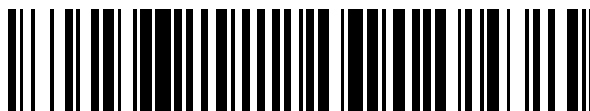


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 421**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.08.2001** **E 01979228 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2013** **EP 1309347**

54 Título: **Método y ocmposición para alterar una patología mediada por células B**

30 Prioridad:

11.08.2000 US 224723 P

11.08.2000 US 224722 P

23.03.2001 US 279079 P

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

19.04.2013

73 Titular/es:

MMRGOLBAL, INC. (100.0%)

4401 WILSHIRE BLVD 2ND FLOOR

LOS ANGELES CA 90010, US

72 Inventor/es:

GOLD, DANIEL, P. y
SHOPES, ROBERT, J.

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 401 421 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

Método y composición para alterar una patología mediada por células B.

5 Campo de la invención

Esta invención se refiere en líneas generales al campo de la inmunología e inmunoterapia. Más específicamente, esta invención se refiere a composiciones para terapia de linfomas de células B.

10 Antecedentes de la invención

El sistema inmune produce respuestas tanto mediadas por anticuerpos como mediadas por células. Cada tipo de respuesta inmune está regulada por un tipo de linfocito, células B (para respuesta mediada por anticuerpos) y células T (para respuesta mediada por células). Las células B inician el reconocimiento de un antígeno cuando el antígeno se une a las moléculas IgM e IgD en la superficie de las células B. Cada clon de célula B reconoce solamente antígenos específicos debido al idiotipo único de ese clon. Tras el reconocimiento del antígeno, las células B internalizan y procesan el antígeno para la presentación mediante moléculas MHC de clase II. Las células B pueden por tanto funcionar como célula presentadora de antígeno ("APC") para células T. Las células T se unen a partes de proteínas foráneas (antígenos) cuando partes de la proteína se asocian con una molécula del complejo principal de histocompatibilidad ("MHC"), típicamente en una APC, en que el antígeno se digiere en fragmentos y se presenta sobre la superficie de la APC unido a su MHC.

Varios tipos de cánceres tienen su origen en el sistema circulatorio. Entre los tipos principales están: leucemias, un neoplasma de la médula ósea y la sangre; mielomas, un cáncer de células B; y linfomas, un grupo de cánceres que se originan en el sistema linfático. Los linfomas pueden clasificarse adicionalmente en varios grupos; uno de estos grupos son los linfomas no Hodgkin que, a su vez, forman un grupo diverso de cánceres. Se definen tres amplias categorías de estos linfomas de acuerdo con la International Working Formulation para la clasificación de tumores, de grado bajo, grado intermedio y grado alto, que difieren en su capacidad de curación y agresividad (Cheson, et al., "Report of an International Workshop to Standardize Response Criteria for Non-Hodgkin's Lymphomas," J. Clin Oncol. 17(4): 1244,1999). Globalmente, estos linfomas colectivamente están en el quinto puesto de la clasificación en los Estados Unidos en términos de incidencia del cáncer y mortalidad, y se diagnostican aproximadamente 50.000 nuevos casos cada año.

En un estudio reciente que examinó cincuenta y un casos de aislados de linfoma no Hodgkin (NHL) de alto grado, treinta y tres mostraron derivar de células B mientras que ocho mostraron derivar de células T (Brown et al., Histopathology 14:621-27, 1989). Por lo tanto, serían valiosos tratamientos dirigidos específicamente a células B patológicas en el tratamiento de linfomas no Hodgkin y mielomas.

Los intentos iniciales en el campo de desarrollar un tratamiento basado en inmunología dirigido a antígenos producidos únicamente por células B malignas implicó un aislamiento laborioso y la purificación de proteínas idiotípicas (Id) directamente de las células B patológicas. Esta proteína purificada primero se usó en sistemas modelo para tratar el linfoma asociado. Se demostró que esta inmunización activa contra determinantes idiotípicos en proteínas aisladas podía producir resistencia al crecimiento tumoral en un sistema modelo de ratón (Daley et al., J.Immunol. 120(5): 1620-24, 1978; Sakato et al., Microbiol. Immunol. 23(9): 927-31, 1979). Este fenómeno de resistencia al crecimiento tumoral se ha reproducido posteriormente en varios modelos de tumor experimental adicionales (Stevenson et al., J.Immunol. 130(2):970-03,1983; George et al., J.Immunol. 141 (6):2168-74, 1988; Kwak, et al., Blood 76(11):2411-17, 1990).

Entre los primeros intentos en llevar esta idea y tecnología al entorno clínico estuvo un proceso muy laborioso y que utilizó anticuerpos monoclonales de ratón generados contra proteínas aisladas de linfomas individuales de pacientes después de biopsia. Meeker y sus colaboradores generaron anticuerpos monoclonales de ratón anti-idiotipo para el tratamiento de once pacientes después de que la mayoría hubieran experimentado terapia convencional contra linfoma (Meeker et al., Blood 65:1349-63, 1985). Se obtuvieron resultados positivos en casi la mitad de los pacientes, con un caso de remisión aparente. En algunos de los pacientes, sin embargo, las células de linfoma desarrollaron resistencia al anticuerpo mediante cambio de clase de los anticuerpos expresados en la superficie celular (Meeker et al., N Engl J Med. 312:1658-65, 1985).

Otro modo en que un clon de linfoma de células B desarrolló resistencia contra anticuerpos anti-idiotípicos es mediante mutación somática en la región CDR2 (Cleary et al., Cell 44:97-106, 1986), evadiendo de este modo el reconocimiento. Aunque este enfoque de inmunidad pasiva para el tratamiento tiene la ventaja de que solamente requiere el aislamiento y purificación de una cantidad relativamente minoritaria de proteína idiotípica de un paciente para crear una respuesta inmune en un ratón, la utilidad para tratar linfomas con anticuerpos monoclonales dirigidos a idiotipos es limitada. En ausencia de un modo robusto y conveniente para producir grandes cantidades de proteína idiotípica, sin embargo, esto podría resultar ser solamente el modo práctico de explotar las capacidades del sistema inmune para atacar directamente al idiotipo de un linfoma de células B.

Kwak *et al.* persiguieron un enfoque diferente e intentaron la inmunización activa de pacientes usando proteínas purificadas de sus propios linfomas únicos a pesar del requisito logístico de aislar grandes cantidades de proteínas idiotípicas (Kwak *et al.*, N. Engl. J. Med. 327:1209-15, 1992). Pacientes que tenían un mínimo de enfermedad o no tenían enfermedad después de quimioterapia se trataron con vacunación con proteínas de idiotipo autólogo. Para obtener suficientes cantidades de proteínas idiotípicas para la vacunación, se fusionaron células de linfoma obtenidas por biopsia con una línea celular establecida para facilitar su crecimiento en cultivo tisular, y las proteínas secretadas de idiotipo se purificaron por cromatografía. La aplicación a gran escala de este método de inmunización se ve excluida debido a las necesidades extremadamente laboriosas, barreras técnicas, y costes prohibitivos. Adicionalmente, recientemente han surgido cuestiones referentes a las cargas virales asociadas con la producción de proteínas en células de mamífero.

