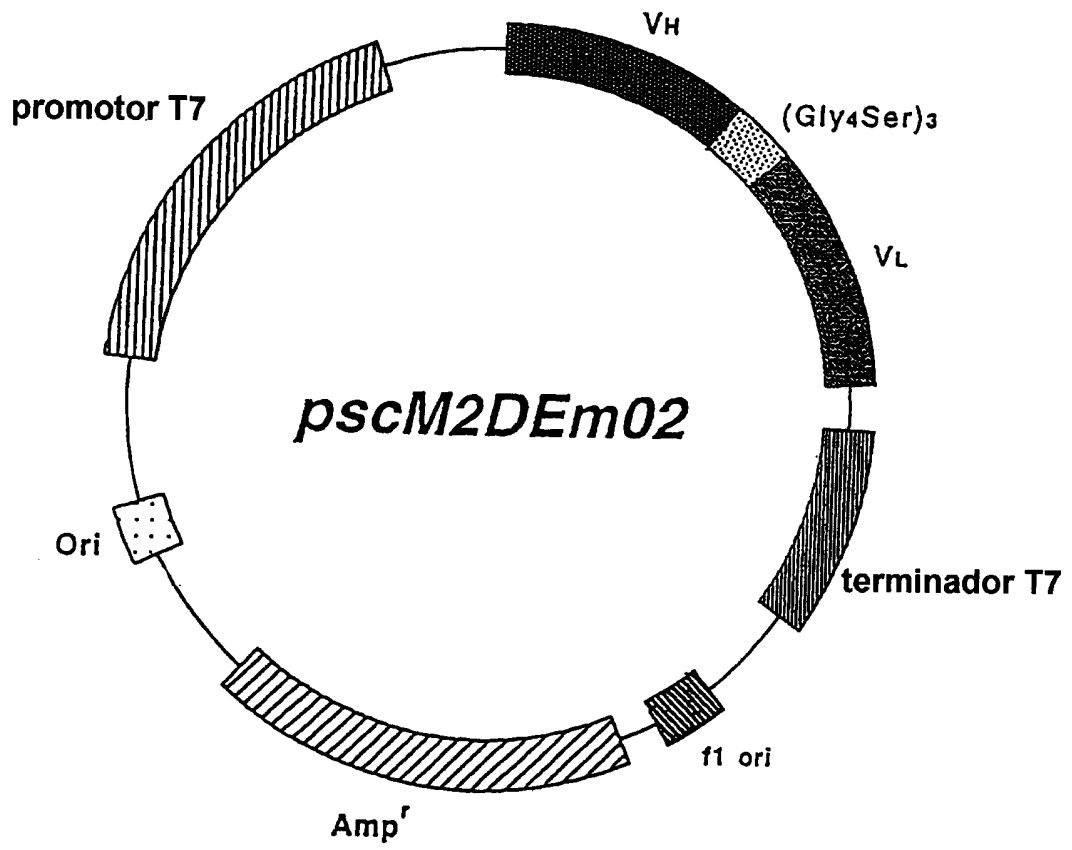


Fig. 23



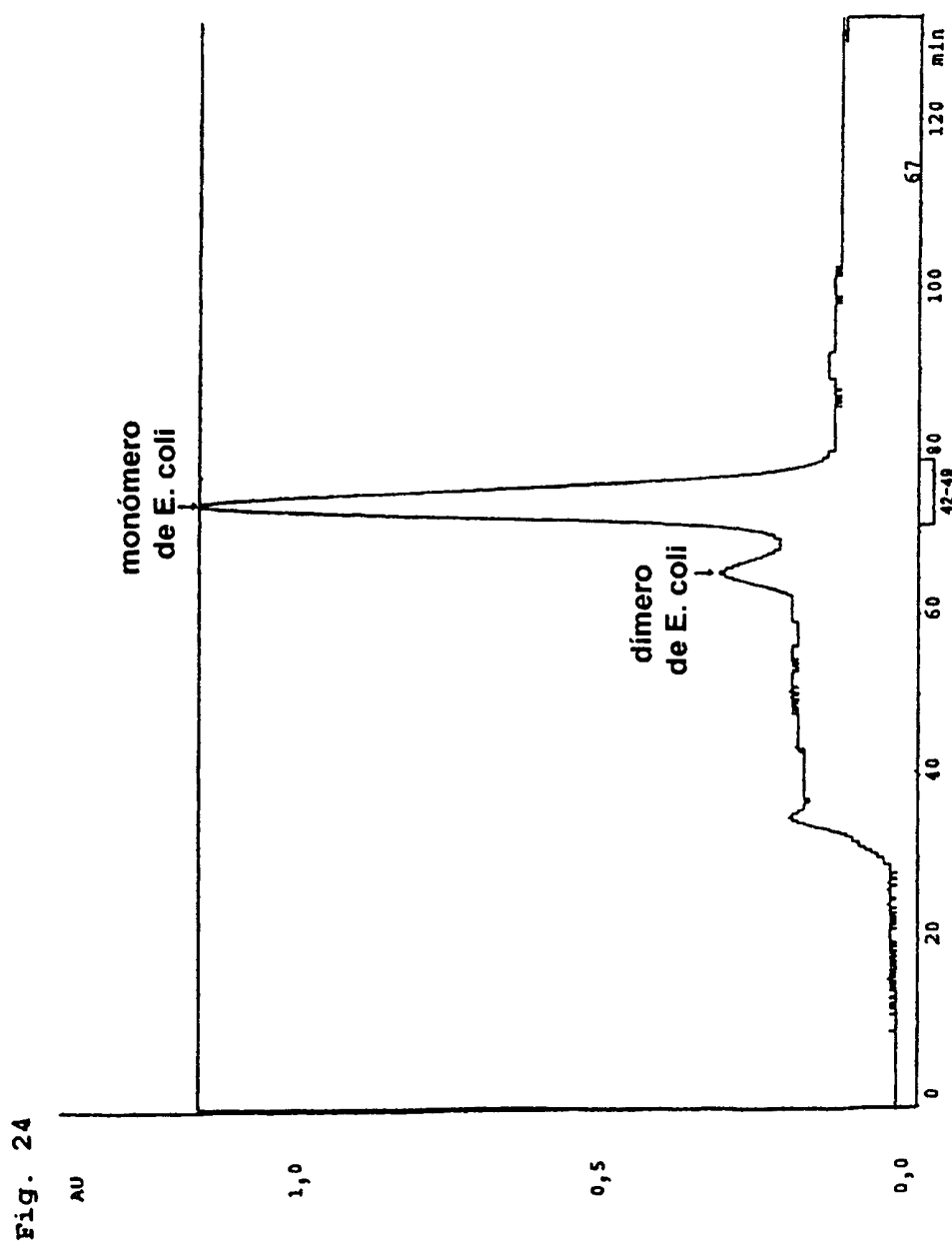


Fig. 25

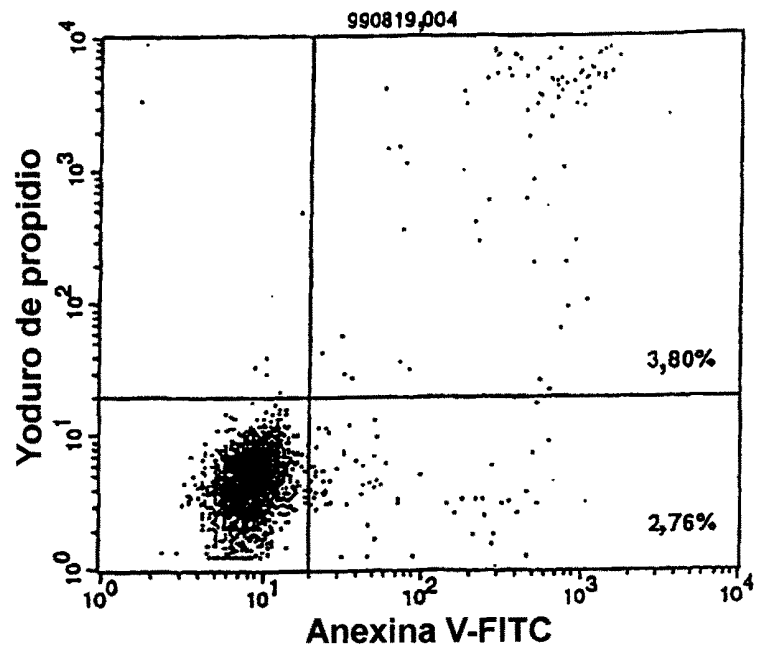


Fig. 26

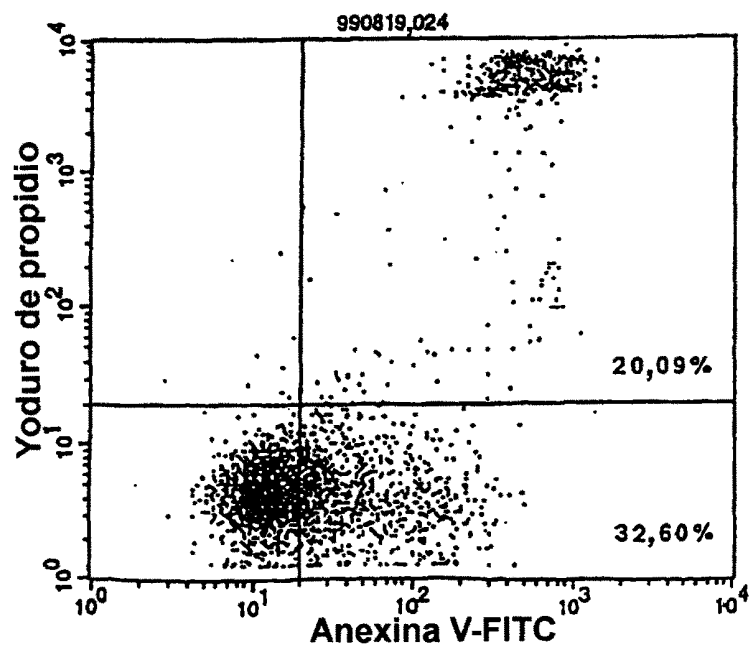


Fig. 27

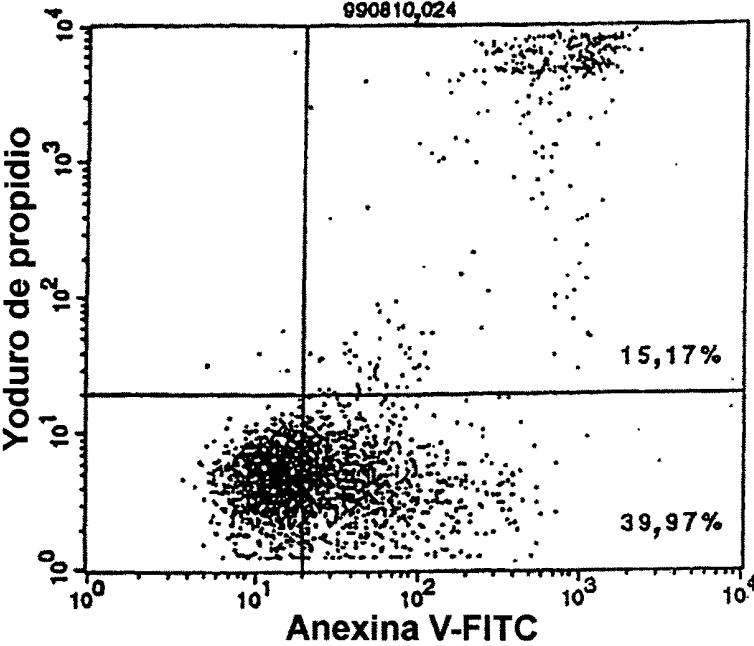


Fig. 28

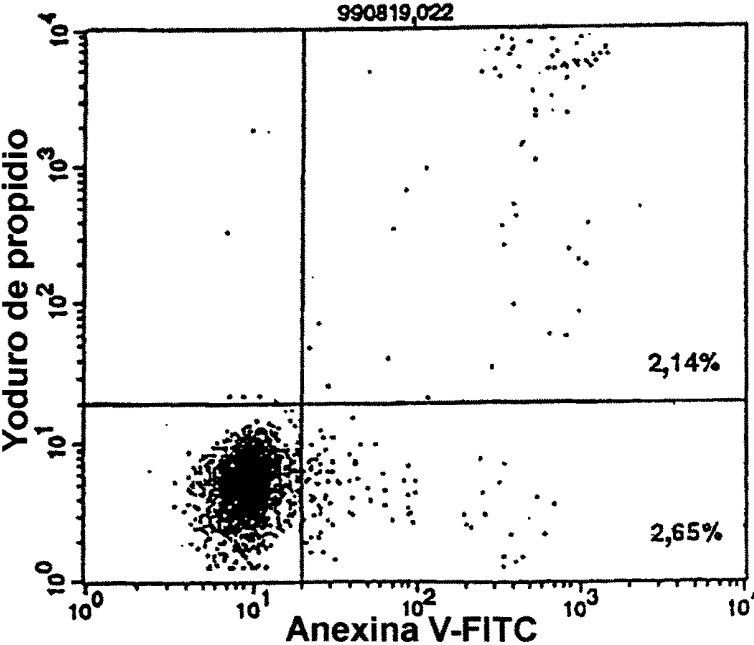


Fig. 29

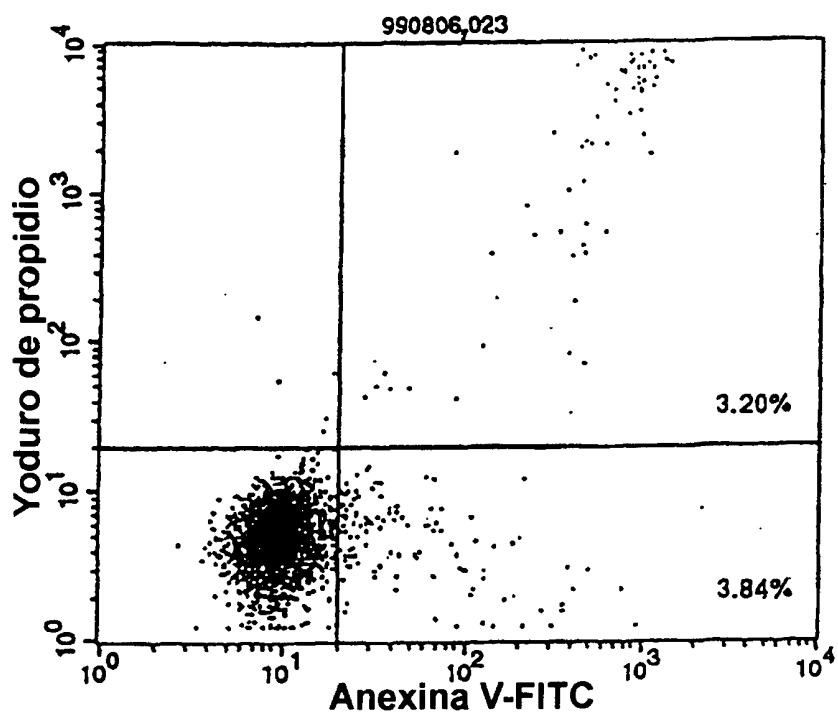


