



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 316 381**

51 Int. Cl.:

C12N 15/70 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00958214 .9**

96 Fecha de presentación : **02.08.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **1206555**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.05.2002**

54

Título: **Constructos de anticuerpo de F_v con sitios de unión para un receptor CD16 y una proteína de superficie CD30.**

30

Prioridad: **06.08.1999 DE 199 37 264**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2009

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2009

73

Titular/es: **Deutsches Krebsforschungszentrum
Stiftung des öffentlichen Rechts
Im Neuenheimer Feld 280
69120 Heidelberg, DE**

72

Inventor/es: **Arndt, Michaela;
Little, Melvyn;
Kypriyanov, Sergey;
Krauss, Jürgen y
Pfreundschuh, Michael**

74

Agente: **Arizti Acha, Mónica**

ES 2 316 381 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

Constructos de anticuerpo de F_v con sitios de unión para un receptor CD16 y una proteína de superficie CD30.

5 La presente invención se refiere a constructos de anticuerpo de F_v , que pueden inducir una regresión de la enfermedad de Hodgkin, a ADN que codifican para tales constructos de anticuerpo de F_v así como a un procedimiento para la producción de los constructos de anticuerpo de F_v y a su uso.

10 Los anticuerpos naturales presentan cuatro dominios variables, dos dominios V_H y dos V_L . Los dominios variables sirven como sitios de unión para un antígeno, estando formado un sitio de unión por un dominio V_H y uno V_L . Los anticuerpos naturales presentan dos sitios de unión iguales, es decir, reconocen un antígeno y por tanto se denominan también monoespecíficos. Los anticuerpos sintéticos pueden presentar también dos sitios de unión distintos, es decir, reconocen entonces dos antígenos y se denominan de manera correspondiente biespecíficos. Un ejemplo de tales anticuerpos es aquél que reconoce al receptor Fc γ IIIA (CD16) de células citolíticas naturales (células NK) y la proteína de superficie CD30 de células de la enfermedad de Hodgkin. Con este anticuerpo (biAcm HRS-3/A9) pueden activarse células NK y dirigirse frente a las células de la enfermedad de Hodgkin, mediante lo cual se induce una regresión de la enfermedad de Hodgkin (véase el documento DE 43 37 197C así como Hartmann, F. *et al.*, Blood 89 (1997), 2042). Por otro lado se ha mostrado que biAcm HRS-3/A9 sólo puede purificarse o producirse difícilmente. Además se ha mostrado que biAcm HRS-3/A9 provoca reacciones inmunitarias indeseadas en muchos
20 pacientes.

Un constructo de anticuerpo de F_v biespecífico (diacuerpo), que sólo contiene dominios variables con sitios de unión para CD19 y CD3 se describe en Kipriyanov S. *et al.* (International Journal of Cancer tomo 77 (1998), n° 5, páginas 763-772).
25

Por consiguiente, la presente invención se basa en el objetivo de proporcionar un anticuerpo, con el que puede inducirse una regresión de la enfermedad de Hodgkin, evitándose las desventajas citadas anteriormente.

Según la invención esto se consigue mediante los objetos en las reivindicaciones de patente.

30 La presente invención se basa en los conocimientos del solicitante, de que un constructo de anticuerpo de F_v , que presenta sitios de unión para un receptor CD16 y una proteína de superficie CD30, puede inducir una regresión de la enfermedad de Hodgkin, siendo la lisis de las células tumorales más fuerte que con biAcm HRS-3/A9. Además se ha reconocido que puede producirse un constructo de anticuerpo de F_v de este tipo en grandes cantidades y mayor pureza. Además, el constructo de anticuerpo de F_v se caracteriza porque no contiene ninguna parte que pueda conducir a reacciones inmunitarias indeseadas en los pacientes.
35

Según la invención se utilizan los conocimientos del solicitante, para proporcionar un constructo de anticuerpo de F_v , que presenta sitios de unión para un receptor CD16 y una proteína de superficie CD30.
40

La expresión “constructo de anticuerpo de F_v ” indica un constructo de anticuerpo, que presenta dominios variables, pero no dominios constantes. Como dominios variables existen especialmente sitios de unión para un receptor CD16 y una proteína de superficie CD30.

45 La expresión “sitio de unión” indica un dominio V_H y uno V_L , por medio de los que el constructo de anticuerpo de F_v puede unirse a un receptor CD16 o a una proteína de superficie CD30.

La expresión “receptor CD16” comprende un receptor CD16 de cualquier tipo y procedencia. Por ejemplo, el receptor CD16 puede proceder de células NK, macrófagos o monocitos activados. El receptor CD16 puede encontrarse también en forma de tipo natural o modificada, comprendiendo la última forma también un fragmento de un receptor CD16, al que puede unirse un anticuerpo dirigido frente a un receptor CD16.
50

La expresión “receptor CD30” comprende un receptor CD30 de cualquier tipo y procedencia. Por ejemplo, el receptor CD30 puede proceder de células de la enfermedad de Hodgkin o de Reed-Sternberg. El receptor CD30 puede existir también en forma de tipo natural o modificada, comprendiendo la última forma también un fragmento de un receptor CD30, al que puede unirse un anticuerpo dirigido frente a un receptor CD30.
55

Un constructo de anticuerpo de F_v según la invención presenta uno o varios sitios de unión para un receptor CD16 y uno o varios sitios de unión para una proteína de superficie CD30. Preferiblemente, el constructo de anticuerpo de F_v presenta uno o dos sitios de unión para un receptor CD16 y uno o dos sitios de unión para una proteína de superficie CD30.
60

Un constructo de anticuerpo de F_v según la invención puede producirse mediante distintos procedimientos. Por ejemplo, puede producirse un constructo de anticuerpo de F_v , que presenta un sitio de unión para un receptor CD16 y un sitio de unión para una proteína de superficie CD30, por ejemplo de modo que se expresa un primer constructo de anticuerpo de F_v de cadena sencilla, que presenta un dominio V_H de un anticuerpo anti-CD16 y un dominio V_L de un anticuerpo anti-CD30, junto con un segundo constructo de anticuerpo de F_v de cadena sencilla, que presenta un dominio V_L de un anticuerpo anti-CD16 y un dominio de V_H de un anticuerpo anti-CD30, mediante lo cual entran en
65

ES 2 316 381 T3

contacto ambos entre sí y se forma el constructo de anticuerpo de F_v según la invención. De manera complementaria se remite a los ejemplos 1-3.