En un artículo posterior, Hsu *et al.* informaron sobre la fase I/II del ensayo clínico anterior utilizando vacunación del idiotipo conjugado a hemocianina de lapa californiana (KLH) en el tratamiento de linfoma de células B (Hsu *et al.*, Blood 89: 3129-35, 1997). Después de quimioterapia convencional, 41 pacientes con linfoma de células B no Hodgkin refractario se vacunaron con un idiotipo específico de tumor. Según Kwak *et al.* (1992), *supra*, los antígenos de idiotipo específicos de tumor se obtuvieron por purificación cromatográfica de proteínas producidas por los hibridomas de los pacientes. Estas proteínas, por lo tanto, estaban compuestas por las regiones variable y constante completas de la propia inmunoglobulina del paciente procedentes de los linfomas de los pacientes. Los resultados mostraron que la generación de una respuesta anti-idiotipo se correlacionaba con un resultado clínico mejorado. La duración de ausencia de progreso de la enfermedad y la supervivencia global de todos los pacientes que montaban una respuesta inmune celular anti-idiotipo se prolongaron significativamente en comparación con aquellos pacientes que no montaron una respuesta inmune. Este estudio confirma que pacientes con linfomas de células B pueden inducirse a crear una respuesta inmune específica contra la proteína de idiotipo tumoral (Id). Además, la capacidad de generar una respuesta inmune anti-idiotipo se correlaciona con un resultado clínico más favorable. Sin embargo, para tratar a cada paciente individual, deben fusionarse las células de linfoma obtenidas por biopsia para establecer líneas celulares para permitir la producción de suficiente proteína para vacunar a un paciente típico. Este proceso sería difícil o impracticable para su uso a escala comercial.

Más recientemente, Bendandi *et al.* demostraron remisiones inducidas por vacunación específica de paciente, idiotípica en pacientes con linfoma folicular (Bendandi *et al.*, Nat. Med. 5:1171-77, 1999). Después de quimioterapia convencional, veinte pacientes que mostraron remisión clínica completa se vacunaron usando proteínas idiotípicas específicas de paciente acompañadas por factor estimulador de colonias de granulocitos-monocitos (GM-CSF; véase *infra*). El análisis molecular de las traslocaciones características de este linfoma se realizó antes de la quimioterapia, en la remisión clínica y después de la terapia de vacunación. Se hallaron ocho de once pacientes con traslocaciones detectables después de remisión inducida por quimioterapia que experimentaron remisión molecular completa después de esta vacunación. Se hallaron células T CD8⁺ y CD4⁺ citotóxicas específicas de tumor en 19 de 20 pacientes. También se detectaron anticuerpos específicos de tumor pero se descubrió que no eran necesarios para la remisión. De nuevo, este estudio usó proteínas idiotípicas compuestas por la región variable y constante completas de la inmunoglobulina hallada asociada con el linfoma del paciente y producida por fusión de heterohibridoma.

Por lo tanto, dirigir una respuesta inmune contra el idiotipo de células es un enfoque prometedor, pero las técnicas anteriores están limitadas por las necesidades de producir suficientes cantidades de proteínas idiotípicas a partir de las células de linfoma de cada paciente.

El concepto de inmunidad anti-idiotípica contra tumores de células B también se ha usado en el caso de mieloma múltiple. Kwak y sus colaboradores han informado de resultados respecto a su uso en la potenciación de la eficacia específica de injertos alogénicos de médula por pre-inmunización del donante con IgG de mieloma aislada del paciente (Kwak *et al.*, Lancet 345 (8956): 1016-20, 1995). Además, Massaia y sus colaboradores vacunaron a pacientes en remisión después de quimioterapia de elevada dosis, seguido por trasplante de células madre de sangre periférica (Massaia *et al.*, Blood 94:673-83, 1999).

El factor estimulador de colonias de granulocitos-monocitos (GM-CSF), usado anteriormente en el estudio de Bendandi *et al.* es un factor de crecimiento hematopoyético que estimula la proliferación y diferenciación de células progenitoras hematopoyéticas. Esta citoquina también desempeña una tarea en la conformación de la inmunidad celular aumentando la proliferación de células T (Santoli *et al.*, J.Immunol. 141 (2): 519-26, 1988), aumentando la expresión de moléculas de adhesión en granulocitos y monocitos (Young *et al.*, J.Immunol. 145(2):607-15, 1990; Grabstein *et al.*, Science 232(4749):506-08, 1986), y aumentando la presentación de antígeno (Morrissey *et al.*, J.Immunol. 139(4):1113-9, 1987; Heufler *et al.*, J. Exp. Med. 167(2):700-05, 1988; Smith *et al.*, J.Immunol. 144(5): 1777-82, 1990).

Las vacunas basadas en células diseñadas genéticamente para producir GM-CSF han demostrado inducir respuestas inmunes celulares capaces de eliminar linfomas sistémicos en modelos pre-clínicos. Este efecto está mediado exclusivamente a través de la activación del brazo celular del sistema inmune (Levitsky *et al.*, J. Immuno. 156(10): 3858-65, 1996). Así mismo, bajas dosis de GM-CSF libre han demostrado potenciar la inmunidad antitumoral protectora inducida por inmunización con proteína de idiotipo-KLH a causa de su capacidad de potenciar

la inmunidad a través de un efecto sobre las células CD8 (Kwak et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(20):10972-77,1996). En un estudio, se demostró que GM-CSF es el mejor inmunomodulador para generar inmunidad antitumoral entre los ensayados en un sistema modelo (Dranoff, G., Proc. Natl. Acad. Sci. USA90(8):3539-43,1993).

- 5 GM-CSF también se ha usado como parte de una proteína quimérica usada para generar una respuesta inmune en sistemas modelo. Chen y Levy (Chen y Levy, J. Immunol. 154(7):3105-17, 1995; patente de Estados Unidos N° 6.099.846) estudiaron la producción de anticuerpos monoclonales de ratón usando una proteína quimérica que contenía una parte de GM-CSF más una parte de un antígeno de interés, concretamente una región idiotípica obtenida de un tumor murino de células B, 38C13, ambas fusionadas a partes de cadenas de inmunoglobulina humana. Chen y sus colaboradores también han estudiado proteínas de fusión en las que el resto GM-CSF se ha reemplazado por partes de IL-2 o IL-4 (Chen et al., J.Immunol. 153(10):4775-87, 1994). Una explicación para la necesidad de incluir el resto GM-CSF (o resto de interleuquina) fue aumentar el efecto de los bajos niveles de proteína quimérica producida por el sistema de expresión de células de mamífero. Sin embargo, no se ha demostrado el uso de GM-CSF purificado co-administrado con una proteína quimérica para potenciar la respuesta inmune de una vacunación.