Fig. 30

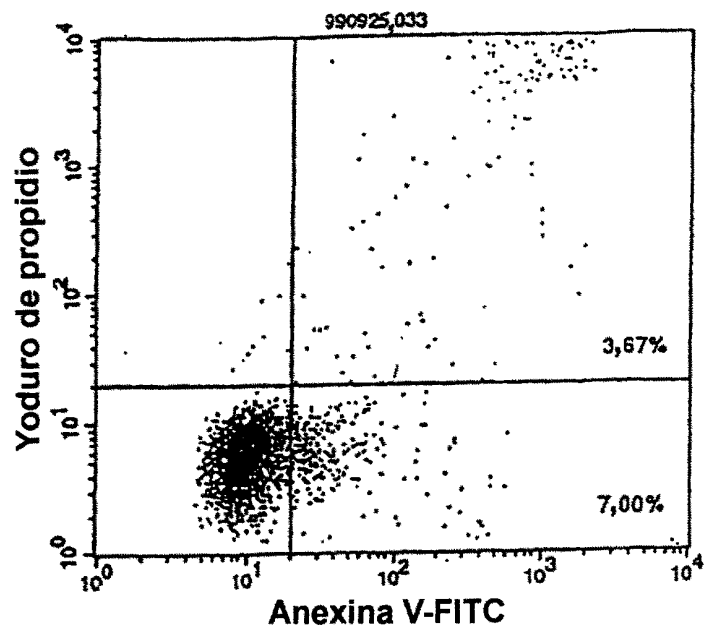


Fig. 31

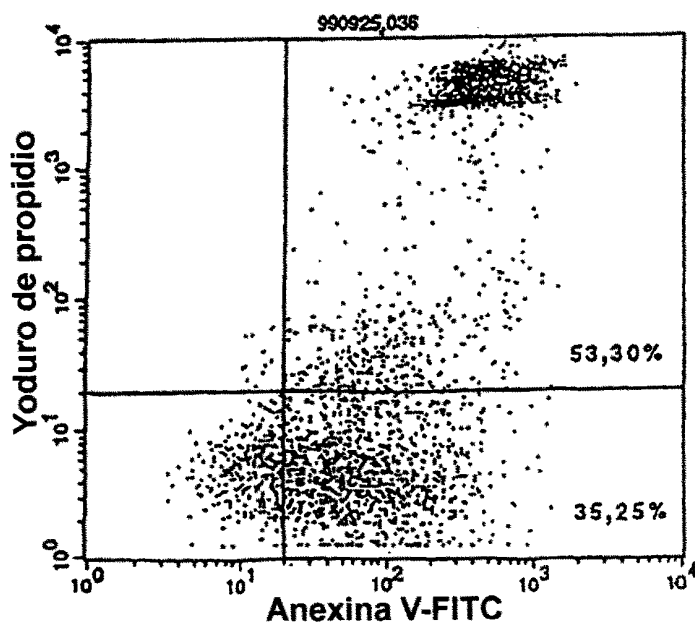


Fig. 32

Efecto de MABL-2(scFv) sobre la hlgG del suero en ratones SCID, KPMM2 i.v.

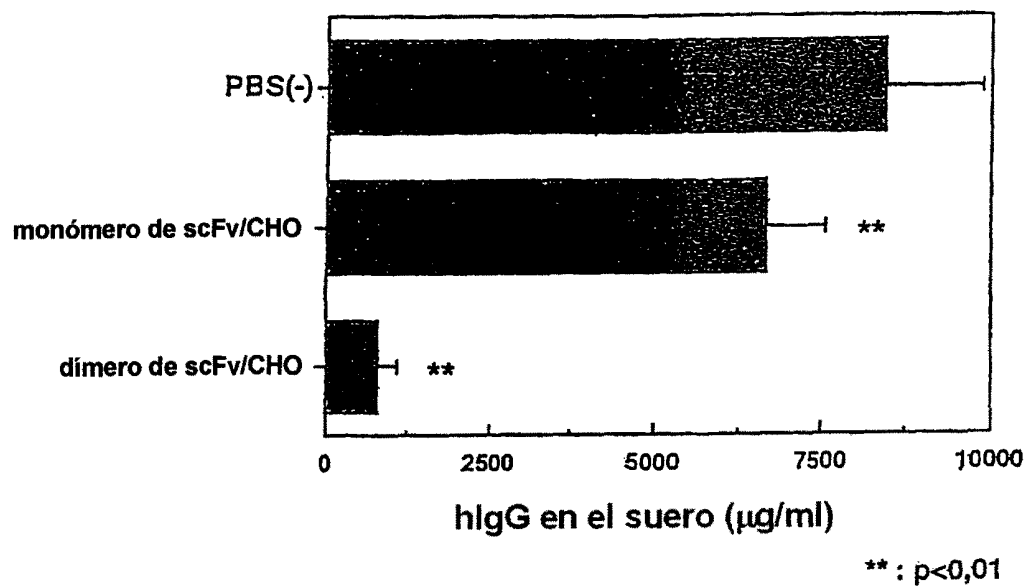
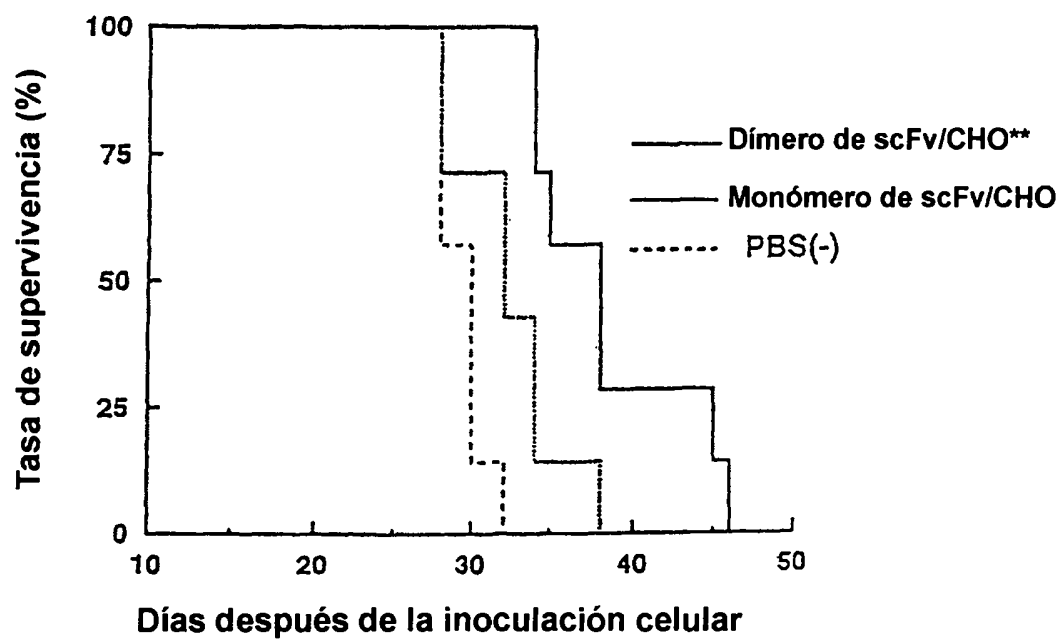


Fig. 33

Efecto de MABL-2(scFv) sobre la supervivencia de ratones SCID, KPMM2 i.v.