Además puede producirse un constructo de anticuerpo de F_v , que presenta de dos a cuatro sitios de unión para un receptor CD16 y dos sitios de unión para una proteína de superficie CD30, por ejemplo de modo que se expresa un constructo de anticuerpo de F_v de cadena sencilla, que comprende los elementos (a) y (b):

(a) un dominio V_H de un anticuerpo anti-CD16 y un dominio V_L de un anticuerpo anti-CD30, estando unidos entre sí los dominios a través de un ligador 1 peptídico, que puede comprender cualquier aminoácido, especialmente glicina (G), serina (S) y prolina (P) y preferiblemente de 0-10 aminoácidos,

(b) un dominio V_H de un anticuerpo anti-CD30 y un dominio V_L de un anticuerpo anti-CD16, estando unidos entre sí los dominios a través del ligador 1 peptídico citado anteriormente,

estando unidos entre sí los elementos (a) y (b) a través de un ligador 2 peptídico, que puede comprender cualquier aminoácido, especialmente glicina, serina y prolina y preferiblemente de 3-10 aminoácidos y muy especialmente la secuencia de aminoácidos GGPGS. De manera complementaria se remite a la solicitud de patente 198 19 846.9 del solicitante.

Otro objeto de la presente invención es un ácido nucleico, especialmente un ADN, que codifica para un constructo de anticuerpo de F_v citado anteriormente. Además, un objeto de la presente invención son vectores de expresión que contienen un ADN de este tipo. Se prefiere el vector de expresión pKID16-30 de la figura 1. Éste se depositó en la DSMZ (*Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellen*, Colección Alemana de Microorganismos y Células) el 29 de julio de 1999 bajo DSM 12960. Además, un objeto de la presente invención son células que contienen un vector de expresión citado anteriormente.

Otro objeto de la presente invención es un kit, que comprende:

(a) un constructo de anticuerpo de F_v según la invención, y/o

(b) un vector de expresión según la invención, así como

(c) sustancias auxiliares habituales, tales como tampones, disolventes, vehículos, controles y marcadores.

De los componentes individuales pueden existir uno o varios representantes.

La presente invención proporciona un constructo de anticuerpo de F_v , que presenta sitios de unión para un receptor CD16 y una proteína de superficie CD30. Este constructo de anticuerpo de F_v puede producirse en grandes cantidades y mayor pureza. Además, no presenta ninguna parte que pueda conducir a reacciones inmunitarias indeseadas en los pacientes. Especialmente, el constructo de anticuerpo de F_v se caracteriza porque puede activar células NK y puede dirigirse frente a células que expresan proteínas de superficie CD30, especialmente células tumorales, y especialmente células de la enfermedad de Hodgkin o de Reed-Sternberg, mediante lo cual se lisan estas células. Por consiguiente, la presente invención es adecuada para proceder contra enfermedades, en las que desempeñan un papel las células que expresan proteínas de superficie CD30. Tales enfermedades son por ejemplo enfermedades tumorales, especialmente enfermedad de Hodgkin.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra el vector de expresión según la invención pKID16-30. Éste codifica para dos constructos de anticuerpo de F_v de cadena sencilla, de los que uno presenta el dominio V_H de un anticuerpo anti-CD16 y el dominio V_L de un anticuerpo anti-CD30 y el otro presenta el dominio V_H de un anticuerpo anti-CD30 y el dominio V_L de un anticuerpo anti-CD16. Tras la expresión de los constructos de anticuerpo de F_v de cadena sencilla entran en contacto éstos entre sí, mediante lo cual se obtiene un constructo de anticuerpo de F_v según la invención.

La figura 2 muestra un análisis de FACS de la unión de un constructo de anticuerpo de F_v según la invención a células de la enfermedad de Hodgkin CD30⁺ L540CY y granulocitos CD16⁺. Las células tumorales y los granulocitos se incubaron en cada caso con 20 μ g del constructo de anticuerpo de F_v según la invención. La unión del constructo de anticuerpo de F_v se determinó con el anticuerpo 9E10 anti-c-myc e IgG de cabra anti-ratón conjugada con fluoresceína. Como control negativo se incubaron las células solas con 9E10 e IgG de cabra anti-ratón conjugada con fluoresceína.

La figura 3 muestra la actividad citolítica de células NK (efectoras) contenidas en linfocitos de sangre periférica (células PBL) frente a células de la enfermedad de Hodgkin CD30⁺ L540CY (células diana) en el caso de diferentes relaciones de células efectoras-diana en una prueba de JAM de 5 h. Se administró un constructo de anticuerpo de F_v según la invención (●) con una concentración de 1 μ g/ml. Como control se usó biAcm HRS-3/A9 (▲) (con una concentración de 4 μ g/ml). Como control negativo se usaron el constructo de anticuerpo de F_v según la invención sin células NK (○) y células NK solas (γ).

ES 2 316 381 T3

La figura 4 muestra el tratamiento de ratones SCID, que portan xenotrasplante de la enfermedad de Hodgkin, con un constructo de anticuerpo de F_v según la invención. Los ratones se trataron en el día 0 por vía i.v. con $100 \mu\text{g}$ de un constructo de anticuerpo de F_v según la invención junto con células PBL que contenían células NK (\bullet) o sin aquellas (\circ), con $200 \mu\text{l}$ de PBS (*), con 1×10^7 células PBL (γ), o con una mezcla de $100 \mu\text{g}$ de Acm HRS-3 y A9 junto con células PBL (\diamond). Los diámetros tumorales se midieron dos veces por semana y el volumen tumoral se calculó con la siguiente fórmula: $\text{Volumen} = d^2 \times D \times \pi / 6$, siendo d el menor diámetro tumoral y D el mayor diámetro tumoral.

Ejemplo 1

10 Construcción del vector de expresión según la invención pKID16-30

Se sometió el ADNc de los dominios V_H y V_L de un anticuerpo anti-CD16 Acm A9 a una PCR. Para ello se usaron los siguientes cebadores:

15 $VH5'$, 5-CAGCCGGCCATGGCGCAGGTC(G)CAGCTGCAGC(G)AG-3 (NcoI);

$VH3'$, 5-CCAGGGGCCAGTGGATAGACAAGCTTGGGTGTTGTTTT-3 (HindIII);

20 $VL5'$, 5-AGAGACGCGTACAGGCTGTTGTGACTCAGG-3 (MluI);

$VL3'$, 5-GACTGCGGCCGCAGACTTGGGCTGGCC-3 (NotI).

Se realizó la PCR tal como sigue: un ciclo; 5 min. a 94°C , 3 min. a 58°C y 2 min. a 72°C , seguido de 30 ciclos; 80 s a 94°C , 80 s a 58°C y 2 min. a 72°C o por último 10 min. en el último ciclo. Se purificaron en gel los productos de PCR y se insertaron en el vector pCR-Script SK(+) (Stratagene) para la secuenciación. Para la expresión se insertó el dominio V_H a través de NcoI/HindIII y el dominio V_L a través de MluI/NotI en el vector pHOG21.