- Con la aparición de la tecnología de ADN recombinante, ahora pueden clonarse moléculas de ADNc de cadena pesada y ligera a partir de hibridomas o a partir de bibliotecas combinatorias empleando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta tecnología de ADN recombinante permite a los investigadores manipular la función efectora o la función de unión de un anticuerpo monoclonal seleccionado. Además, las bibliotecas combinatorias de inmunoglobulinas pueden generarse clonando una gran cantidad de genes V_L y V_H, ordenándolos aleatoriamente para crear una biblioteca de diferentes especificidades de unión, expresándolos en *E. coli*, después explorando la biblioteca estocástica para clones con las afinidades de unión deseadas (Huse et al., Science 246(4935):1275-81,1989). Usando este enfoque recombinante, se clonaron anticuerpos humanos con alta afinidad y especificidad para el toxoide tetánico a partir de una biblioteca combinatoria aleatorizada expresada en *E. coli* (Mullinax et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 87(20): 8095-99, 1990). Los genes de inmunoglobulina se clonaron a partir de células B activadas en vectores bacteriófagos usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores específicos. Las cadenas H y L se combinaron aleatoriamente y se co-expresaron en *E. coli* para componer una biblioteca de 10⁷ miembros. Esta biblioteca combinatoria se exploró con ¹²⁵I-toxoide tetánico y el 0,2% de los clones presentó actividad de unión (Mullinax et al., *supra*). Además, también se han identificado anticuerpos monoclonales murinos usando un enfoque similar (Huse et al., *supra*; Caton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 87(16):6450-54, 1990). Winter y sus colaboradores usaron un vector plasmídico para clonar dominios de inmunoglobulina por la reacción en cadena de la polimerasa para la expresión en bacterias (Orlandi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 86(10):3833-37, 1989).

- Los sistemas de clonación de anticuerpos en *E. coli* recientemente desarrollados son muy útiles para la identificación de genes que codifican especificidades de unión deseadas. Sin embargo, los anticuerpos producidos en *E. coli* generalmente no son útiles para aplicaciones terapéuticas. Típicamente, sólo los fragmentos de unión a antígeno del anticuerpo, Fab o Fv, pueden producirse en forma de productos secretados en bacterias. En el raro caso en que se haya producido una IgG tetramérica de cadena completa en *E. coli*, los dominios C_{H2} no están glucosilados. Los anticuerpos no glucosilados carecen de las actividades citolíticas, citotoxicidad celular dirigida por anticuerpo (ADCC) y activación del complemento para hacer que la inmunoterapia pasiva sea potente. Los sistemas de expresión de mamífero producen anticuerpos glucosilados y por tanto evitan esta limitación del sistema bacteriano. Sin embargo, recientes modificaciones en la división CBER de los "Puntos a Considerar" de la FDA señalan claramente sus preocupaciones acerca de las cargas virales asociadas con anticuerpos monoclonales producidos en células de mamífero. Además, se espera que cualquier anticuerpo diseñado por ingeniería genética producido en un sistema de expresión de mamífero sea bastante caro (1500-5000 dólares por dosis). Por lo tanto, son altamente deseables sistemas de expresión alternativos que eviten las dificultades encontradas con los actuales sistemas de mamífero y bacterianos.

- El sistema de expresión de baculovirus es un alternativa atractiva a la producción de anticuerpos en *E. coli* y células de mamífero. La expresión de proteínas recombinantes usando el sistema de baculovirus se ha demostrado en los pasados años y ha surgido como una excelente elección para la producción de alto rendimiento (1-100 mg/l) de proteínas biológicamente activas en células eucariotas. El sistema de baculovirus/células de insecto también evita los problemas de solubilidad a menudo encontrados cuando se sobreexpresan proteínas recombinantes en procariontes. Además, las células de insecto contienen la maquinaria de modificación post-traduccional eucariota responsable de la corrección del plegamiento, la formación de puentes disulfuro, la glucosilación, la β-hidroxilación, la acilación de ácidos grasos, la prenilación, la fosforilación y la amidación no presentes en procariontes. Se ha demostrado recientemente la producción de un anticuerpo monoclonal glucosilado que reconoce células de carcinoma colorrectal humano a partir de un sistema de expresión de baculovirus (Nesbit, J. Immunol. Methods 151:201-208, 1992). Adicionalmente, también se ha demostrado la expresión de IgA recombinante en células de baculovirus, y esta IgA estaba correctamente ensamblada en heterodímeros de cadena pesada/cadena ligera, N-glucosilada, y secretada (Carayannopoulos et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 91:8348-52, 1994, publicación PCT N° WO 98/30577, patente de Estados Unidos N° 6.063.905). Caspar et al. (1997) Blood, 90(9), 3699-3706 mencionan la producción de proteína de idiotipo en un sistema de baculovirus/células de insecto en forma tanto de IgG_k humana como en forma de proteína de fusión del fragmento variable de cadena individual (scFv) con GM-CSF.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona el uso de una primera proteína quimérica y una segunda proteína quimérica para la fabricación de una composición para terapia de un linfoma de células B en un paciente humano,

en el que dicha primera proteína quimérica comprende la menos una parte de una región V_H y al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina IgM; y

en el que dicha segunda proteína quimérica comprende al menos una parte de una región V_L y al menos una parte de una segunda región constante de inmunoglobulina;

en el que dicha fabricación comprende producir dichas proteínas quiméricas por un método que comprende:

(a) aislar un gen que codifica dicha proteína de dicha región V_H a partir de células B asociadas con dicho linfoma de células B del paciente;

(b) insertar dicho gen que codifica dicha parte de dicha región V_H y un gen que codifica dicha parte de dicha región constante de inmunoglobulina IgM en un vector de expresión para permitir la expresión de dicha primera proteína quimérica;

(c) aislar un gen que codifica dicha parte de dicha región V_L de células B asociadas con dicho linfoma de células B del paciente;

(d) insertar dicho gen que codifica dicha parte de dicha región V_L y un gen que codifica dicha parte de dicha segunda región constante de inmunoglobulina en un vector de expresión para permitir la expresión de dicha segunda proteína quimérica; y

(e) producir dichas proteínas quiméricas introduciendo el vector de expresión en una línea celular de insecto;

en el que la composición comprende adicionalmente una proteína vehículo conjugada a dicha proteína quimérica.

En dicha segunda proteína quimérica la región constante de inmunoglobulina es cadena ligera κ o λ o parte de las mismas. Ejemplos de segundas proteínas quiméricas incluyen $V_L\text{-}\kappa$, y $V_L\text{-}\lambda$.