**; P<0,01 por ensayo t

Fig. 34

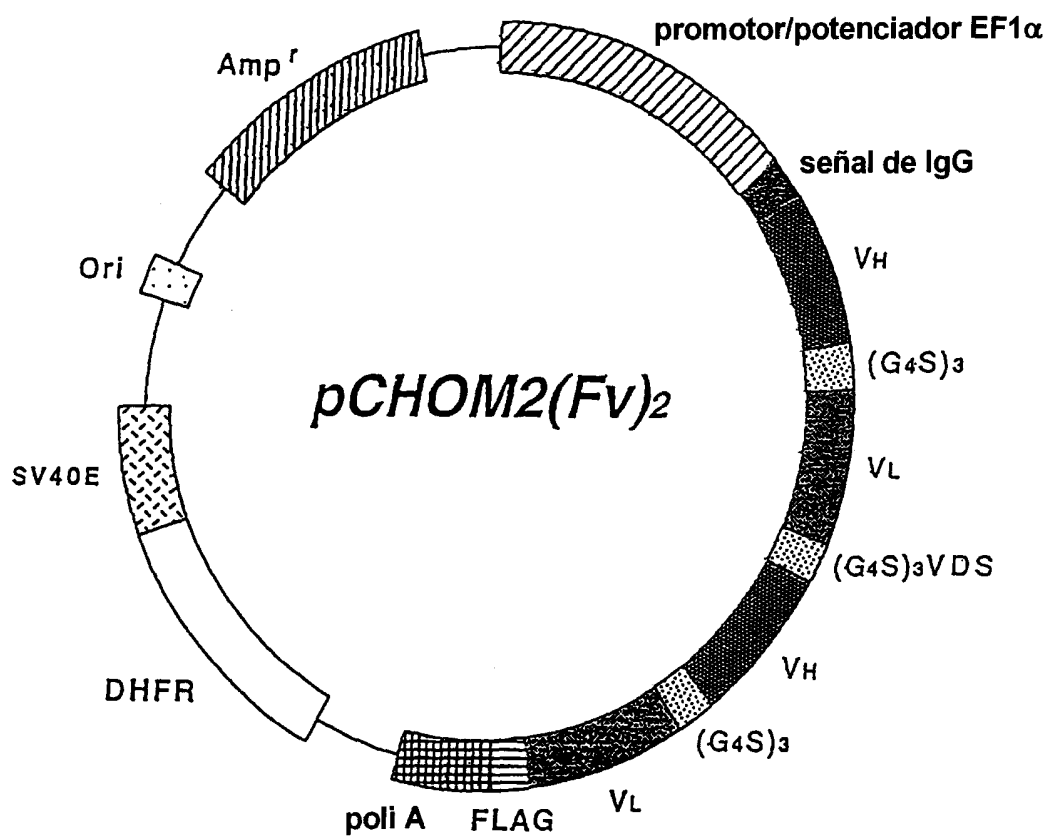


Fig. 35

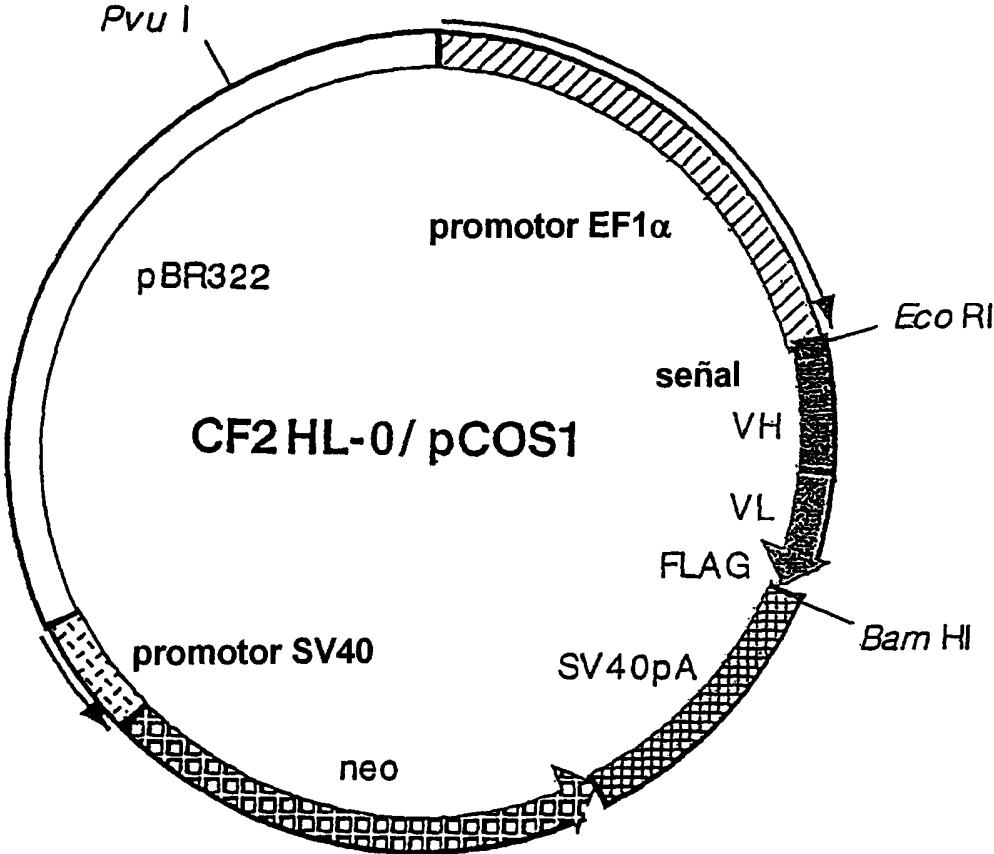


Fig. 37

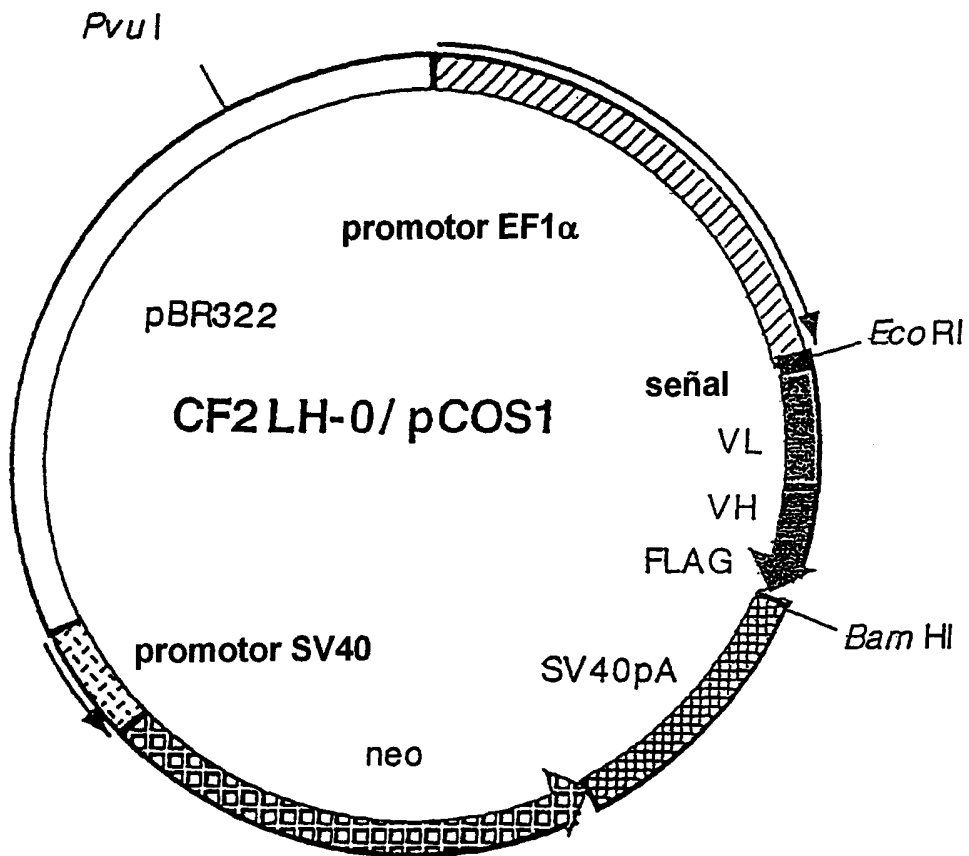


Fig. 39

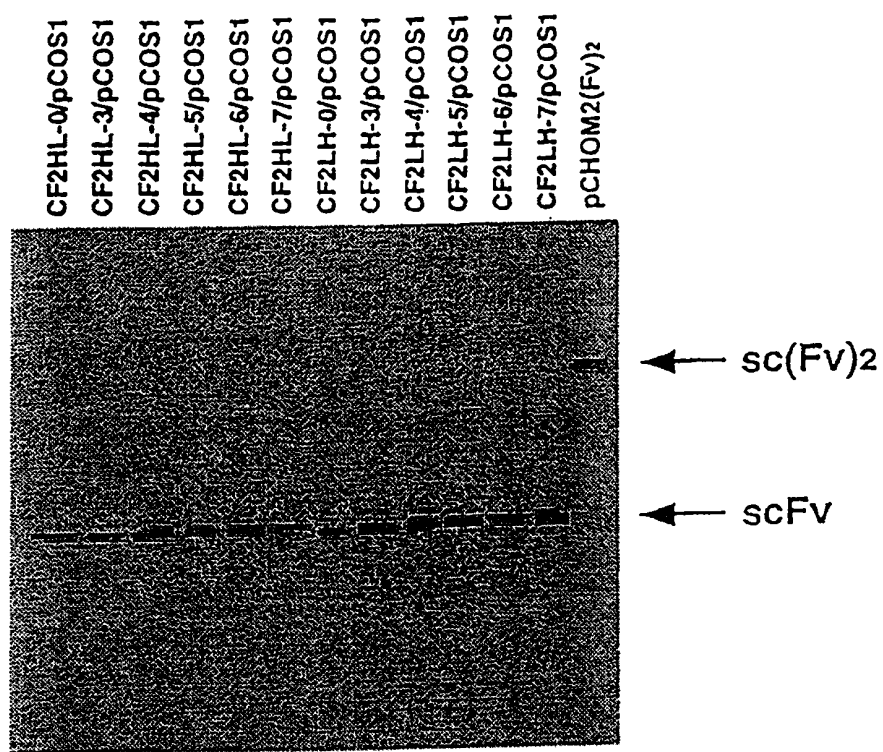


Fig. 40a

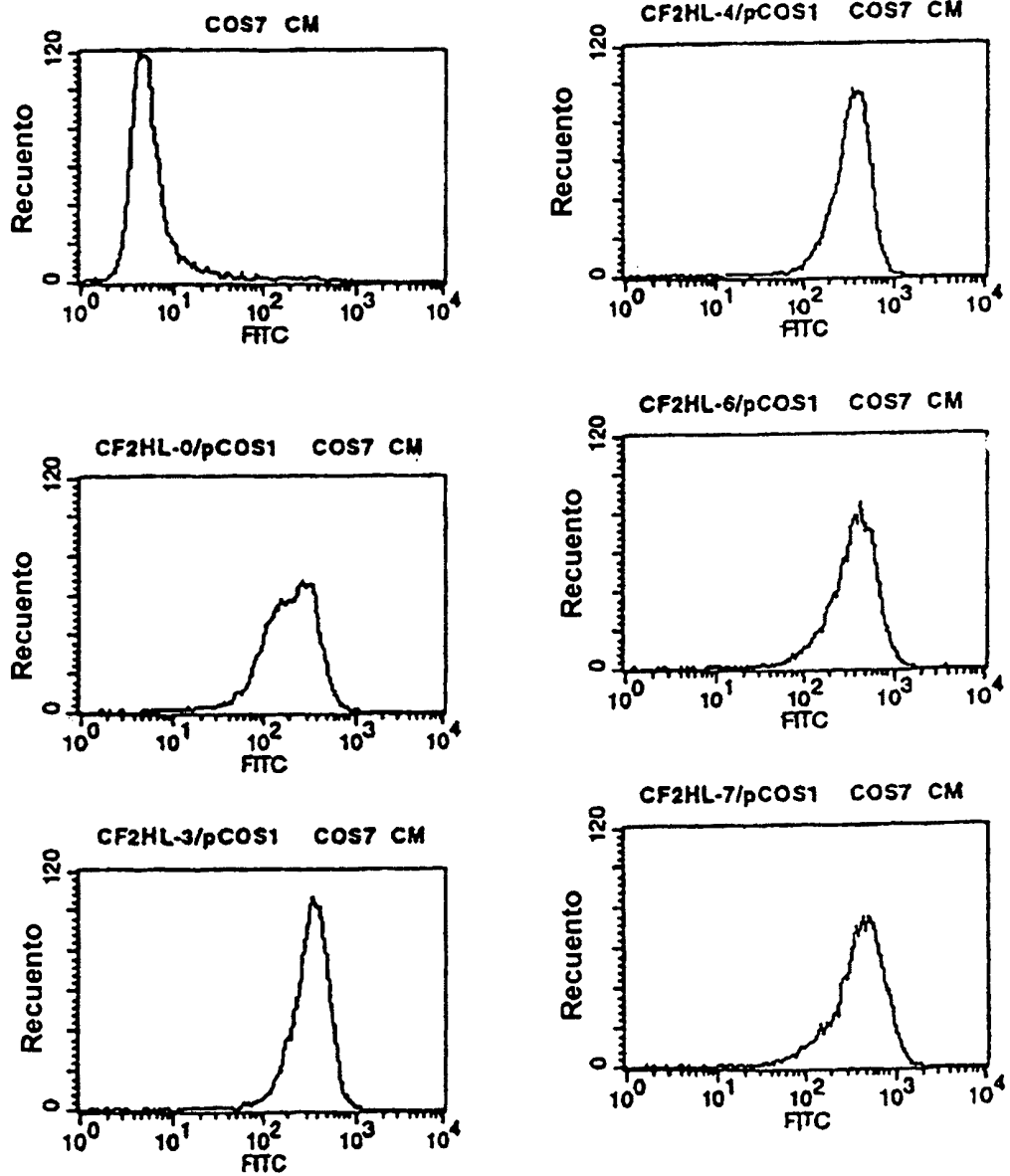


Fig. 40b

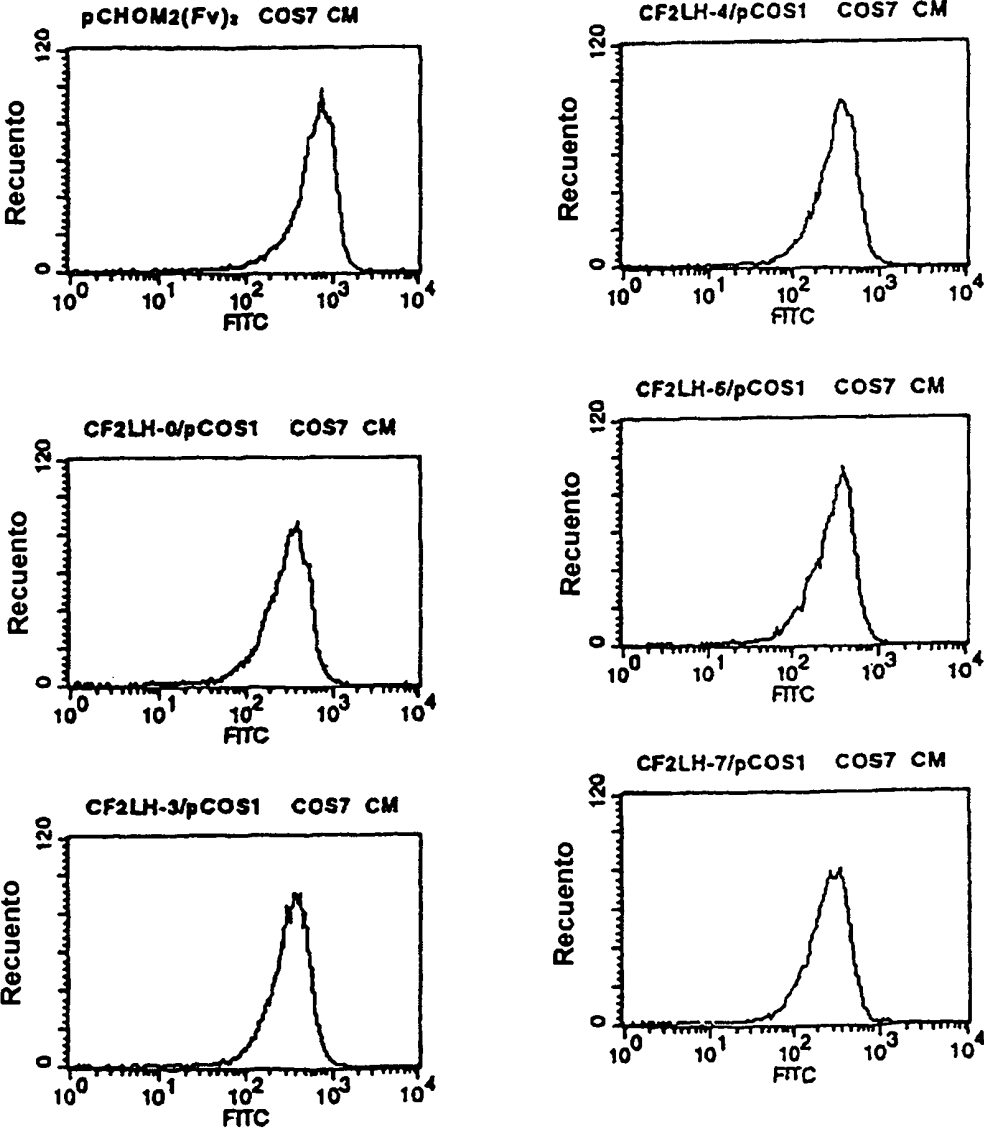


Fig. 41

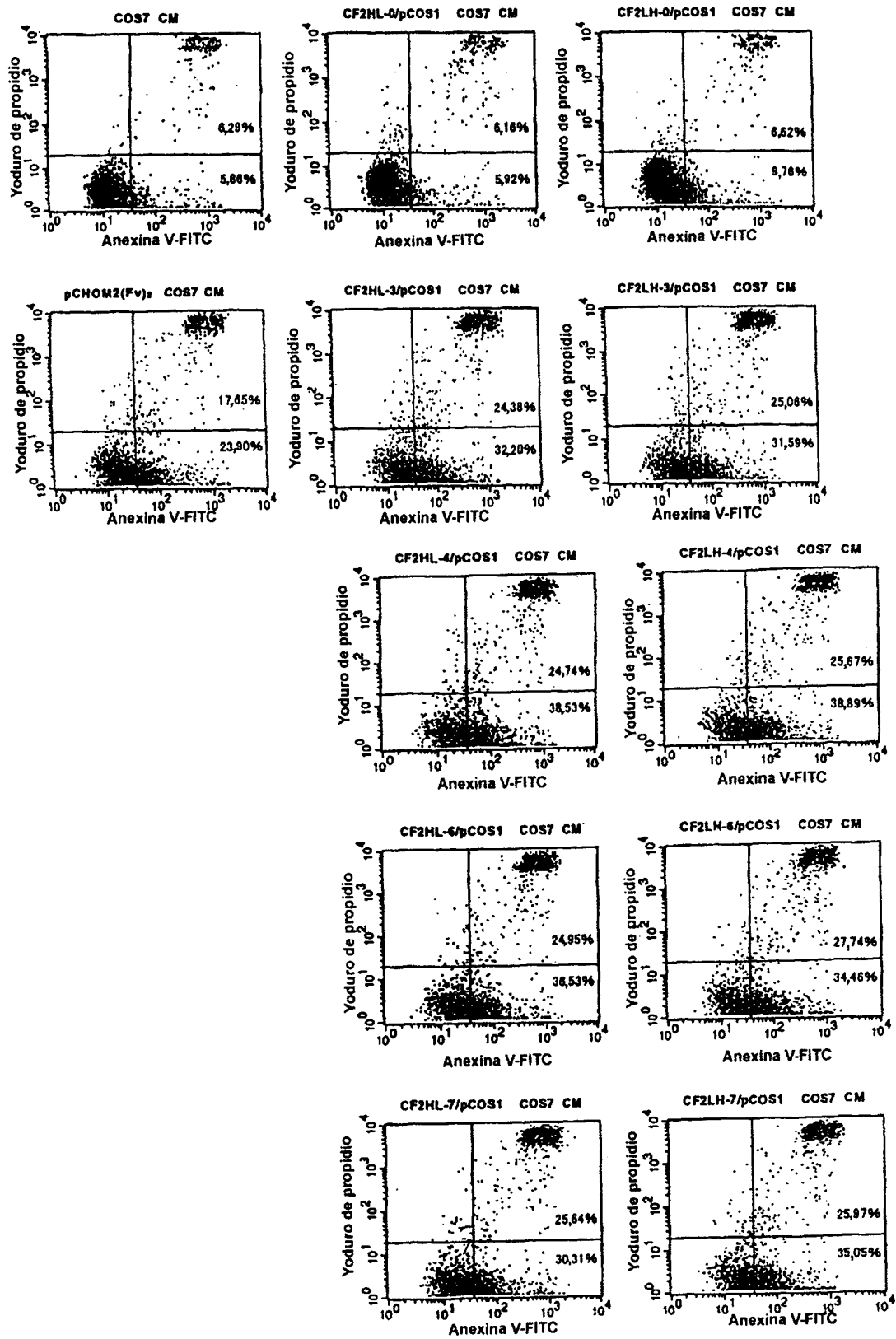


Fig. 42

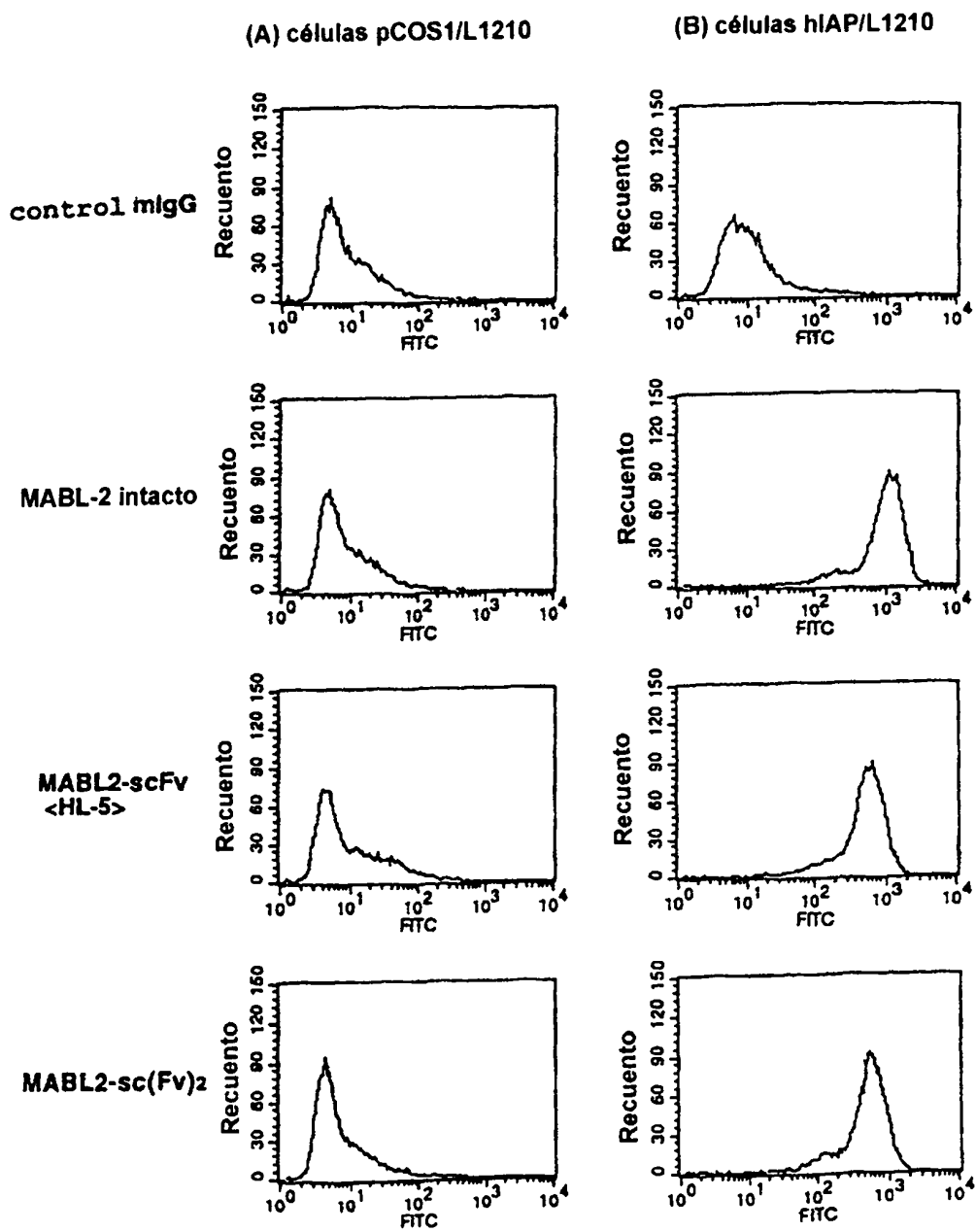


Fig. 43

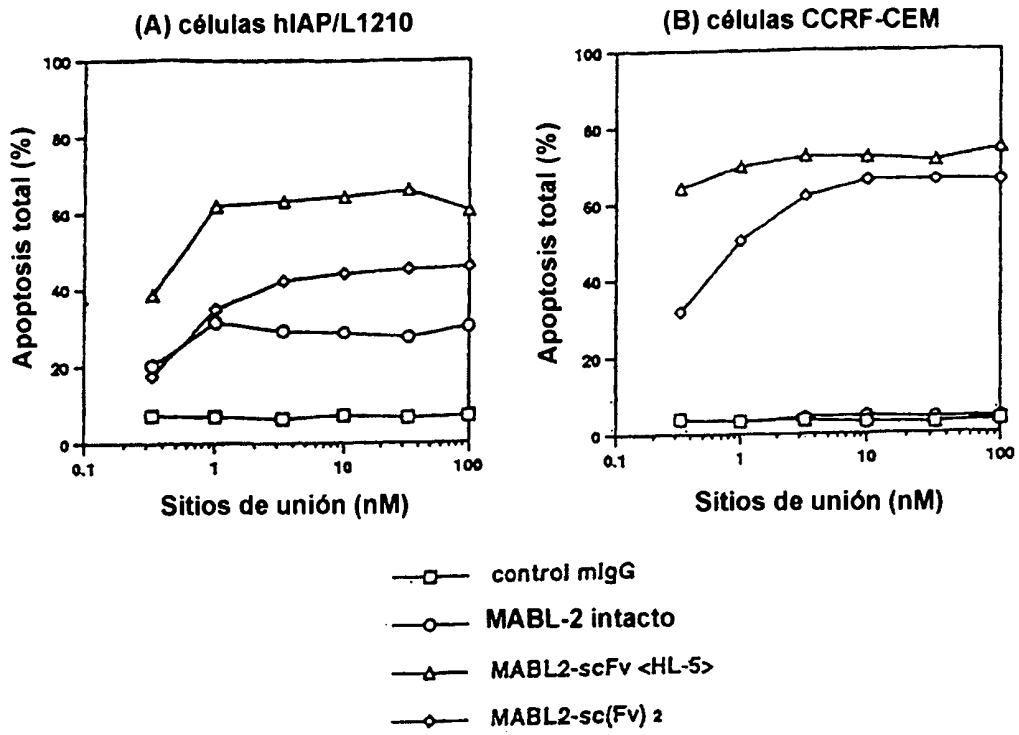


Fig. 44

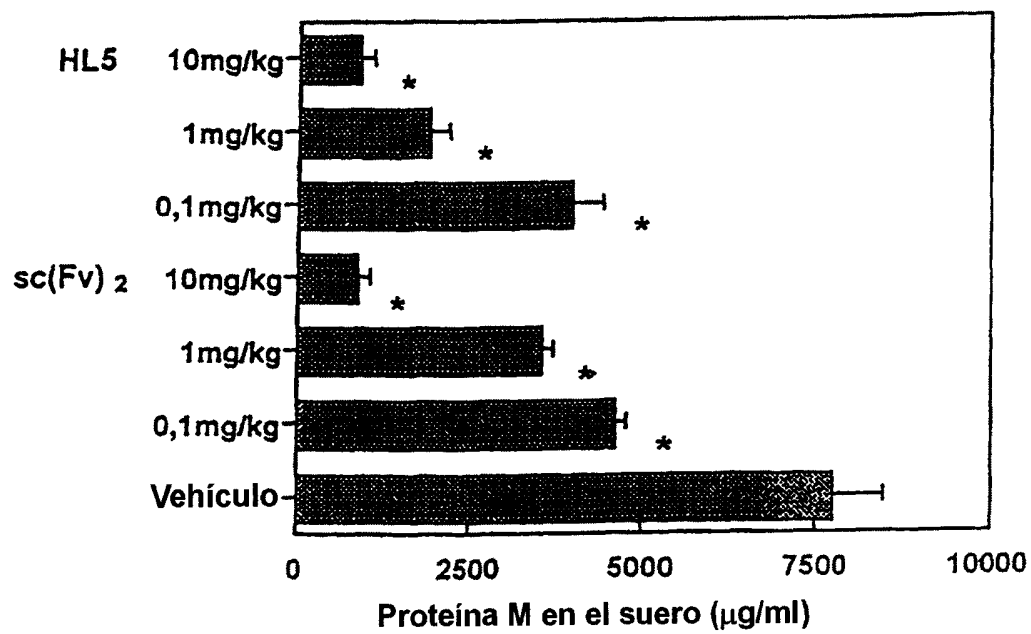


Fig. 45

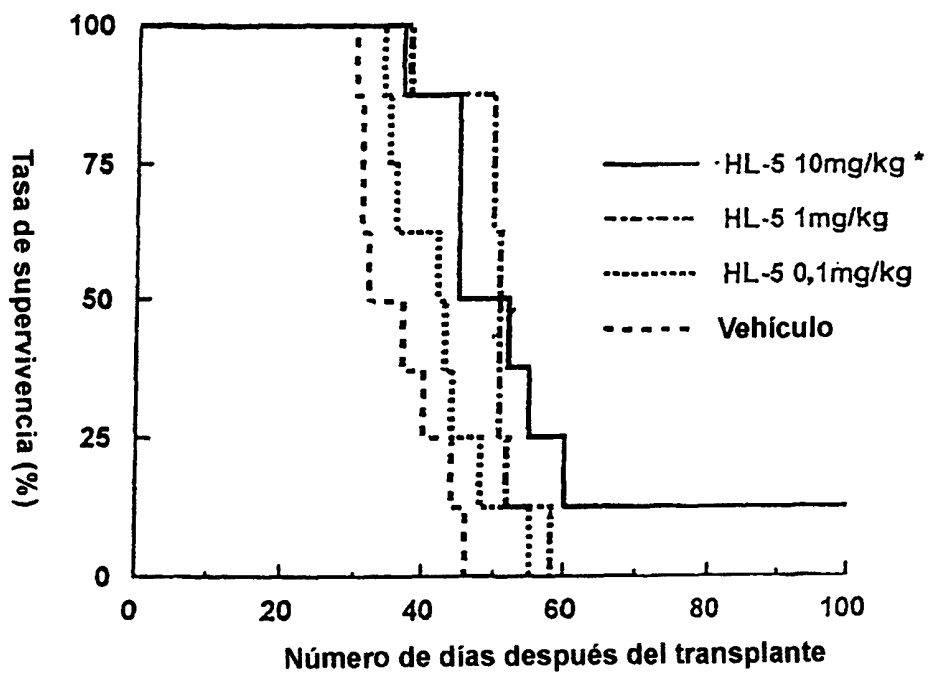
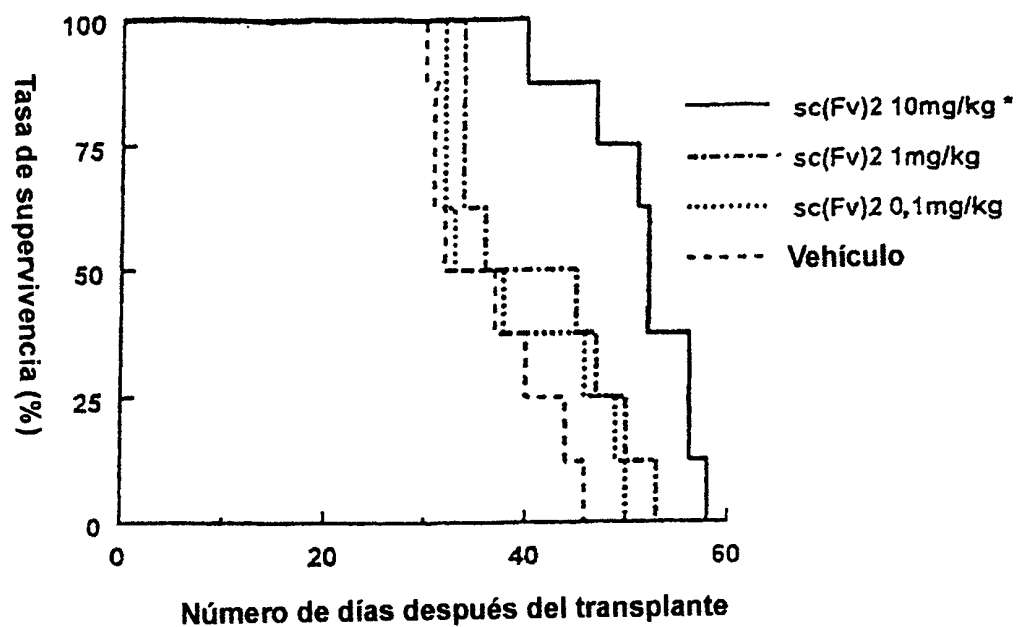


Fig. 46



ES 2 312 418 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA
5 <120> Polipéptido inductor de apoptosis
<130> FOP-415
<141> 12-3-2001
<150> US 09/523.095
10 <151> 10-3-2000
<150> JP2000-115246
<151> 17-04-2000
<150> JP2000-321822
15 <151> 20-10-2000
<160> 54
<210> 1
20 <211>27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
25 <223> Cebador de PCR

<400> 1
30 **ccatcctaat acgactcact atagggc 27**

<210> 2
<211> 27
35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador de PCR
40
<400> 2
ggatcccggg tggatggtgg gaagatg 27
45
<210> 3
<211> 28
<212> ADN
50 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador de PCR

55 <400> 3
ggatcccggg ccagtggata gacagatg 28
60
<210> 4
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
65 <220>
<223> Cebador de PCR

ES 2 312 418 T3

<400> 4

ggatccccggg agtggataga cccgatg 26

5 <210> 5

<211> 394

<212> ADN

<213> Mus

10 <220>

<221> CDS

<222> (1)...(393)

15 <223> pGEM-M1L. 1~57; péptido señal, 58~394; péptido maduro

<400> 5

20 **atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct 45**
Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro
5 10 15

25 **gcg tcc agc agt gat gtt gtg atg acc caa act cca ctc tcc ctg 90**
Ala Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu
20 25 30

30 **cct gtc agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt 135**
Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
35 40 45

35 **cag agc ctt cta cac agt aaa gga aac acc tat tta caa tgg tac 180**
Gln Ser Leu Leu His Ser Lys Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Tyr
40 50 55 60

45 **cta cag aag cca ggc cag tct cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt 225**
Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val
65 70 75

50 **tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga 270**
Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly
80 85 90

55 **tca ggg aca gat ttc aca ctc aag atc agc aga gtg gag gct gag 315**
Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
95 100 105

60 **gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac 360**
Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr
110 115 120

65 **acg tcc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa c 394**
Thr Ser Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
125 130

ES 2 312 418 T3

5 ggt act aag tac aat gag aag ttc aag ggc aag gcc aca ctg act 270
 Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr
 80 85 90
 10 tca gag aaa tcc tcc agc gca gcc tac atg gag ctc agc agc ctg 315
 Ser Glu Lys Ser Ser Ser Ala Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu
 95 100 105
 15 gcc tct gag gac tct gcg gtc tac tac tgt gca aga ggg ggt tac 360
 Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr
 20 110 115 120
 25 tat agt tac gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc 405
 Tyr Ser Tyr Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser
 125 130 135
 30 tca g 409

Ser

35 <210> 7
 <211> 394
 <212> ADN
 40 <213> Mus
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(393)
 45 <223> pGEM-M2L. 1~57; péptido señal, 58~394; péptido maduro
 <400> 7

50 atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct 45
 Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro
 55 5 10 15
 60 ggt tcc agc agt gat gtt gtg atg acc caa agt cca ctc tcc ctg 90

60

65

ES 2 312 418 T3

Gly Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu
 20 25 30
 5 cct gtc agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tca agt 135
 Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
 10 35 40 45
 15 cag agc ctt gtg cac agt aat gga aag acc tat tta cat tgg tac 180
 Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu His Trp Tyr
 20 50 55 60
 25 ctg cag aag cca ggc cag tct cca aaa ctc ctg atc tac aaa gtt 225
 Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val
 30 65 70 75
 35 tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga 270
 Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly
 40 80 85 90
 45 tca gtg aca gat ttc aca ctc atg atc agc aga gtg gag gct gag 315
 Ser Val Thr Asp Phe Thr Leu Met Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
 50 95 100 105
 55 gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac 360
 Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr
 110 115 120
 60 acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa c 394
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 65 125 130

<210> 8

<211> 409

<212> ADN

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(408)

<223> pGEM-M2H. 1~57; péptido señal, 58~409; péptido maduro

ES 2 312 418 T3

<400> 8

atg gaa tgg agc tgg ata ttt ctc ttc ctc ctg tca gga act gca 45
 5 Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala
 5 10 15
 10 ggt gtc cac tcc cag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gaa ctg 90
 Gly Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu
 15 20 25 30
 gta aag cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga 135
 20 Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly
 35 40 45
 25 tac acc ttc gct aac cat gtt att cac tgg gtg aag cag aag cca 180
 Tyr Thr Phe Ala Asn His Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro
 30 50 55 60
 ggg cag ggc ctt gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat 225
 35 Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp
 65 70 75
 40 ggt act aag tat aat gag aag ttc aag gac aag gcc act ctg act 270
 Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr
 45 80 85 90
 tca gac aaa tcc tcc acc aca gcc tac atg gac ctc agc agc ctg 315
 Ser Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr Met Asp Leu Ser Ser Leu
 50 95 100 105
 gcc tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt gca aga ggg ggt tac 360
 55 Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr
 60
 65

ES 2 312 418 T3

110 115 120
tat act tac gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc 405
5 Tyr Thr Tyr Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser
125 130 135
10 tca g 409
Ser

15

<210> 9

<211> 32

<212> ADN

20

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador de PCR

25

<400> 9

ccaagcttc caccatgaag ttgcctgta gg 32

30

<210> 10

<211> 32

<212> ADN

35

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador de PCR

40

<400> 10

ccaagcttc caccatggaa tggagctgga ta 32

45

<210> 11

<211> 34

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> cebador de PCR

<400> 11

55

cgcgatcca ctcacgtttt atttccagct tggt 34

60

<210> 12

<211> 34

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

65

<220>

<223> cebador de PCR

ES 2 312 418 T3

<400> 12

cgcggatcca ctcacctgag gagactgtga gagt 34

5

<210> 13

<211> 30