Se sometieron los dominios V_H y V_L de un fragmento sc F_v anti-CD30 a una PCR. Para ello se usaron los siguientes cebadores:

30 $5\text{-ATGACCATGATTACGCCAAGC-3}$

$5\text{-AGACAAGCTTGGGTTGTTTTGGCTGAGGAGACGG-3}$ (HindIII);

35 $5\text{-GGCGGATATCGAGCTCACTCAGTCTCC-3}$ (EcoRV)

$5\text{-TATAGCGGCCGCAGCATCAGCCCGTTTGATTTC-3}$ (NotI).

Se insertaron los dominios V_H y V_L del fragmento sc F_v anti-CD30 o del fragmento sc F_v anti-CD16 en el vector de expresión pKID, mediante lo cual se obtuvo el vector de expresión según la invención pKID 16-30. Éste codifica para los constructos de anticuerpo de F_v de cadena sencilla V_H 16- V_L 30 y V_H 30- V_L 16.

45 Ejemplo 2

Expresión del constructo de anticuerpo de F_v según la invención en bacterias

Se cultivaron células de X11 Blue de *E. coli* (Stratagene, La Jolla, CA), que se habían transformado con el plásmido de expresión pKID16-30, durante la noche en medio 2YT con ampicilina $100 \mu\text{g/ml}$ y glucosa 100 mM a 37°C . Se cultivaron diluciones de 1:20 de los cultivos durante la noche como cultivos en matraz en medio 2YT a 38°C con agitación con 280 rpm. En el caso de un valor de DO_{600} de 0,8 se sedimentaron las bacterias mediante centrifugación de 10 minutos con 1500 g a 20°C y se resuspendieron en el mismo volumen de un medio 2YT fresco, que contenía ampicilina $100 \mu\text{g/ml}$ y sacarosa $0,4 \text{ M}$. Se añadió IPTG con una concentración final de $0,1 \text{ M}$ y se continuó el crecimiento a 21°C ($20\text{-}22^\circ\text{C}$) durante 18-20 h. Se aisló el constructo de anticuerpo de F_v tal como se describe en Kipriyanov, S.M. *et al.*, Protein Engineering 10, (1997), 445. A continuación se concentró mediante una precipitación con sulfato de amonio (saturación al 70% de concentración final). Se obtuvo el precipitado de proteína mediante centrifugación (30000 g , 4°C , 45 min.) y se disolvió en el 10% del volumen inicial de Tris-HCl 50 mM , NaCl 1 M , pH 7,0. Se realizó una cromatografía de afinidad por metal inmovilizado (IMAC) tal como se describe en Kipriyanov, S.M. *et al.*, J. Immunol. Methods 200, (1997), 69. Se dializó el constructo de anticuerpo de F_v purificado frente a una solución salina tamponada con fosfato.

65

Ejemplo 3

*Caracterización del constructo de anticuerpo de F_v según la invención*5 (A) *Citometría de flujo*

Para detectar la unión de un constructo de anticuerpo de F_v según la invención a granulocitos CD16⁺ y células de la enfermedad de Hodgkin CD30⁺ L540CY se realizó un análisis en FACScan (Beckton Dickinson). Para ello se lavaron 1x10⁶ células dos veces en PBS-N helado (PBS, NaN₃ al 0,05%) y se incubaron sobre hielo con 100 μl del constructo de anticuerpo de F_v del ejemplo 2 durante 45 min. Se sedimentaron las células durante 5 min. con 1200 rpm a 4°C y se lavaron con 2 ml de PBS-N. Se resuspendieron las células en 100 μl de PBS-N, que contenía 10 μg/ml del anticuerpo 9E10 unido al c-myc (ICI Chemikalien) y se incubaron sobre hielo durante 30 min. Se sedimentaron las células y se lavaron tal como anteriormente. Después se resuspendieron las células con IgG de cabra anti-ratón marcada con fluoresceína (Gibco BRL; diluida 1:100 en PBS-N) y se incubaron sobre hielo durante 30 min. Tras otro lavado con PBS-N, las células estaban listas para el análisis con PBS-N, que contenía yoduro de propidio 1 μg/ml (Sigma). Se determinó la fluorescencia de fondo, incubándose las células con el anticuerpo 9E10 e IgG de cabra anti-ratón marcada con fluoresceína en condiciones iguales.

Se mostró que el constructo de anticuerpo de F_v según la invención reconoce tanto a los granulocitos CD16⁺ como a las células de la enfermedad de Hodgkin CD30⁺ L540CY y se une a los mismos.

(B) *Prueba de citotoxicidad*

Para detectar la actividad de un constructo de anticuerpo de F_v según la invención para activar células NK, para lisar células de la enfermedad de Hodgkin CD30⁺ L540CY, se realizó una prueba de citotoxicidad de manera correspondiente a la prueba de JAM descrita en Matzinger, P., J. Immunol. Meth. 145 (1991), 185. En la prueba de citotoxicidad se evalúa la fragmentación del ADN. Se marcaron las células con [³H] timidina hasta una concentración final de 2,5-5 μCi/ml durante 4-6 h. Se sedimentaron las células, se lavaron una vez con medio de cultivo y se colocaron a 10⁴ células/cavidad de una placa de 96 pocillos. Tras la adición de células efectoras (células de sangre periférica "células PBL" que contenían células NK) en distintas diluciones se incubó la placa de 96 pocillos en una atmósfera humedecida con CO₂ al 7,5% durante 4 h. Se aspiraron las células y el medio sobre filtros de fibra de vidrio. Tras lavar y secar los filtros se pasaron a bolsas de plástico, que contenían un líquido de centelleo y se contaron usando un contador de centelleo líquido (LKB). La radioactividad medida se refiere al ADN intacto, dado que el ADN de células destruidas está descompuesto en fragmentos pequeños, que no se retienen por los filtros. Para la determinación de la citotoxicidad, es decir la destrucción de las células, se usó la fórmula convencional para la prueba de JAM: % de destrucción específica = (S-E)/S 100, en la que E = ADN obtenido de manera experimental en presencia de células efectoras (en cpm) y S = ADN obtenido en ausencia de células efectoras (espontáneo).

Se mostró que un constructo de anticuerpo de F_v según la invención puede activar células NK, para lisar células de la enfermedad de Hodgkin CD30⁺ L540CY, siendo la lisis más fuerte que en el caso del uso de biAcm HRS-3/A9.