La presente descripción también proporciona un método para producir proteínas quiméricas usando tecnología de ADN recombinante y un sistema de expresión. Este método incluye las siguientes etapas: (a) aislar un gen que codifique la región V_H de linfoma de una cadena de inmunoglobulina a partir de células B de un paciente que tiene un linfoma de células B, (b) insertar el gen aislado que codifica la región V_H de una cadena de inmunoglobulina y el gen que codifica una región constante de inmunoglobulina IgM en un vector de expresión para permitir la expresión de una proteína quimérica, (c) producir la proteína quimérica introduciendo el vector de expresión en líneas celulares de insecto y permitir su expresión, y (d) aislar la proteína quimérica. El método para producir proteínas quiméricas incluye adicionalmente una etapa de insertar un gen que codifica la región V_L de una cadena de inmunoglobulina y un gen que codifica una segunda región constante de inmunoglobulina en el vector de expresión para permitir la expresión de la segunda proteína quimérica.

En realizaciones preferidas, cualquiera o ambas proteínas quiméricas comprenden al menos una parte de una región V_H y/o V_L de una cadena de inmunoglobulina, más una región enlazadora, y al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina.

En una de las realizaciones de la invención, el vector de expresión usado para expresar las proteínas quiméricas es un vector de baculovirus. El vector contiene preferiblemente dos casetes de expresión que tienen cada uno un promotor, una secuencia señal secretora y una proteína quimérica. Un casete de expresión contiene el promotor p10 de baculovirus AcNPV ligado a la secuencia señal secretora de la melitina de abeja melífera. El otro casete de expresión tiene el promotor de la polihedrina ligado a una secuencia señal secretora de la fosfatasa alcalina placentaria humana. Además de los promotores y secuencias señal enumerados, podrían usarse otros promotores y secuencias señal conocidos por los especialistas en la técnica. En algunas realizaciones preferidas, las secuencias son secuencias señal endógenas asociadas con los genes V_H y V_L aislados de pacientes, u otras secuencias señal implicadas en la producción de anticuerpos. Los genes que codifican las partes V_H o V_L de las cadenas de inmunoglobulina, y los genes que codifican la región constante de inmunoglobulina se insertan, por separado y/o juntos, en el casete de expresión anterior del vector de baculovirus que permite la expresión de una o dos proteínas quiméricas. En una realización preferida, la región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina se controla por el promotor de la polihedrina.

Las proteínas quiméricas producidas se purifican usando columnas de afinidad con anticuerpos anti-inmunoglobulina o proteínas de unión a Ig, tales como proteína A para la región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina, y proteína L para cadenas ligeras kappa, y/o cualquier otra proteína que se una a un dominio de unión de inmunoglobulina.

La presente invención también contempla el acoplamiento covalente de proteínas quiméricas a una proteína vehículo tal como hemocianina de lapa californiana (KLH). La composición también puede administrarse a un paciente junto con una citoquina tal como CSF de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), o una quimioquina tal como una proteína quimiotáctica de monocitos 3 (MCP 3). Como la presente composición que contiene la proteína o proteínas quiméricas está específicamente relacionada con una inmunoglobulina particular procedente de células B

de un paciente que tiene linfoma de células B, la administración de esta composición induce una respuesta inmune contra el idiotipo específico de enfermedad en que están implicados los segmentos V_H o V_L particulares. Por tanto, la administración de la composición altera el linfoma de células B en un paciente. Las vías de administración para la composición incluyen, aunque sin limitación, suministro oral, suministro por inhalación, suministro por inyección, suministro transdérmico, y similares.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Un esquema general para producir una composición que comprende proteínas quiméricas para regiones V_H o V_L de una inmunoglobulina particular de células B de un paciente que tiene patología mediada por células B.

Figura 2: Mapa plasmídico de un vector de expresión de baculovirus p2Bac con sitios de clonación múltiple.

Figura 3: Secuencia de ADN del vector de expresión de baculovirus p2Bac (SEC ID N° 5). La secuencia está representada de 5' a 3'. El vector p2Bac contiene el promotor del gen de la polihedrina de AcNPV (nucleótidos 1 a 120 del número de acceso a GenBank X06637 (SEC ID N° 92)) y el promotor p10 de AcMNPV (nucleótidos 8 a 237 del número de acceso a GenBank A28889 (SEC ID N° 93)).

Figura 4: Secuencia de ADN del plásmido pTRABac/9F12. Este plásmido contiene los genes para las cadenas pesada y ligera (κ) expresadas por la línea celular humana estable 9F12. Esta línea celular produce un anticuerpo humano IgG1/ κ específico para toxoide tetánico (SEC ID N° 89). Las regiones subrayadas representan secuencias que codifican 9F12 IgG1 madura (TT-TACCC...) y cadenas kappa (ATCGACA...), respectivamente. La secuencia está representada de 5' a 3'.

Figura 5a: Mapa plasmídico del vector de expresión de baculovirus recombinante pTRABacHuLC κ HC γ 1 con regiones constantes IgG γ 1.

Figura 5b: Mapa plasmídico del vector de expresión de baculovirus recombinante pTRABacHuLC λ HC γ 1 con regiones constantes IgG γ 1.

Figura 6A: Secuencia de ADN de pTRABacHuLC κ HC γ 1 (SEC ID N° 6). La secuencia está representada de 5' a 3'.

Figura 6B: Secuencia de ADN de pTRABacHuLC λ HC γ 1 (SEC ID N° 7). La secuencia está representada de 5' a 3'.

Figura 6C: Secuencia de ADN de pTRABacHuLC κ HC γ 1 después de modificación utilizando los cebadores de relleno kappa (SEC ID N° 90). La secuencia está representada de 5' a 3'.

Figura 6D: Secuencia de ADN de pTRABacHuLC λ HC γ 1 después de modificación utilizando los cebadores de relleno lambda (SEC ID N° 90). La secuencia está representada de 5' a 3'.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

La posibilidad de provocar una respuesta inmune que reconociera y eliminara células neoplásicas mientras se evita el tejido normal representa un enfoque excitante al tratamiento del cáncer. Induciendo dicha respuesta inmune se ayuda a identificar un antígeno tumoral único. Las neoplasias de células B expresan un antígeno único, el idiotipo de inmunoglobulina (Id), en su superficie. Este antígeno contiene secuencias proteicas tanto de regiones pesadas como ligeras variables de inmunoglobulina (V_H y V_L). Cada célula B alberga una secuencia genética única usada en la producción del idiotipo de inmunoglobulina. Por consiguiente, como la mayoría de las neoplasias de células B surgen a partir de expansión clonal de una única célula B, todas las células que comprenden una neoplasia de células B expresan una proteína Id única. Por tanto, la proteína idiotípica debe servir como diana ideal para terapia inmuno-basada de cualquier neoplasia de células B, tal como linfoma o leucemia.

Inmunoterapia pasiva

Las estrategias de inmunoterapia temprana se centraban en el uso de anticuerpos monoclonales contra idiotipo específico de tumor (MoAb anti-Id). Este enfoque provocó regresión tumoral y remisiones de larga duración en varios pacientes con linfoma no Hodgkin. Sin embargo, muchos pacientes experimentaron una recaída final (Miller et al., N. Engl. J. Med. 306(9):517-22, 1982; Maloney et al., Blood 80(6):1502-10, 1992; Brown et al., Blood 73(3):651-61, 1989; Brown et al., Semin. Oncol. 16(3):199-210, 1989; Meeker et al., Blood 65(6):1349-63, 1985).