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador de PCR

15 <400> 13

catgccatgg cgcaggtcca gctgcagcag 30

20 <210> 14

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> cebador de PCR

<400> 14

30

accaccacct gaggagactg tgagagt 27

<210> 15

35 <211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> cebador de PCR

<400> 15

45 **gtctcctcag gtggtggtgg ttcgggt 27**

<210> 16

<211> 27

50 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador de PCR

55

<400> 16

cacaacatcc gateccgccac cacccga 27

60

<210> 17

<211> 27

<212> ADN

65 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 312 418 T3

<223> cebador de PCR

<400> 17

5 **ggcggatcgg atgttggat gacccaa 27**

<210> 18

<211> 57

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> cebador de PCR

<400> 18

20 **cgggaattct cattatttat cgtcatcgtc ttgtagtct tttattcca gcttgg 57**

<210> 19

<211> 45

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos y secuencia de nucleótidos del conector

30 <400> 19

ggg ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggc gga tcg 45

35 **Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser**

5

10

15

40 <210> 20

<211> 828

<212> ADN

<213> Mus

45 <220>

<221> CDS

<222> (1)...(826)

50 <223> pscM1. MABL1-scFv

55

60

65

ES 2 312 418 T3

<400> 20

atg aaa tac cta ttg cct acg gca gcc gct gga ttg tta tta ctc 45
 5 Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu
 5 10 15
 10 gct gcc caa cca gcc atg gcg cag gtc cag ctg cag cag tct gga 90
 Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly
 15 20 25 30
 cct gac ctg gta aag cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag 135
 20 Pro Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys
 35 40 45
 25 gct tct gga tac acc ttc gtt aac cat gtt atg cac tgg gtg aag 180
 Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Val Asn His Val Met His Trp Val Lys
 30 50 55 60
 cag aag cca ggg cag ggc ctt gag tgg att gga tat att tat cct 225
 35 Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro
 65 70 75
 40 tac aat gat ggt act aag tac aat gag aag ttc aag ggc aag gcc 270
 Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala
 45 80 85 90
 aca ctg act tca gag aaa tcc tcc agc gca gcc tac atg gag ctc 315
 50 Thr Leu Thr Ser Glu Lys Ser Ser Ser Ala Ala Tyr Met Glu Leu
 95 100 105
 55 agc agc ctg gcc tct gag gac tct gcg gtc tac tac tgt gca aga 360
 Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