(C) *Influencia sobre tumores de ratones*

Se establecieron linfomas de Hodgkin de CD30⁺ L540CY en ratones SCID, tal como se describe en Hombach, A. *et al.*, Int. J. Cancer 55, (1993), 830; Renner, C. *et al.*, J. Hematotherapy 4, (1995), 447. Para ello se inyectaron 1,5x10⁷ células tumorales en 200 μl de PBS por vía subcutánea en el costado derecho de los ratones. Se determinó el desarrollo tumoral, es decir el diámetro tumoral dos veces por semana. Se dividieron los ratones con tumores de 4-6 mm de diámetro en distintos grupos y recibieron un constructo de anticuerpo de F_v según la invención en 200 μl de PBS junto con linfocitos de sangre periférica (células PBL) que contenían células NK. Se determinaron el volumen tumoral y su desarrollo (véase la leyenda de la figura 4).

Se mostró que un constructo de anticuerpo de F_v según la invención puede activar células NK no sólo *in vitro*, sino también *in vivo*, para lisar células de la enfermedad de Hodgkin CD30⁺ L540CY.

55

60

65

ES 2 316 381 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Constructo de anticuerpo de F_v , que presenta dominios variables, pero no dominios constantes, comprendiendo los dominios variables sitios de unión para un receptor CD16 y una proteína de superficie CD30.
2. Constructo de anticuerpo de F_v según la reivindicación 1, procediendo el receptor CD16 de células NK.
- 10 3. Constructo de anticuerpo de F_v según la reivindicación 1 ó 2, procediendo la proteína de superficie CD30 de células de la enfermedad de Hodgkin o de Reed-Sternberg.
4. Constructo de anticuerpo de F_v según una de las reivindicaciones 1-3, existiendo en cada caso un sitio de unión.
- 15 5. Constructo de anticuerpo de F_v según la reivindicación 4, codificado por el vector de expresión pKID16-30 (DSM 12960).
6. Constructo de anticuerpo de F_v según una de las reivindicaciones 1-3, existiendo en cada caso dos sitios de unión.
- 20 7. Vector de expresión, que codifica para el constructo de anticuerpo de F_v según una de las reivindicaciones 1-6.
8. Vector de expresión según la reivindicación 7, concretamente pKID16-30 (DSM 12960).
9. Transformante, que contiene el vector de expresión según la reivindicación 7 u 8.
- 25 10. Procedimiento para la producción del constructo de anticuerpo de F_v según una de las reivindicaciones 1-6, que comprende el cultivo del transformante según la reivindicación 9 en condiciones adecuadas.
11. Kit, que comprende:
- 30 (a) un constructo de anticuerpo de F_v según una de las reivindicaciones 1-6, y/o
- (b) un vector de expresión según la reivindicación 7 u 8, así como
- 35 (c) sustancias auxiliares habituales, tales como tampones, disolventes, vehículos, controles y marcadores, pudiendo existir uno o varios representantes de los componentes individuales.
12. Constructo de anticuerpo de F_v según una de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso como fármaco.
- 40 13. Uso del constructo de anticuerpo de F_v según una de las reivindicaciones 1 a 6, para la producción de un medicamento para la lisis de células que expresan proteínas de superficie CD30.
- 45 14. Uso según la reivindicación 13, siendo el medicamento para el tratamiento de enfermedades tumorales, especialmente de tumores de la enfermedad de Hodgkin o de Reed.

50

55

60

65

ES 2 316 381 T3

AseI

1 CYCGAGAGCGGCGCAGTGGCCGCAACGCAATTAAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGCCACCCAGGCTTTACACTTTAT

EcoRI FBS

79 GCTCCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAAATGTGAGCGGATAACAATTTCACACAGAATTCATTAAAGAGGAGAAATTAAC

PelB lider AlwNI NcoI Suero A

157 CATGAAATACCTATTGCCCTACGGCAGCGCCTGGCTTGCTGCTGCTGGCAGCTCAGCCGCCATGGCGCAGGTGCAGCTG
1 MetAlaGlnValGlnLeu

VH anti-CD16 EcoRV

235 CAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGGTAAGGCTGGGACTTCAGTGAAGATATCTTGC AAGGCTTCTGGCTACACCTTCACT
7 GlnGlnSerGlyAlaGluLeuValArgProGlyThrSerValLysIleSerCysLysAlaSerGlyTyrThrPheThr
CDR-H1 EcoRV CDR-H2

313 ~~AACTACTGGCTAGGTTGGGTAAACAGAGGCTCGACATGGACTCGAGTGGATGGAGATATCTCCCTGGAGGTGGT~~
33 AsnTyrTrpLeuGlyTrpValLysGlnArgProGlyHisGlyLeuGluTrpIleGlyAspIleTyrProGlyGlyGly
391 TATACTAACTACAATGAGAATTCAGGCTCAGGCCACAGTGACTGCAGACACATCTCCAGAAGCTGCCAGCTGCAG
59 TyrThrAsnTyrAsnGluLysPheLysGlyLysAlaThrValThrAlaAspThrSerSerArgThrAlaTyrValGln
CDR-H3

469 GTCAGGAGCCTGCATCTGAGGACTCTGCTGCTTATTCTGTGCAAGATGGCTAGCTGGTACTTGGATGCTGGGGC
85 ValArgSerLeuThrSerGluAspSerAlaValTyrPheCysAlaArgSerAlaSerTrpTyrPheAspValTrpGly
CHI HindIII Ligador EcoRV

547 GCACGGACTACGGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACAACACCCAGCTGGCGGTGATATCGAGCTCACTCAGTCTCCA
111 AlaArgThrThrValThrValSerSerAlaLysThrThrProLysLeuGlyGlyAspIleGluLeuThrGlnSerPro
VL anti-CD30

625 AAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGCAGGCTCAAGCTCACCTACAAGCCAGTCAGAAATGTGGTACTAATGTAGCC
137 LysPheMetSerThrSerValGlyAspArgValAsnValThrTyrLysAlaSerGlnAsnValGlyThrAsnValAla
703 TGGTTTCAACAAAACCAGGGCAATCTCTAAAGTCTGTGATTTACTCGGCATCTTACCGATACAGTGGAGTCCCTGAT
163 TrpPheGlnGlnLysProGlyGlnSerProLysValLeuIleTyrSerAlaSerTyrArgTyrSerGlyValProAsp
781 CGCTTCACAGGCGAGTGGATCTGGAACAGATTTCACCTCTCACCATCAGCAATGTCCAGTCTGAAGACTTGGCAGATAT
189 ArgPheThrGlySerGlySerGlyThrAspPheThrLeuThrIleSerAsnValGlnSerGluAspLeuAlaGluTyr
C kappa NotI