Una dificultad que surgió en los estudios descritos anteriormente fue que las células de un linfoma maligno de células B o T podrían alterar su expresión de sus inmunoglobulinas idiotípicas o receptores de células T. Dos ejemplos de esto se describieron en alguno de los artículos enumerados anteriormente (Cleary et al., 1986, y Meeker et al., 1985). También se demostró que células de leucemia de células T podían escapar a los anticuerpos anti-idiotípicos reduciendo su expresión de receptor de células T superficial (Maecker et al., J. Immunol. 141:2994-3002, 1985), y esto se confirmó por leucemias de células B en un modelo animal (Stevenson et al., J. Immunol. 130(2):970-3, 1983). Otros estudios demostraron que existe una variación idiotípica incluso dentro de un linfoma de células B humano dado (Berinstein et al., J. Immunol. 144(2):752-8, 1990; Levy S, et al., J. Exp. Med. 168(2): 475-89, 1988;). Dichas mutaciones parecieron responsables de la eficacia disminuida del MoAb anti-Id en el tiempo (Berinstein et al., supra; Tao et al., Nature 362(6422):755-8, 1993; Chen et al., J. Immunol. 153(10):4775-87, 1994).

Un modo de evitar este problema es mediante la generación y uso de un antisuero policlonal contra la proteína idiotípica. Caspar y colaboradores estudiaron el potencial de una terapia basada en anticuerpo monoclonal en un sistema modelo de ratón (Caspar et al., Blood 90:3699-706, 1997). Estos autores vacunaron a un ratón usando proteínas idiotípicas de un paciente con linfoma no Hodgkin que había recaído después de terapia satisfactoria con anticuerpo monoclonal. Los anticuerpos policlonales resultantes reconocían proteínas idiotípicas tanto del tumor original como de todas las variantes. Por lo tanto, la generación de una respuesta de anticuerpo policlonal específica para el idiotipo de un linfoma o leucemia de células B representaría una mejora sobre la terapia de anticuerpos monoclonales. Producir suficientes cantidades de proteína para una vacunación para producir anticuerpos monoclonales es una carga significativa de este enfoque.

Inmunoterapia activa

La inmunoterapia activa puede evitar el fenómeno de escape mutacional observado con estrategias inmunes pasivas. Dicha terapia tiene el potencial de generar una respuesta inmune más amplia y de este modo reconocer la población celular tumoral heterogénea que puede surgir en el tiempo. La dificultad con inmunoterapia activa recae en convencer al sistema inmune del paciente de reaccionar contra un "autoantígeno" percibido expresado por el tumor. Como con la proteína idiotípica, muchos de los antígenos expresados por tumores son inmunógenos débiles.

En la presente invención, la especificidad única del sistema inmune se ha adaptado para tratar linfomas de células B. En la presente invención, se clonó la secuencia de ADN que codifica la región variable de las inmunoglobulinas idiotípicas usando cebadores derivados del extremo 5' de cada subfamilia única de cadenas de inmunoglobulina ligera y pesada junto con un cebador de región constante. Típicamente, este proceso usa una de varias técnicas de clonación adecuadas tales como PCR. Estos cebadores de región constante, en combinación con uno para la región V_H y uno para la región V_L , pueden usarse para clonar las regiones variables como una primera etapa en la producción de una proteína quimérica que comprende una región variable y una región constante. Como alternativa, pueden usarse técnicas tales como 5' RACE. En el caso de un paciente descrito *infra*, se usó 5' RACE para clonar las regiones variables de las cadenas de inmunoglobulina pesada y ligera para producir una proteína quimérica. Ejemplos de proteínas quiméricas incluyen: V_L / C_K , V_L / C_λ , V_H / C_K y V_H / C_λ . Estas proteínas quiméricas se producen en células de insecto usando un vector de baculovirus. La proteína quimérica por tanto comprende una parte de una región variable de una molécula de inmunoglobulina de un paciente y también comprende una parte de una región constante de una fuente diferente al paciente. Se predice que estas proteínas quiméricas se producen de forma más eficaz que usando los sistemas existentes para producir proteínas idiotípicas y serán excelentes inmunógenos para su uso en protocolos de vacunación.

La presente invención cubre la gran demanda de un tratamiento eficaz para linfomas de células B. la invención obtiene ventaja de los antígenos de superficie celular únicos presente en la superficie de células B implicadas en linfomas de células B, y se preparan de un modo específico para el paciente. Dichas vacunas proporcionan selectividad exquisita estando adaptadas a los marcadores únicos de las células B patogénicas encontradas en un paciente dado.

El sistema de expresión de baculovirus/células de insecto se ha mostrado eficaz para la producción eficaz de anticuerpos funcionales para inmunoterapia a partir de cualquier paciente dado. Este vector de expresión de baculovirus descrito a continuación en la sección experimental se diseñó de modo que solamente se necesitaban dos cebadores específicos del gen personalizados para amplificar cualquier par de regiones variables de anticuerpo para una fácil subclonación y expresión como cadena ligera kappa humana y cadena pesada $IgG_{\gamma 1}$. La incorporación de las secuencias señal secretoras heterólogas, que dirigían las cadenas pesada y ligera a la vía de secreción, se incorporaron para la expresión de grandes cantidades de inmunoglobulina activa a partir de células de insecto. Este vector debe ser útil para la expresión de cualquier región variable de cadena ligera kappa (V_L) en fase con la región constante kappa humana y se secretaba mediante la secuencia señal secretora de la fosfatasa alcalina placentaria humana; y cualquier región variable de cadena pesada (V_H) en fase con el dominio constante $IgG_{\gamma 1}$ humano conducida por la secuencia señal secretora de la melitina de abeja melífera. En otros sistemas, la región constante de cadena ligera lambda reemplaza a la región constante kappa. La proteína quimérica entonces se expresa con la región V_L en fase con la región constante lambda humana y se secreta mediante la secuencia señal secretora de la fosfatasa alcalina placentaria humana, junto con cualquier región variable de cadena pesada (V_H) en fase con el dominio constante $IgG_{\gamma 1}$ humano conducido por la secuencia señal secretora de la melitina de abeja melífera. Cualquier anticuerpo monoclonal, de ratón o humano, procedente de una línea celular monoclonal o identificado por clonación de presentación en fagos, podría expresarse fácilmente en forma de $IgG_{\gamma 1}/\kappa$ o $IgG_{\gamma 1}/\lambda$ humana completa en este vector después de dos etapas simples de subclonación. Además, podrían usarse diferentes tipos de inmunoglobulina, incluyendo cadenas pesadas de IgM, o segmentos de las mismas, en lugar de $IgG_{\gamma 1}$. Además, a parte de esas secuencias señal descritas *supra*, la presente invención puede usar otras secuencias señal secretoras tales como las secuencias secretoras endógenas asociadas con los genes de inmunoglobulina obtenidos de un paciente dado. Además, un especialista en la técnica sería capaz de seleccionar varios cebadores diferentes que podrían usarse de forma equivalente en este sistema para producir resultados equivalentes para amplificar cualquier par de regiones variables de anticuerpo para una fácil subclonación.