ES 2 312 418 T3

110 115 120
 ggg ggt tac tat agt tac gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc 405
 5 Gly Gly Tyr Tyr Ser Tyr Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
 125 130 135
 10 aca gtc tcc tca ggt ggt ggt ggt tcc ggt ggt ggt ggt tcc ggt 450
 Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 15 140 145 150
 ggt ggc gga tcc gat gtt gtg atg acc caa act cca ctc tcc ctg 495
 20 Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu
 155 160 165
 25 cct gtc agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt 540
 Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
 170 175 180
 30 cag agc ctt cta cac agt aaa gga aac acc tat tta caa tgg tac 585
 Gln Ser Leu Leu His Ser Lys Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Tyr
 35 185 190 195
 cta cag aag cca ggc cag tct cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt 630
 40 Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val
 200 205 210
 45 tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga 675
 Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly
 215 220 225
 50 tca ggg aca gat ttc aca ctc aag atc agc aga gtg gag gct gag 720
 Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
 55 230 235 240
 gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac 765
 60 Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr
 245 250 255
 65

ES 2 312 418 T3

acg tcc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa gac tac aaa gac 810

Thr Ser Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp

5

260

265

270

gat gac gat aaa taa tga

828

10

Asp Asp Asp Lys

<210> 21

15

<211> 31

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> cebador de PCR

<400> 21

25

acgcgtcgac tcccaggtcc agctgcagca g 31

<210> 22

<211> 18

30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35

<223> cebador de PCR

<400> 22

gaaggtgtat ccagaagc 18

40

<210> 23

<211> 819

<212> ADN

45

<213> Mus

<220>

<221> CDS

50

<222> (1)...(813)

<223> pCHOM1. MABL1-scFv

55

60

65

ES 2 312 418 T3

<400> 23

5 atg gga tgg agc tgt atc atc ctc ttc ttg gta gca aca gct aca 45
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr
 10 ggt gtc gac tcc cag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gac ctg 90
 Gly Val Asp Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp Leu
 15 gta aag cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga 135
 Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly
 20 tac acc ttc gtt aac cat gtt atg cac tgg gtg aag cag aag cca 180
 Tyr Thr Phe Val Asn His Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro
 25 ggg cag ggc ctt gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat 225
 Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp
 30 ggt act aag tac aat gag aag ttc aag ggc aag gcc aca ctg act 270
 Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr
 35 tca gag aaa tcc tcc agc gca gcc tac atg gag ctc agc agc ctg 315
 Ser Glu Lys Ser Ser Ser Ala Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu
 40 gcc tct gag gac tct gcg gtc tac tac tgt gca aga ggg ggt tac 360
 Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr
 45
 50
 55
 60
 65

ES 2 312 418 T3

110 115 120
 tat agt tac gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc 405
 Tyr Ser Tyr Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser
 125 130 135
 tca ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggc gga 450
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 140 145 150
 tcg gat gtt gtg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc agt 495
 Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser
 155 160 165
 ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag agc ctt 540
 Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
 170 175 180
 cta cac agt aaa gga aac acc tat tta caa tgg tac cta cag aag 585
 Leu His Ser Lys Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Tyr Leu Gln Lys
 185 190 195
 cca ggc cag tct cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga 630
 Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg
 200 205 210
 TTT TCT GGG GTC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCA GGG ACA 675
 Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 215 220 225
 gat ttc aca ctc aag atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga 720
 Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly
 230 235 240
 gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac acg tcc gga 765
 Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Ser Gly
 245 250 255

ES 2 312 418 T3

ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa gac tac aaa gac gat gac gat 810

Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp

5

260

265

270

aaa taa tga 819

10

Lys

<210> 24

15

<211> 828

<212> ADN

<213> Mus

20

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(822)

<223> pscM2. MABL2-scFv

25

<400> 24

atg aaa tac cta ttg cct acg gca gcc gct gga ttg tta tta ctc 45

30

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu

5

10

15

35

gct gcc caa cca gcc atg gcg cag gtc cag ctg cag cag tct gga 90

Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly

40

20

25

30

cct gaa ctg gta aag cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag 135

45

Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys

35

40

45

50

gct tct gga tac acc ttc gct aac cat gtt att cac tgg gtg aag 180

Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ala Asn His Val Ile His Trp Val Lys

55

50

55

60

cag aag cca ggg cag ggc ctt gag tgg att gga tat att tat cct 225

60

65

ES 2 312 418 T3

Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro
 5 65 70 75
 tac aat gat ggt act aag tat aat gag aag ttc aag gac aag gcc 270
 Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Asp Lys Ala
 10 80 85 90
 act ctg act tca gac aaa tcc tcc acc aca gcc tac atg gac ctc 315
 15 Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr Met Asp Leu
 95 100 105
 20 agc agc ctg gcc tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt gca aga 360
 Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 25 110 115 120
 ggg ggt tac tat act tac gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc 405
 30 Gly Gly Tyr Tyr Thr Tyr Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
 125 130 135
 35 aca gtc tcc tca ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggt tcg ggt 450
 Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 140 145 150
 40 ggt ggc gga tcg gat gtt gtg atg acc caa agt cca ctc tcc ctg 495
 Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu
 45 155 160 165
 cct gtc agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tca agt 540
 50 Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
 170 175 180
 55 cag agc ctt gtg cac agt aat gga aag acc tat tta cat tgg tac 585
 Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu His Trp Tyr
 185 190 195
 60 ctg cag aag cca ggc cag tct cca aaa ctc ctg atc tac aaa gtt 630
 Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val
 65

ES 2 312 418 T3

200 205 210
 tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga 675
 5 Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly
 215 220 225
 10 tca gtg aca gat ttc aca ctc atg atc agc aga gtg gag gct gag 720
 Ser Val Thr Asp Phe Thr Leu Met Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
 15 230 235 240
 gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac 765
 20 Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr
 245 250 255
 25 acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa gac tac aaa gac 810
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp
 30 260 265 270
 gat gac gat aaa taa tga 828
 35 Asp Asp Asp Lys

<210> 25
 <211> 819
 40 <212> ADN
 <213> Mus
 <220>
 45 <221> CDS
 <222> (1)...(813)
 <223> pCHOM2. MABL2-scFv
 50 <400> 25

atg gga tgg agc tgt atc atc ctc ttc ttg gta gca aca gct aca 45
 55 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr
 5 10 15

60

65

ES 2 312 418 T3

Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser
 5 155 160 165
 ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tca agt cag agc ctt 540
 Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
 10 170 175 180
 gtg cac agt aat gga aag acc tat tta cat tgg tac ctg cag aag 585
 Val His Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys
 15 185 190 195
 cca ggc cag tct cca aaa ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga 630
 Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg
 20 200 205 210
 ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca gtg aca 675
 Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Val Thr
 25 215 220 225
 gat ttc aca ctc atg atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga 720
 Asp Phe Thr Leu Met Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly
 30 230 235 240
 gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac acg ttc gga 765
 Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly
 35 245 250 255
~~ggg ggg~~ acc aag ctg gaa ata aaa gac tac aaa gac gat gac gat 810
 Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp
 40 260 265 270
 aaa taa tga 819
 Lys
 45
 50
 55
 60

<210> 26

<211> 456

65 <212> ADN

<213> Mus

<220>

ES 2 312 418 T3

<221> CDS

<222> (1)...(450)

<223> pCHO-shIAP. IAP humana soluble

5

<400> 26

atg tgg ccc ctg gta gcg gcg ctg ttg ctg ggc tcg gcg tgc tgc 45
 Met Trp Pro Leu Val Ala Ala Leu Leu Leu Gly Ser Ala Cys Cys
 5 10 15
 gga tca gct cag cta cta ttt aat .aaa aca aaa tct gta gaa ttc 90
 Gly Ser Ala Gln Leu Leu Phe Asn Lys Thr Lys Ser Val Glu Phe
 20 25 30
 acg ttt tgt aat gac act gtc gtc att cca tgc ttt gtt act aat 135
 Thr Phe Cys Asn Asp Thr Val Val Ile Pro Cys Phe Val Thr Asn
 35 40 45
 atg gag gca caa aac act act gaa gta tac gta aag tgg aaa ttt 180
 Met Glu Ala Gln Asn Thr Thr Glu Val Tyr Val Lys Trp Lys Phe
 35 50 55 60
 aaa gga aga gat att tac acc ttt gat gga gct cta aac aag tcc 225
 Lys Gly Arg Asp Ile Tyr Thr Phe Asp Gly Ala Leu Asn Lys Ser
 40 65 70 75
 act gtc ccc act gac ttt agt agt gca aaa att gaa gtc tca caa 270
 Thr Val Pro Thr Asp Phe Ser Ser Ala Lys Ile Glu Val Ser Gln
 45 80 85 90
 tta cta aaa gga gat gcc tct ttg aag atg gat aag agt gat gct 315
 Leu Leu Lys Gly Asp Ala Ser Leu Lys Met Asp Lys Ser Asp Ala
 55 95 100 105

60

65

ES 2 312 418 T3

gtc tca cac aca gga aac tac act tgt gaa gta aca gaa tta acc 360

5 **Val Ser His Thr Gly Asn Tyr Thr Cys Glu Val Thr Glu Leu Thr**

110 115 120

10 **aga gaa ggt gaa acg atc atc gag cta aaa tat cgt gtt gtt tca 405**

Arg Glu Gly Glu Thr Ile Ile Glu Leu Lys Tyr Arg Val Val Ser

125 130 135

15 **tgg ttt tct cca aat gaa aat gac tac aag gac gac gat gac aag 450**

20 **Trp Phe Ser Pro Asn Glu Asn Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys**

140 145 150

tga tag 456

25

<210> 27

<211> 46

<212> ADN

30

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador de PCR

35

<400> 27

ggaattccat atgcaagtgc aacttcaaca gtctggacct gaactg 46

40

<210> 28

<211> 31

<212> ADN

45

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador de PCR

50

<400> 28

ggaattctca ttattttatt tccagcttgg t 31

55

<210> 29

<211> 741

<212> ADN

<213> Mus

60

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(735)

<223> pscM2DEm01. MABL2-scFv

65

ES 2 312 418 T3

<400> 29

5 atg caa gtg caa ctt caa cag tct gga cct gaa ctg gta aag cct 45
 Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro
 10 5 10 15
 10 ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc 90
 Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 15 20 25 30
 20 gct aac cat gtt att cac tgg gtg aag cag aag cca ggg cag ggc 135
 Ala Asn His Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly
 25 35 40 45
 25 ctt gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat ggt act aag 180
 Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys
 30 50 55 60
 35 tat aat gag aag ttc aag gac aag gcc act ctg act tca gac aaa 225
 Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys
 40 65 70 75
 40 tcc tcc acc aca gcc tac atg gac ctc agc agc ctg gcc tct gag 270
 Ser Ser Thr Thr Ala Tyr Met Asp Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu
 45 80 85 90