859 TTCGTGCAAAATATCACACCTATCTCTCAAGTTCGGAGGGGGCACCAGCTGGAAATCAAACGGCTGATGCTGGC
215 PheCysGlnGlnTyrHisThrTyrProLeuThrPheGlyGlyGlyThrLysLeuGluIleLysArgAlaAspAlaAla
BamHI epitopo de c-myc cola de His6 BglII

937 GCCGCTGGATCCGAACAAAAGCTGATCTCAGAAGAAGACCTAAACTCACATCACCATCACCATCAAAAGATCTATT
241 AlaAlaGlySerGluGlnLysLeuIleSerGluGluAspLeuAsnSerHisHisHisHisHisHis
FBS Pel B lider NcoI

1015 AAAGAGGAGAAATTAACCATGAAATACCTATTGCCCTACGGCAGCCGCTGGCTTGCTGCTGCTGGCAGCTCAGCCGGCC
NcoI Suero A VH anti-CD30

1093 ATGGCGGCAATGGCCAGGTGCAACTGCAGCAGTCAAGGGCTGAGCTGGCTAGACTTGGGCTTCAGTGAAGATGTCC
1 MetAlaGlnValGlnLeuGlnGlnSerGlyAlaGluLeuAlaArgProGlyAlaSerValLysMetSer

1171 TCCAGGCTTCTGGCTACACCTTACTACCTACACATACACTGGGTAAGACAGAGGCTGGACACCGTCTGGAATGG
24 CysLysAlaSerGlyTyrThrPheThrThrTyrThrIleHisTrpValArgGlnArgProGlyHisAspLeuGluTrp

1249 ATTGGATACATTAATCTAGCAGTGGATTTCTGACTACAATCAGAAGTTCAGGGCAAGACCACATTCACCTCAGAC
50 IleGlyTyrIleAsnProSerSerGlyTyrSerAspTyrAsnGlnAsnPheLysGlyLysThrThrLeuThrAlaAsp

1327 AAGTCCCTCAACACAGCCTACATCACTCAACAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGTCTATTACTGTGCAAGAAGA
76 LysSerSerAsnThrAlaTyrMetGlnLeuAsnSerLeuThrSerGluAspSerAlaValTyrTyrCysAlaArgArg
CHI

1405 GCGACTATGGTAACTACGAATATACCTGGTTCCTTACTGGGGCCAGGGACCACGGTCACCCTCTCTCTCAGCCAAA
102 AlaAspTyrGlyAsnTyrGluTyrThrTrpPheAlaTyrTrpGlyGlnGlyThrThrValThrValSerSerAlaLys
HindIII ligador EcoRV VL anti-CD16

1483 ACAACACCCAGCTTGGCGGTGATATCCAGGCTGTGTGACTCAGGAATCTGCACCTACCACATCACTTGGTGAAC
128 ThrThrProLysLeuGlyGlyAspIleGlnAlaValValThrGlnGluSerAlaLeuThrThrSerProGlyGluTh
CDR-L1

1560 AGTCACACTCACTTGTGGCTCAAACTAGGACTGTTCACACTAGTBACTATGCCAAGCTGGGTCCAAGAAAACCAGA
153 rValThrLeuThrCysArgSerAsnThrGlyThrValThrThrSerAsnTyrAlaAsnTrpValGlnGluLysProAs
CDR-L2

1638 TCATTTATTCACCTGGTCTAATAGGTCATCCCAACACCCGGCTCCAGGTGTTCTCTGCCAGATTCTCAGGCTCCCTGAT
179 pHisLeuPheThrGlyLeuIleGlyHisThrAsnAsnArgAlaProGlyValProAlaArgPheSerGlySerLeuI
CDR-L3

1716 TGGAGACAAGGCTCCCTCACCATCAGGGGCACAGACTGAGGATGAGCCAAATATATTCTGTGCTTATGGTATAA
205 eGlyAspLysAlaAlaLeuThrIleThrGlyAlaGlnThrGluAspGluAlaIleTyrPheCysAlaLeuTrpTyrAs
NotI BamHI

1794 CAACCATTTGGTGTTCGGTGGAGGACCAAACTGACTGTCTAGGCTCAGCCCAAGTCTCGGGCCCTGGATCCGAACA
231 nAsnHisTrpValPheGlyGlyGlyThrLysLeuThrValLeuGlyGlnProLysSerAlaAlaAlaGlySerGluG