En algunos casos, la utilización del sistema de baculovirus para la expresión de proteínas biológicamente activas se ha visto impedido por la capacidad de solubilizar de forma eficaz proteínas recombinantes sin degradación proteolítica excesiva. Para evitar los problemas de solubilidad y proteólisis encontrados con la expresión de proteínas recombinantes en células de insecto, se desarrollaron vectores de transferencia de baculovirus para la secreción eficaz de proteínas biológicamente activas. Estos vectores que facilitan la secreción de proteínas recombinantes a partir de células de insecto hospedadoras se construyen insertando secuencias líder secretoras funcionales corriente abajo del promotor de la polihedrina. La inserción en fase de secuencia de ADNc provocó la síntesis de proteínas que contienen una secuencia señal heteróloga que dirigía la proteína recombinante a la vía secretora. Se ensayaron tanto secuencias líder humanas como de insecto para maximizar la secreción de proteínas heterólogas a partir de células de insecto. La secuencia señal de fosfatasa alcalina placentaria humana (SEC ID N° 1: MLGPCMLLLLLLGLR-LQLSLG; la secuencia de ADN es SEC ID N° 2: ATG GTG GGA CCC TGC ATG CTG CTG CTG CTG CTG CTA GGC CTG AGG CTA CAG CTC TCC CTG GGC) y la secuencia señal de la melitina de abeja melífera (SEC ID N° 3: MKFLVN-VALVFMVVYISYIYA; la secuencia de ADN es SEC ID N° 4: ATG AAA TTC TTA GTC AAC GTT GCA CTA GTT TTT ATG CTC GTG TAC ATT TCT TAC ATC TAT GCG) han demostrado ambas ser útiles para la secreción de numerosas proteína bacterianas y humanas (Mroczkowski et al., J Biol. Chem. 269:13522-28, 1994 y Tessier et al., Gene 98:177-83,1991).

Para dirigir la presente invención a un paciente particular primero se requiere la identificación y aislamiento de los genes que codifican los antígenos únicos, y después el medio para producir esos antígenos. Esto puede conseguirse de varios modos diferentes disponibles para los especialistas en la técnica. Por ejemplo, un método recién desarrollado que está adaptado a las necesidades de la presente invención usa un nuevo sistema de expresión de baculovirus/células de insecto y se desarrollo recientemente para la producción eficaz de anticuerpos funcionales para inmunoterapia (véase la solicitud provisional de Estados Unidos N° de serie 60/244.722, titulada "Expression Vectors for Production of Recombinant Immunoglobulin").

La expresión de proteínas recombinantes usando el sistema de baculovirus permite la producción de grandes cantidades de proteínas biológicamente activas sin muchos de los inconvenientes asociados con proteínas producidas en bacterias, y también evita las complicaciones de usar células de mamífero. Por ejemplo, se clonaron los genes de inmunoglobulina a partir de la línea celular humana estable 9F12 (ATCC N° HB8177), que produce un anticuerpo IgG1/ κ humano específico para toxoide tetánico, en un vector de transferencia de expresión de promotor dual de baculovirus. Se produjo inmunoglobulina IgG1/ κ intacta en células de insecto que se comportaban de forma similar al anticuerpo de mamífero en análisis por SDS-PAGE y transferencias de Western. El anticuerpo producido por células de insecto estaba glucosilado. Se determinó que las afinidades de unión del Mab9F12 purificado y el anticuerpo expresado en baculovirus purificado eran idénticas y se determinó que los niveles de producción eran de aproximadamente 5-10 μ g/ml.

Pueden producirse fragmentos de inmunoglobulina humana solubles que contienen epítomos específicos de las regiones variables particulares en células hospedadoras de insecto mediante ingeniería genética. Estas proteínas de inmunoglobulina recombinante solubles que contienen regiones V_H y/o V_L particulares derivadas del paciente pueden usarse como composición terapéutica. Cuando se administran en el paciente inducen específicamente, in vivo, una respuesta inmune mediada por células para alterar la patología mediada por células B.

Esta tecnología también se ha aplicado a la rápida identificación y clonación de genes V _{α} y V _{β} específicos del paciente expresados por un linfoma de células T, expresando después éstos como moléculas κ /V _{α} o IgG₁/V _{β} recombinantes en células de insecto (véase la solicitud provisional de Estados Unidos N° de serie 60/266.133 titulada "Method and Composition for Altering a T Cell Mediated Pathology"). Las moléculas producidas por este método se formularon y usaron para inducir inmunidad anti-idiotípica mediada por células contra linfomas de un modo específico de paciente.

El término "alterando" o "altera" se refieren a la capacidad de un compuesto o composición de modular una patología mediada por células B. Un compuesto que altera una patología de células B puede hacerlo por varios mecanismos potenciales, incluyendo creación de anticuerpos dirigidos al compuesto que a su vez destruye células de la patología de células B, inducción de la apoptosis en las células B implicadas en la patología, inhibición del crecimiento y división adicionales de las células de la patología de células B, inducción de la inmunidad mediada por células dirigida a las células de la patología de células B, o inhibiendo de otro modo la actividad de las células B patológicas. No es necesario determinar el mecanismo exacto que causa la alteración, sino solamente que existe una alteración en la patología mediada por células B mediante algún mecanismo como consecuencia de la adición de las moléculas o composiciones de la invención.

La expresión "patología mediada por células B" o "patología de células B" se refiere a aquellas enfermedades y afecciones que surgen de una replicación o actividad inapropiada de células B. en la invención, la patología mediada por células B es un linfoma de células B provocado por la replicación inapropiada de células B. los linfomas de células B son difíciles de tratar de forma eficaz con los métodos médicos actualmente disponibles. Otros tipos de patologías de células B que implican una replicación inapropiada de células B incluyen leucemias crónicas y agudas de células B, mielomas múltiples, y algunos linfomas no Hodgkin.

La expresión "célula B" se refiere a una célula del sistema inmune de un organismo que está implicada en la inmunidad humoral en el funcionamiento normal de un organismo (es decir, uno que no está experimentando una patología mediada por células B). Las células B son glóbulos blancos que se desarrollan a partir de la médula ósea y producen anticuerpos; también se conocen como linfocitos B. En general, las células B son células implicadas en la producción de anticuerpos en un organismo.

El término "patología" se refiere a un estado en un organismo (por ejemplo, un ser humano) que está reconocido como anormal por miembros de la comunidad médica. El linfoma a tratar en la presente invención está caracterizado por una anomalía en la función de las células B.

El término "paciente" se refiere a un organismo en necesidad de tratamiento para una patología, o más específicamente, una patología de células B. El término se refiere a un sujeto vivo que se ha presentado en un entorno clínico con un síntoma o síntomas particulares que sugieren la necesidad de tratamiento con un agente terapéutico. El tratamiento puede estar generalmente aceptado en la comunidad médica o puede ser experimental.