50

55

60

65

ES 2 312 418 T3

5 gac tct gcg gtc tat tac tgt gca aga ggg ggt tac tat act tac 315
 Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Thr Tyr
 95 100 105
 10 gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc tca ggt ggt 360
 Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly
 110 115 120
 15 ggt ggt tcg ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggc gga tcg gat gtt 405
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val
 125 130 135
 20 gtg atg acc caa agt cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga gat 450
 Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp
 140 145 150
 25 caa gcc tcc atc tct tgc aga tca agt cag agc ctt gtg cac agt 495
 Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 155 160 165
 30 aat gga aag acc tat tta cat tgg tac ctg cag aag cca ggc cag 540
 Asn Gly Lys Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
 170 175 180
 35 tct cca aaa ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg 585
 Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly
 185 190 195
 40 gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca gtg aca gat ttc aca 630
 Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Val Thr Asp Phe Thr
 200 205 210
 45 ctc atg atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat ttc 675
 Leu Met Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe
 215 220 225
 50 tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc 720
 Leu Met Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe
 225 230 235
 55 gac tct gcg gtc tat tac tgt gca aga ggg ggt tac tat act tac 315
 Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Thr Tyr
 95 100 105
 60 gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc tca ggt ggt 360
 Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly
 110 115 120
 65 ggt ggt tcg ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggc gga tcg gat gtt 405
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val
 125 130 135
 70 gtg atg acc caa agt cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga gat 450
 Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp
 140 145 150
 75 caa gcc tcc atc tct tgc aga tca agt cag agc ctt gtg cac agt 495
 Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 155 160 165
 80 aat gga aag acc tat tta cat tgg tac ctg cag aag cca ggc cag 540
 Asn Gly Lys Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
 170 175 180
 85 tct cca aaa ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg 585
 Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly
 185 190 195
 90 gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca gtg aca gat ttc aca 630
 Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Val Thr Asp Phe Thr
 200 205 210
 95 ctc atg atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat ttc 675
 Leu Met Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe
 215 220 225
 100 tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc 720
 Leu Met Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe
 225 230 235

ES 2 312 418 T3

<400> 32

5 atg gga tgg agc tgt atc atc ctc ttc ttg gta gca aca gct aca 45
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr
 5 10 15
 10 ggt gtc gac tcc cag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gaa ctg 90
 Gly Val Asp Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu
 15 20 25 30
 gta aag cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga 135
 Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly
 20 35 40 45
 tac acc ttc gct aac cat gtt att cac tgg gtg aag cag aag cca 180
 Tyr Thr Phe Ala Asn His Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro
 25 50 55 60
 ggg cag ggc ctt gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat 225
 Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp
 30 65 70 75
 ggt act aag tat aat gag aag ttc aag gac aag gcc act ctg act 270
 Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr
 35 80 85 90
 tca gac aaa tcc tcc acc aca gcc tac atg gac ctc agc agc ctg 315
 Ser Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr Met Asp Leu Ser Ser Leu
 40 95 100 105
 gcc tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt gca aga ggg ggt tac 360
 Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr
 45
 50
 55
 60
 65

ES 2 312 418 T3

	110	115	120	
	tat act tac gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc			405
5	Tyr Thr Tyr Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser			
	125	130	135	
10	tca ggt ggt ggt ggt tcc ggt ggt ggt ggt tcc ggt ggt ggc gga			450
	Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly			
15	140	145	150	
	tcc gat gtt gtg atg acc caa agt cca ctc tcc ctg cct gtc agt			495
20	Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser			
	155	160	165	
25	ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tca agt cag agc ctt			540
	Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu			
	170	175	180	
30	gtg cac agt aat gga aag acc tat tta cat tgg tac ctg cag aag			585
	Val His Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys			
35	185	190	195	
	cca ggc cag tct cca aaa ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga			630
40	Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg			
	200	205	210	
45	ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca gtg aca			675
	Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Val Thr			
	215	220	225	
50	gat ttc aca ctc atg atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga			720
	Asp Phe Thr Leu Met Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly			
55	230	235	240	
	gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac acg ttc gga			765
60	Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly			
	245	250	255	

ES 2 312 418 T3

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 395 400 405
 5 ggt ggt tcg ggt ggt ggc gga tcg gat gtt gtg atg acc caa agt 1260
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser
 10 410 415 420
 cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct 1305
 15 Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser
 425 430 435
 20 tgc aga tca agt cag agc ctt gtg cac agt aat gga aag acc tat 1350
 Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Lys Thr Tyr
 25 440 445 450
 tta cat tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct cca aaa ctc ctg 1395
 30 Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu
 455 460 465
 atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc 1440
 35 Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 470 475 480
 40 agt ggc agt gga tca gtg aca gat ttc aca ctc atg atc agc aga 1485
 Ser Gly Ser Gly Ser Val Thr Asp Phe Thr Leu Met Ile Ser Arg
 45 485 490 495
 gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt aca 1530
 50 Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr
 500 505 510
 cat gtt ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa 1575
 55 His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 515 520 525
 60 gac tac aaa gac gat gac gat aaa taa tga 1605
 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 65 530

ES 2 312 418 T3

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> cebador de PCR

<400> 33

10

tgaggaattc ccaccatggg atg 33

<210> 34

15 <211> 40

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20

<223> cebador de PCR

<400> 34

25

cacgacgtca ctcgagactg tgagagtggg gccttgccc 40

<210> 35

<211> 40

30 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35

<223> cebador de PCR

<400> 35

40

agtctcgagt gacgtcgtga tgacccaaag tccactctcc 40

<210> 36

<211> 31

45 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador de PCR

50

<400> 36

gactggatcc tcattattta tcgtcatcgt c 31

55

<210> 37

<211> 22

<212> ADN

60 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador de PCR

65

<400> 37

cgcgtaatac gactcactat ag 22

ES 2 312 418 T3

<210> 38
<211> 46
<212> ADN
5 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> cebador de PCR

10 <400> 38

gcaattggac ctgttttatac tcgagcttgg tccccctcc gaacgt 46

15 <210> 39
<211> 45
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> cebador de PCR

25 <400> 39

gctcgagata aaacaggtcc aattgcagca gtctggacct gaact 45

30 <210> 40
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
35 <220>
<223> cebador de PCR

40 <400> 40

gactggatcc tcattattta tcgtcatcgt cttttagtc tgaggagact gtgagagtgg 60

45 <210> 41
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
50 <220>
<223> cebador de PCR

<400> 41

55 **gactgaattc ccacatgaa gttgcctggt ag 32**

<210> 42
<211> 40
60 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
65 <223> cebador de PCR

ES 2 312 418 T3

<400> 42

cagtctcgag tgggtgttcc gacgtcgtga tgacccaaag 40

5 <210> 43

<211> 43

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador de PCR

15 <400> 43

cagtctcgag tgggtgtggt tccgacgtcg tgatgacca aag 43

20 <210> 44

<211> 46

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> cebador de PCR

<400> 44

30 **cagtctcgag tgggtgtggt ggttccgacg tcgtgatgac ccaaag 46**

<210> 45

35 <211> 49

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> cebador de PCR

<400> 45

45 **cagtctcgag tgggtgtggt ggtggttccg acgtcgtgat gacccaaag 49**

<210> 46

<211> 52

50 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador de PCR

55

<400> 46

cagtctcgag tgggtgtggt ggtggtggtt ccgacgtcgt gatgaccaa ag 52

60 <210> 47

<211> 20

<212> ADN

65 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador de PCR

ES 2 312 418 T3

<400> 47

ggccgcatgt tgtcacgaat 20

5 <210> 48

<211> 780

<212> ADN

<213> Mus

10 <220>

<221> CDS

<222> (1)...(768)

15 <223> CF2HL-0/pCOS1. MABL2-scFv <HL-0>

<400> 48

20 **atg gga tgg agc tgt atc atc ctc ttc ttg gta gca aca gct aca ggt gtc 51**
MET Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly Val

5 10 15

25 **gac tcc cag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gaa ctg gta aag cct ggg 102**
Asp Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly

20 25 30

30 **gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc gct aac cat 153**
Ala Ser Val Lys MET Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ala Asn His

35 35 40 45 50

40 **ggt att cac tgg gtg aag cag aag cca ggg cag ggc ctt gag tgg att gga 204**
Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly

55 60 65

45 **tat att tat cct tac aat gat ggt act aag tat aat gag aag ttc aag gac 255**
Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Asp

70 75 80 85

50 **aag gcc act ctg act tca gac aaa tcc tcc acc aca gcc tac atg gac ctc 306**
Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr MET Asp Leu

90 95 100

55 **agc agc ctg gcc tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt gca aga ggg ggt 357**
Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly

105 110 115

65

ES 2 312 418 T3

tac tat act tac gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcg agt 408
 Tyr Tyr Thr Tyr Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 5 120 125 130 135
 gac gtc gtg atg acc caa agt cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga gat 459
 Asp Val Val MET Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp
 10 140 145 150
 caa gcc tcc atc tct tgc aga tca agt cag agc ctt gtg cac agt aat gga 510
 Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly
 15 155 160 165 170
 aag acc tat tta cat tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct cca aaa ctc 561
 20 Lys Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu
 175 180 185
 ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt 612
 25 Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 190 195 200
 ggc agt gga tca gtg aca gat ttc aca ctc atg atc agc aga gtg gag gct 663
 Gly Ser Gly Ser Val Thr Asp Phe Thr Leu MET Ile Ser Arg Val Glu Ala
 30 205 210 215 220
 gag gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac acg 714
 35 Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr
 40 225 230 235
 ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa gac tac aaa gac gat gac gat 765
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp
 45 240 245 250 255
 aaa taa tga gga tcc 780

50 Lys

<210> 49

<211> 45

55 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador de PCR

60

<400> 49

caagctcgag ataaaatccg gaggccaggt ccaattgcag cagtc 45

65 <210> 50

<211> 48

ES 2 312 418 T3

<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
5 <223> cebador de PCR

<400> 50

10 **caagctcgag ataaaatccg gaggtggcca ggtccaattg cagcagtc 48**

<210> 51
<211> 51
15 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
20 <223> cebador de PCR

<400> 51

25 **caagctcgag ataaaatccg gaggtggtgg ccaggtccaa ttgcagcagt c 51**

<210> 52
<211> 54
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> cebador de PCR
35

<400> 52

40 **caagctcgag ataaaatccg gaggtggtgg tggccaggtc caattgcagc agtc 54**

<210> 53
<211> 57
<212> ADN
45 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> cebador de PCR

50 <400> 53

 caagctcgag ataaaatccg gaggtggtgg tggggccag gtccaattgc agcagtc 57

55 <210> 54
<211> 780
<212> ADN
<213> Mus
60 <220>
<221> CDS
<222> (1)...(768)
65 <223> CF2HL-0/pCOS1. MABL2-scFv <LH-0>

ES 2 312 418 T3

Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp
 175 180 185
 5 ggt act aag tat aat gag aag ttc aag gac aag gcc act ctg act tca gac 612
 Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp
 10 190 195 200
 aaa tcc tcc acc aca gcc tac atg gac ctc agc agc ctg gcc tct gag gac 663
 Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr MET Asp Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp
 15 205 210 215 220
 tct gcg gtc tat tac tgt gca aga ggg ggt tac tat act tac gac gac tgg 714
 20 Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Thr Tyr Asp Asp Trp
 225 230 235
 25 ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc tca gac tac aaa gac gat gac gat 765
 Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp
 240 245 250 255
 30 aaa taa tga gga tcc 780
 Lys

35

40

45

50

55

60

65