Fig. 1

ES 2 316 381 T3

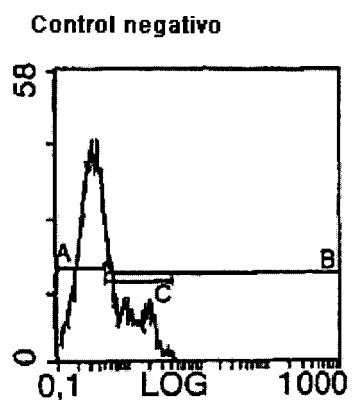
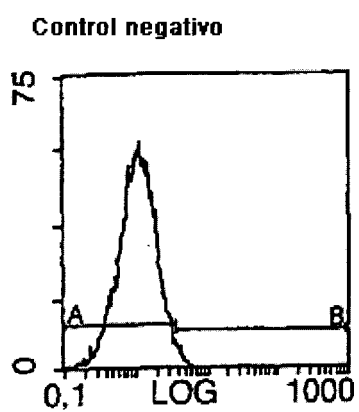
epitopo de c-myc *cola de His6* XbaI BclI NheI
 1872 AAAGCTGATCTCAGAAGAAGACCTAACTCACATCACCATCACCATCACAATCTAGAGGCTGTGCTAATGATCAGC NheI
 257 nLysLeuIleSerGluGluAspLeuAsnSerHisHisHisHisHisHisHis
 1950 TAGCTTGAGGCATCAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCCTTTCGTTTATCTGTTGTTTTCGGTTAAC HpaI
 Sall Earl Pvul FspI BglI
 2028 GTCGACCTGGCGTAATAGCGAAGAGGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGGA
 2106 CGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGCGGGTGTGGTGGTTACGGCGAGCGTGACCGCTACACTTGCAGCGCCCT
 Neel
 2184 AGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTCTTCCCTTCCCTTCTCGCCACGTTGCGCGGCTTCCCGCTCAAGCTCTAAATCGGGG
 f1 IR DralI
 2262 GCTCCCTTTAGGGTTCGATTTAGTGTCTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGGTGATGGTTCCAGTTAG
 2340 TGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCAC
 2418 AACTGGAACAACACTCAACCCCTATCTCGGCTATTTCTTTTGATTTATAAGGGATTTCGCGATTTCGCCCTATTTGGTT
 SspI
 2496 AAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTAACCGGAATTTAACAAAAATAATAACGCTTACAAATTTAGGTGGCACTTTT
 BspHI
 2574 CCGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCCTCATGAGACAATAA
 SspI Earl
 2652 CCCTGATAAATGCTTCAATAATATGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCTTT
 Apal
 2730 TTTGCGGCATTTTCCTTCCCTGTTTTCCTCACCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGT
 XmnI
 2808 GCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCCGCCGGAAGAACGTTTTTCCA
 DraI
 2886 ATGATGAGCACTTTTAAAGTTCGTATGTGGCGCGGTATTTATCCGTATTTGACCGCGGCAAGAGCAACTGGTTCGC
 Scal 1000
 2964 CGCATACACTATTTTCAGAATGACTTGGTGGAGTACTCACCAGTCCAGAAAGCATCTTACCGATGGCATGACAGTA
 β-Lactamasa Pvul
 3042 AGAGAAATATGCACTGCTGCCATAACCATGAGTGAATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCG
 3120 AAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACTGGGGATCATGTAACCTGCCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAA
 FspI
 3198 GCCATACCAACGACGAGCGGTGACACCAGATGCCCTGTAGCAATGCCAACACGTTGCGCAAATTTAACTGGCGAA
 AseI
 3276 CTACTTACTCTAGCTTCCCGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGCGGGATAAAGTTCCAGGACCACTTCTGCGCTCG
 BglI Bsal
 3354 GCCCTCCGGCTGGCTGGTATTTCCTGATAAATTCGAGCGGGTGGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTCGACCACTG
 3432 GGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCTGATCGTAGTTATCTACAGGACGGGAGTCAAGGCAACTATGGAAGCAAAATAGA
 3510 CAGATCGCTGAGATAGGTGCCCTCACTGATTAAGCAATGGTAACTGTGACAGCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATT
 DraI DraI BspHI
 3588 GATTTAAAATTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAA
 3666 CGTGAGTTTTGTTCCACTGAGCGTCAGACCCGTTAGAAAAGATCAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGC
 3744 GTAATCTGCTGCTTGCAAAACAAAAACCCAGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTT
 3822 TTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAACTGTCTTCTAGTGTAGCGGTAGTTAGGCCACCAC
 AlwNI
 3900 TTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAG
 ColE1 2000 ApaLI
 3978 TCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGTTCTGTG
 4056 ACACAGCCCGAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGGAGCTATGAGAAAGGCCACGCTT
 4134 CCGAAGGGGAGAAAGGGCGACAGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCCGAAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGG
 4212 GGAAACGCCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTTGCCACCTCTGACTTGGAGCGTGGATTTTTGTGATGCTCGTCA
 4290 GGGGGCGGAGCCTATGGAAAAAGCCAGCAACCGGCTTTTTACGGTTCCTGGCTTTTTGCTGGCTTTTTGCTCAC
 4368 ATGTTCTTTCTGCTTATCCCTGATCTGTGGATAACCGTATTACCGCTTTGAGTGGAGCTGATAACCGCTCGCCG
 Earl
 4446 AGCCGAACGACCGGAGCGGAGTCACTGAGCGGAGGAAGCGGAAAGCGCCCAATACCGAAACCGGCTCTCCCCGG
 AseI BspMI
 4524 CGTTGGCCGATTCATTAATGCAGGTATCACGAGGCCCTTTCTGCTTTCAC

Fig. 1 (Continuación)

Fig. 2

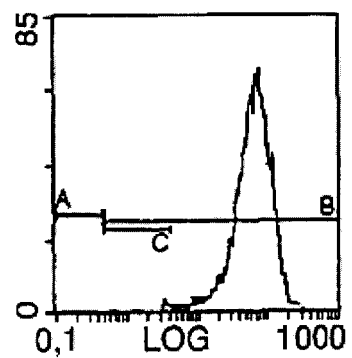
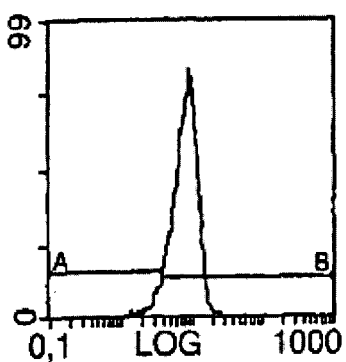
Granulocitos (CD16⁺)

Células L540CY (CD30⁺)



Construto de anticuerpo de F_u
según la invención

Construto de anticuerpo de F_u
según la invención



Intensidad de fluorescencia

Fig. 3

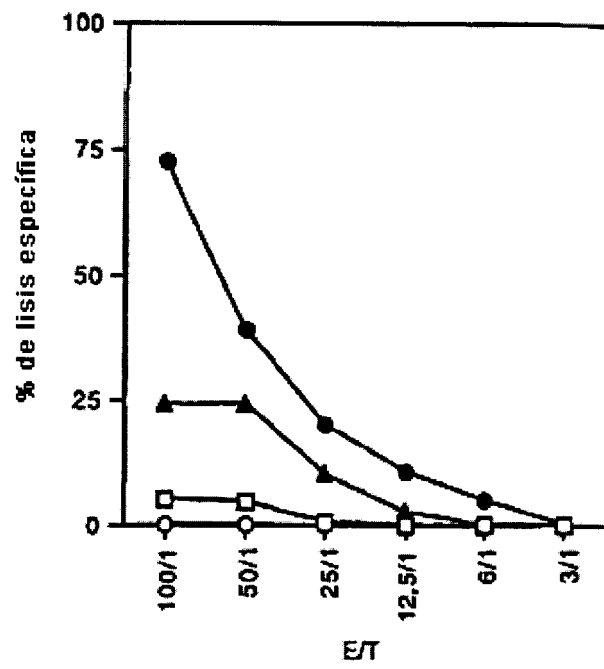
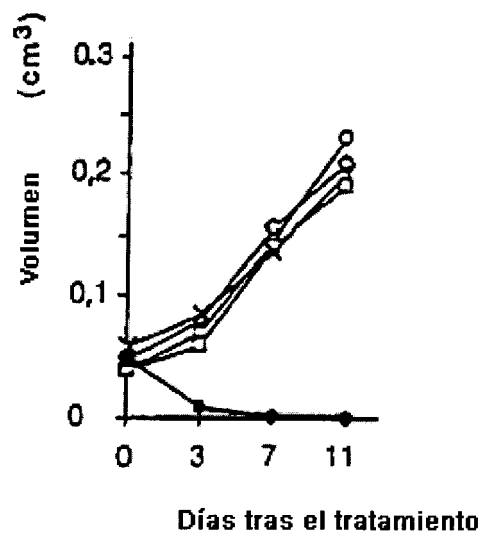