El diagnóstico de un paciente puede alterarse durante el transcurso del progreso de la enfermedad, de forma espontánea o durante el transcurso de un régimen o tratamiento terapéutico.

La expresión "proteína quimérica" se refiere a una proteína que comprende una única cadena polipeptídica que comprende segmentos derivados de al menos proteínas diferentes. Los segmentos de la proteína quimérica deben derivar de proteínas heterólogas, es decir, todos los segmentos del polipéptido quimérico no surgen de la misma proteína. Las proteínas quiméricas usadas en la presente invención incluyen proteínas que contienen partes de la región V_H o V_L de una cadena de inmunoglobulina, pero no comprenden la región C completa de esas cadenas encontradas en el clon de células B a partir del cual se obtienen las regiones V_H o V_L . Además, la región V_H o V_L no incluye la región variable completa, sino que incluye suficiente para generar una respuesta inmune. Las proteínas quiméricas usadas en la presente invención también pueden incluir proteínas en las que se ha reemplazado un segmento de la proteína de origen natural con un segmento equivalente natural o de origen no natural. Esto incluye regiones constantes de inmunoglobulina en las que se ha reemplazado un segmento de la proteína con un enlazador, segmento o dominio que está parcial o completamente hecho por el hombre. En todos los casos, sin embargo, el gen para la proteína quimérica de la presente invención no será igual al gen para las inmunoglobulinas que existen de forma natural en el paciente. El gen para la proteína quimérica será distinguible de la proteína de origen natural por una de las siguientes razones: (1) no será el gen de inmunoglobulina de longitud completa o ADNc del paciente o (2) será un subtipo diferente al aislado del paciente.

Los términos "proteína", "polipéptido", y "péptido" se usan de forma intercambiable en este documento.

El término "natural" o "nativa" se refiere a una proteína que está aislada de la naturaleza. Por tanto, una proteína de origen natural puede hacer referencia a una proteína como se halla en la naturaleza que está codificada por un gen que no está modificado por el uso de técnicas recombinantes. Una proteína nativa puede hacer referencia a una proteína como puede encontrarse o sintetizarse en la naturaleza. Estos términos también pueden aplicarse a proteínas que se producen por un sistema biológico tal como el sistema viral de baculovirus de la presente invención o por cultivo de células derivadas de pacientes. Una proteína nativa puede, como alternativa, hacer referencia a una proteína aislada que no se ha desnaturalizado. El término "nativa" también puede hacer referencia al modo en que se pliega el polipéptido o proteína, solo o en combinación con otros polipéptidos, de modo que se parezca a proteínas similares halladas en la naturaleza, o como se modifica después de la traducción ("modificaciones post-traduccionales") de modo que se parezca a proteínas similares halladas en la naturaleza. Una proteína de origen natural puede hallarse solamente en células B patológicas de un único paciente, no obstante, esto puede considerarse una proteína de origen natural.

El término "segmento" o "parte" se usa para indicar un polipéptido derivado de la secuencia de aminoácidos de las proteínas usadas para las proteínas quiméricas que tienen una longitud menor que el polipéptido de longitud completa a partir del cual se han obtenido. Se entiende que dichos segmentos pueden retener una o más partes características del polipéptido nativo. Ejemplos de dichas características retenidas incluyen: unión con una especificidad de anticuerpo por el polipéptido nativo, o un epítipo del mismo.

Los términos " V_H " y " V_L " se refieren a las regiones variables de las cadenas polipeptídicas de moléculas de inmunoglobulina, o ácidos nucleicos que codifican dichas cadenas polipeptídicas. Un especialista en la técnica comprenderá el significado de estos términos. La secuencia exacta de una región variable no puede predecirse y debe determinarse aislando la secuencia en cuestión. Las regiones V_H y V_L aisladas de pacientes particulares se usan en la presente invención. La secuencia exacta de una cadena ligera kappa (κ) o lambda (λ) se determina por ordenamientos clonales de las regiones V, regiones J y región constante del locus de cadena ligera. (Los loci kappa y lambda están separados y son distintos). La secuencia exacta de una cadena pesada se determinó por reordenamientos clonales de las regiones V, regiones D, regiones J y región constante del locus de cadena pesada. Una variación adicional de secuencia en la región variable surge de la imprecisión durante el proceso de recombinación y también se genera por mutaciones somáticas posteriores a la finalización del proceso de recombinación. Los términos " V_H " y " V_L " también se refieren a partes o segmentos de las regiones V_H y V_L . Un

segmento de la región V_H y V_L también puede incluir toda o sustancialmente toda la región V . la expresión "sustancialmente toda" se refiere a aproximadamente el 90% de la región variable completa, o aproximadamente el 80% de la región variable completa. La parte de la región V_H y V_L presente debe ser suficiente para permitir que la molécula quimérica funcione en la presente invención. Los términos " V_H " y " V_L " también se refieren a derivados funcionales de dichas regiones polipeptídicas descritas *infra*.

La expresión "región constante de inmunoglobulina" se refiere a todo o parte de esa porción de las moléculas de inmunoglobulina que no están codificadas por las regiones variables de inmunoglobulinas. La expresión "región constante de inmunoglobulina" puede también hacer referencia a la secuencia de ADN que codifica la región constante de inmunoglobulina. La región constante de inmunoglobulina incluye los segmentos C_L , C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} , y la región bisagra. Los tipos de inmunoglobulina incluyen las cadenas pesadas $IgG_{\gamma 1}$, $IgG_{\gamma 2}$, $IgG_{\gamma 3}$, $IgG_{\gamma 4}$, IgA_1 , IgA_2 , IgM , IgD , IgE , y las cadenas ligeras κ o λ o segmentos de las mismas.

La expresión "pliegue de inmunoglobulina" o "dominio de inmunoglobulina" se refiere a un elemento estructural de la superfamilia de inmunoglobulinas. El dominio de inmunoglobulina es un dominio estructural de repetición conservado de aproximadamente 110 aminoácidos cada uno.

Los dominios de inmunoglobulina se hallan en muchas moléculas proteicas, incluyendo anticuerpos, el receptor de antígeno de células T, los receptores de citoquinas (por ejemplo, el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas con 5 dominios Ig), moléculas de adhesión celular (por ejemplo, ICAM-1/CD54), y muchos otros. Se hallan dos dominios de inmunoglobulina en cada TCR; uno en la región variable y uno en la región constante. Se hallan dos dominios de inmunoglobulina en cadenas ligeras de anticuerpo y se hallan cuatro en cadenas pesadas IgG . La presente invención contempla el reemplazo de uno o dos dominios de la región constante con dominios de una molécula diferente, tal como una molécula de inmunoglobulina, para producir una región constante modificada (quimérica) que puede tener diferentes propiedades tales como unión a otras moléculas.