Fig. 4



ES 2 316 381 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Deutsches Krebsforschungszentrum (Centro alemán de investigación del cáncer)

5 <120> Constructos de anticuerpo de F_v

<130> K 2839

10 <140> Desconocido

<150> Documento DE 199 37 264.0

<151> 06-08-1999

15 <160> 11

<170> PatentIn Ver. 2.1

20 <210> 1

<211> 4570

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Descripción de la secuencia artificial: Vector de expresión que codifica para dos constructos de anticuerpo de F_v de cadena sencilla

<220>

<221> CDS

35 <222> (217)..(1002)

<220>

<221> CDS

40 <222> (1102)..(1920)

<400> 1

45 **ctcagagagcg ggcagtgagc gcaacgcaat taatgtgagt tagctcactc attagggacc 60**

ccaggcttta cactttatgc tcccggtcgg tatgtttgtgt ggaattgtga ggggataaca 120

atttcacaca gaattcatta aagaggagaa attaaccatg aaatacctat tgcttacggc 180

50 **agccgctggc ttgctgctgc tggcagctca gccgcc atg gcg cag gtg cag ctg 234**

Met Ala Gln Val Gln Leu

1 5

55 **cag cag tct gga gct gag ctg gta agg cct ggg act tca gtg aag ata 282**

Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile

10 15 20

60 **tcc tgc aag gct tct ggc tac acc ttc act aac tac tgg cta ggt tgg 330**

Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Leu Gly Trp

25 30 35

65 **gta aaa cag agg cct gga cat gga ctc gag tgg att gga gat atc tac 378**

Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile Gly Asp Ile Tyr

40 45 50

70 **cct gga ggt ggt tat act aac tac aat gag aaa ttc aag ggc aag gcc 426**

Pro Gly Gly Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala

55 60 65 70

ES 2 316 381 T3

aat cct agc agt gga tat tct gac tac aat cag aac ttc aag ggc aag 1308
 Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Ser Asp Tyr Asn Gln Asn Phe Lys Gly Lys
 320 325 330

5
 acc aca ttg act gca gac aag tcc tcc aac aca gcc tac atg caa ctg 1356
 Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln Leu
 335 340 345

10
 aac agc ctg aca tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt gca aga aga 1404
 Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg
 350 355 360

15
 gcg gac tat ggt aac tac gaa tat acc tgg ttt gct tac tgg ggc caa 1452
 Ala Asp Tyr Gly Asn Tyr Glu Tyr Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 365 370 375

20
 ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca gcc aaa aca aca ccc aag ctt ggc 1500
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Gly
 380 385 390

25
 ggt gat atc cag gct gtt gtg act cag gaa tct gca ctc acc aca tca 1548
 Gly Asp Ile Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser
 400 405 410

30
 cct ggt gaa aca gtc aca ctc act tgt cgc tca aat act ggg act gtt 1596
 Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Asn Thr Gly Thr Val
 415 420 425

35
 aca act agt aac tat gcc aac tgg gtc caa gaa aaa cca gat cat tta 1644
 Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu
 430 435 440

40
 ttc act ggt cta ata ggt cat acc aac aac cga gct cca ggt gtt cct 1692
 Phe Thr Gly Leu Ile Gly His Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro
 445 450 455

45
 gcc aga ttc tca ggc tcc ctg att gga gac aag gct gcc ctc acc atc 1740
 Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile
 460 465 470 475

50
 aca ggg gca cag act gag gat gag gca ata tat ttc tgt gct cta tgg 1788
 Thr Gly Ala Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp
 480 485 490

55
 tat aac aac cat tgg gtg ttc ggt gga gga acc aaa ctg act gtc cta 1836
 Tyr Asn Asn His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 495 500 505

60
 ggc cag ccc aag tct gcg gcc gct gga tcc gaa caa aag ctg atc tca 1884
 Gly Gln Pro Lys Ser Ala Ala Ala Gly Ser Glu Gln Lys Leu Ile Ser
 510 515 520

65
 gaa gaa gac cta aac tca cat cac cat cac cat cac taatctagag 1930
 Glu Glu Asp Leu Asn Ser His His His His His His
 525 530 535

gcctgtgcta atgatcagct agcttgaggc atcaataaaa cgaaaggctc agtcgaaaga 1990
 ctgggccttt cgttttatct gttgtttgtc ggttaacgtc gacctggcgt aatagcgaga 2050
 ggccccacc gatcgccctt cccaacagtt gcgcagcctg aatggcgaat gggacgcgcc 2110
 ctgtagcggc gcattaagcg cggcgggtgt ggtggttacg cgcagcgtga ccgctacact 2170
 tgccagcgcc ctagcggccg ctcctttcgc tttcttccct tcctttctcg ccacgttcgc 2230
 cggtttccc cgtaagctc taaatcgggg gctcccttta gggttccgat ttagtgcttt 2290

ES 2 316 381 T3

acggcacctc gacccaanaa aacttgatta gggatgatgg tcaagtagtg ggccatcgcc 2350
 ctgatagacg gtttttcgcc ctttgacgtt ggagtcacg ttctttaata gtggactctt 2410
 5 gttccnaact ggaacaacac tcaaccctat ctcggcttat tcttttgatt tataagggat 2470
 tttgccgatt tcggcctatt ggttaaaaaa tgagctgatt taacaaaaat ttaacgcgaa 2530
 ttttaacaaa atattaacgc ttacaattta ggtggcactt ttccgggaaa tgtgcgcgga 2590
 10 accctatktt gtttattttt ctaaatacat tcaaatatgt atccgctcat gagacaataa 2650
 ccctgataaa tgcttcaata atattgaaaa aggaagagta tgagtattca acatttccgt 2710
 15 gtcgcctta tccccctttt tgcggcattt tgccttcttg tttttgctca cccagaaacg 2770
 ctggtgaaag taaaagatgc tgaagatcag ttgggtgcac gagtgggcta catcgaactg 2830
 gatctcaaca gggtaagat ccttgagagt tttcgccccg aagaacgttt tccaatgatg 2890
 20 agcactttta aagttctgct atgtggcgcg gtattatccc gtattgacgc eggcaagag 2950
 caactcggtc gccgcataca ctattctcag aatgacttgg ttgagtactc accagtcaca 3010
 gaaaagcadc ttacggatgg catgacagta agagaattat gcagtgcctgc cataaccatg 3070
 25 agtgataaca ctgcccga cttacttctg acaacgatcg gaggaccgaa ggagctaacc 3130
 gcttttttgc acaacatggg ggatcatgta actcgccttg atcgttggga accggagctg 3190
 aatgaagcca taccaaacga cgagcgtgac accacgatgc ctgtagcaat ggcaacaacg 3250
 30 ttgcgcaaac tattaactgg cgaactactt actctagctt cccggcaaca attaatagac 3310
 tggatggagg cggataaagt tgcaggacca cttctgcgct cggcccttc ggctggctgg 3370
 35 tttattgctg ataaatctgg agccgggtgag cgtgggtctc gcggtatcat tgcagcactg 3430
 gggccagatg gtaagccctc ccgtatcpta gttatctaca cgaacggggag tcaggcaact 3490
 atggatgaac gaaatagaca gatcgcctgag ataggtgcct cactgattaa gcattggtaa 3550
 40 ctgtcagacc aagtttactc atatatactt tagattgatt taaaacttca tttttaattt 3610
 aaaaggatct aggtgaagat cctttttgat aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag 3670
 ttttcgttcc actgagcgtc agaccccgta gaaaagatca aaggatcttc ttgagatctc 3730
 45 ttttttctgc gcgtaactctg ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc agcggtggtt 3790
 tgttttcgag atcaagagct accaactctt tttccgaagg taactggctt cagcagagcg 3850
 50 cagataccia atactgtcct tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt caagaactct 3910
 gtageaccgc ctacatacct cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc 3970
 gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca agacgatagt taccggataa ggcgcagcgg 4030
 55 tcgggctgaa cgggggggtc gtgcacacag cccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa 4090
 ctgagaacct acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgct tcccgaaggg agaaaggcgg 4150
 acaggtatcc ggtaagcggc agggctcgaa caggagagcg cacgagggag cttccagggg 4210
 60 gaaacgcctg gtatctttat agtctgtcgt ggtttcggca cctctgactt gagcgtcgat 4270
 ttttctgatg ctcgctcaggg gggcggagcc tatggaaaaa cgcacgcaac gcggcctttt 4330

65

ES 2 316 381 T3

taeggttctt ggccttttgc tggccttttg ctcacatggt ctttcttgcg ttatccccctg 4390
 attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga taccgctcgc cgcagccgaa 4450
 5 cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga gcgcccaata cgcaaaccgc 4510
 ctctccccegc gcgttggecg attcattaat gcaggtatca cgaggccctt tcgtcttcac 4570

10 <210> 2

<211> 262

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<223> Descripción de la secuencia artificial: Vector de expresión que codifica para dos constructos de anticuerpo de F_v de cadena sencilla

20 <400> 2

	Met	Ala	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Arg	Pro
	1				5					10					15	
	Gly	Thr	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr
25				20					25					30		
	Asn	Tyr	Trp	Leu	Gly	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	His	Gly	Leu	Glu
			35					40					45			
	Trp	Ile	Gly	Asp	Ile	Tyr	Pro	Gly	Gly	Gly	Tyr	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu
		50					55					60				
30	Lys	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Val	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser	Ser	Arg	Thr
	65					70					75					80
	Ala	Tyr	Val	Gln	Val	Arg	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr
				85						90					95	
	Phe	Cys	Ala	Arg	Ser	Ala	Ser	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Ala	Arg
				100					105						110	
35	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Lys	Thr	Thr	Pro	Lys	Leu	Gly	Gly
			115					120					125			
	Asp	Ile	Glu	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Lys	Phe	Met	Ser	Thr	Ser	Val	Gly
		130					135					140				
40	Asp	Arg	Val	Asn	Val	Thr	Tyr	Lys	Ala	Ser	Gln	Asn	Val	Gly	Thr	Asn
	145					150					155					160
	Val	Ala	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Lys	Val	Leu	Ile
				165						170					175	
	Tyr	Ser	Ala	Ser	Tyr	Arg	Tyr	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Thr	Gly
				180					185					190		
45	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Asn	Val	Gln	Ser
			195				200						205			
	Glu	Asp	Leu	Ala	Glu	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Tyr	His	Thr	Tyr	Pro	Leu
		210					215					220				
50	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Ala	Asp	Ala	Ala
	225					230					235					240
	Ala	Ala	Gly	Ser	Glu	Gln	Lys	Leu	Ile	Ser	Glu	Glu	Asp	Leu	Asn	Ser
				245						250					255	
	His	His	His	His	His	His										
				260												

55 <210> 3

<211> 273

<212> PRT

60 <213> Secuencia artificial

<223> Descripción de la secuencia artificial: Vector de expresión que codifica para dos constructos de anticuerpo de F_v de cadena sencilla

65

ES 2 316 381 T3

<400> 3

5 Met Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro
 1 5 10
 Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 20 25 30
 Thr Tyr Thr Ile His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly His Asp Leu Glu
 35 40 45
 10 Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Ser Asp Tyr Asn Gln
 50 55 60
 Asn Phe Lys Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr
 65 70 75 80
 Ala Tyr Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr
 85 90 95
 15 Tyr Cys Ala Arg Arg Ala Asp Tyr Gly Asn Tyr Glu Tyr Thr Trp Phe
 100 105 110
 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr
 115 120 125
 20 Thr Pro Lys Leu Gly Gly Asp Ile Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser
 130 135 140
 Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser
 145 150 155 160
 Asn Thr Gly Thr Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu
 165 170 175
 25 Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly Leu Ile Gly His Thr Asn Asn Arg
 180 185 190
 Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys
 195 200 205
 30 Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr
 210 215 220
 Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Asn Asn His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr
 225 230 235 240
 Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ser Ala Ala Ala Gly Ser Glu
 245 250 255
 35 Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser His His His His His
 260 265 270
 His

<210> 4

40 <211> 35

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

45 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador

<400> 4

50

cagccggcca tggcgaggt cgcagctgca gcgag

35

<210> 5

55 <211> 38

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

60 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador

<400> 5

65

ccaggggcca gtggatagac aagcttggt gttgtttt

38

ES 2 316 381 T3

	<210> 6	
	<211> 30	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
10	<400> 6	
	agagacgcgt acaggctggt gtgactcagg	30
15	<210> 7	
	<211> 27	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
25	<400> 7	
	gactgcggcc gcagacttgg gctggcc	27
30	<210> 8	
	<211> 21	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
40	<400> 8	
	atgacatga ttacccaag c	21
45	<210> 9	
	<211> 36	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
55	<400> 9	
	agacaagctt ggggtgtgtt ttggctgagg agacgg	36
60	<210> 10	
	<211> 27	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	

ES 2 316 381 T3

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador

5 <400> 10

ggeggaatc gagctcactc agtctcc

27

10 <210> 11

<211> 34

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador

20 <400> 11

tatagcggcc gcagcatcag cccgttgat ttcc

34

25

30

35

40

45

50

55

60

65