Los términos " $IgG_{\gamma 1}$, $IgG_{\gamma 2}$, $IgG_{\gamma 3}$, $IgG_{\gamma 4}$, IgA , IgA_1 , IgA_2 , IgM , IgD , IgE " se refieren a clases y subclases de inmunoglobulinas humanas. Los términos pueden hacer referencia a las secuencias de ADN o las secuencias de aminoácidos de las proteínas. La clase o subclase de una molécula de inmunoglobulina se determina por su cadena pesada. IgG e IgD son diferentes clases de inmunoglobulinas; IgG_1 e IgG_2 son diferentes subclases de moléculas de inmunoglobulina. El término " IgA " puede hacer referencia a cualquier subclase de moléculas IgA , incluyendo moléculas IgA_2 . En algunos casos, la cadena pesada de inmunoglobulina usada puede ser una proteína quimérica que contenga aminoácidos de una segunda proteína.

El término " $IgG_{\gamma 1}$ " se refiere a la cadena pesada asociada con clase IgG_1 de inmunoglobulinas. IgG_1 representa aproximadamente el 66% de las inmunoglobulinas IgG humanas (Roitt et al., Immunology, Mosby, St. Louis, pg. 4.2, 1993).

Las expresiones "región constante kappa", "región constante lambda", "regiones constantes κ ", y "región constante λ " se refieren a las regiones constantes de cadenas ligeras kappa (κ) y lambda (λ) que permanecen constantes durante el desarrollo del sistema inmune. Los términos pueden hacer referencia a las secuencias de ADN o las secuencias de aminoácidos de las proteínas. En algunas realizaciones, partes de la cadena ligera de inmunoglobulina pueden estar comprendidas en una proteína quimérica que contenga aminoácidos de una o más proteínas diferentes.

El término "administrar" se refiere a un método para poner en contacto un compuesto con o dentro de células o tejidos de un organismo. La patología mediada por células B puede prevenirse o tratarse cuando las células o tejidos del organismo existen dentro del organismo o fuera del organismo. Las células que existen fuera del organismo pueden mantenerse o cultivarse en placas de cultivo celular. Para células albergadas dentro del organismo, existen muchas técnicas en la técnica para administrar compuestos, incluyendo (aunque sin limitación) suministro oral, parenteral, aplicación dérmica, inyección, y aplicaciones en aerosol.

El término "composición" se refiere a una mezcla que contiene la proteína de interés. En realizaciones preferidas, la composición puede contener componentes adicionales, tales como adyuvantes, estabilizantes, excipientes, y similares.

La expresión "asociado con" en referencia a la relación de una región variable para un clon de célula B se refiere a la región variable que se halla en las inmunoglobulinas producidas por un clon particular de células B.

La expresión "clon de células B" se refiere a los descendientes clonales de una única célula B. Los descendientes clonales de células B expresan el mismo idiotipo en los anticuerpos producidos que la célula parental. Un especialista en la técnica comprende que los descendientes clonales de una célula B pueden haber experimentado mutación somática dentro de la región variable del gen de inmunoglobulina pero aún ser parte del clon de célula B.

El término "aislar" se refiere a retirar una secuencia de ácido nucleico de origen natural de su entorno celular normal.

Por tanto, la secuencia puede estar en una solución libre de células o colocarse en un entorno celular diferente. El término no implica que la secuencia sea la única cadena nucleotídica presente, sino que está esencialmente libre (al menos aproximadamente un 90 - 95% pura) de material no nucleotídico asociado de forma natural con la misma, y por tanto se distingue de cromosomas aislados. Además, mediante el uso del término "aislar" en referencia a un ácido nucleico se entiende que la secuencia de ADN o ARN específica está aumentada a una fracción significativamente mayor (de 2 a 5 veces) del ADN o ARN total presente en la solución de interés que en las células a partir de las cuales se obtiene la secuencia. Esto podría causar una persona por reducción preferencial en la cantidad de otro ADN o ARN presente, o por un aumento preferencial en la cantidad de secuencia de ADN o ARN específica, o por una combinación de las dos. Sin embargo, debe apreciarse que enriquecido no implica que no haya otras secuencias de ADN o ARN presentes, solo que la cantidad relativa de la secuencia de interés se ha aumentado significativamente. El término "significativo" se usa para indicar que el nivel de aumento es útil para la persona que hace dicho aumento, y generalmente indica un aumento relativo a otros ácidos nucleicos de aproximadamente al menos 2 veces, más preferiblemente al menos 5 a 10 veces o incluso más. El término tampoco implica que no haya ADN o ARN de otras fuentes. El ADN de otras fuentes puede, por ejemplo, comprender ADN de un genoma de levadura o bacteriano, o un vector de clonación tal como pUC19. Este término se distingue de acontecimientos de origen natural, tales como infección viral, o crecimientos tipo tumoral, en que el nivel de un ARNm puede estar aumentado de forma natural con relación a otras especies de ARNm. Es decir, se entiende que el término cubre solamente aquellas situaciones en que una persona ha intervenido para elevar la proporción del ácido nucleico deseado.

Las secuencias de ADN aisladas son relativamente más puras que en el entorno natural (en comparación con el nivel natural, este nivel debe ser al menos 2 a 5 veces mayor, por ejemplo, en términos de mg/ml). Las secuencias individuales obtenidas a partir de PCR pueden purificarse a homogeneidad electroforética. Las moléculas de ADN obtenidas a partir de esta reacción de PCR podrían obtenerse del ADN total o del ARN total. Estas secuencias de ADN no son de origen natural, sino que en su lugar se obtienen preferiblemente mediante manipulación de una sustancia de origen natural parcialmente purificada (por ejemplo, ARN mensajero (ARNm)). Por ejemplo, la construcción de una biblioteca de ADNc a partir de ARNm implica la creación de una sustancia sintética (ADNc) y los clones de ADNc individuales puros pueden aislarse de la biblioteca sintética por selección clonal a partir de las células que porta la biblioteca de ADNc. El proceso que incluye la construcción de una biblioteca de ADNc a partir de ARNm y aislamiento de distintos clones de ADNc produce una purificación de aproximadamente 10^6 veces del mensajero nativo. Por tanto, se contempla expresamente la purificación de al menos un orden de magnitud, preferiblemente dos o tres órdenes, o más preferiblemente cuatro o cinco órdenes de magnitud.

La expresión "gen que codifica" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína o polipéptido de interés. La secuencia de ácido nucleico puede ser una molécula de ADN o ARN. En realizaciones preferidas, la molécula es una molécula de ADN. En otras realizaciones preferidas, la molécula es una molécula de ARN. Cuando está presente en forma de molécula de ARN, comprende las secuencias que dirigen los ribosomas de la célula hospedadora a iniciar la traducción (por ejemplo, un codón de inicio, ATG) y dirigen los ribosomas a finalizar la traducción (por ejemplo, un codón de parada). Entre el codón de inicio y el codón de parada hay una fase de lectura abierta (ORF). Un especialista en la técnica está muy familiarizado con el significado de estos términos.

La expresión "líneas celulares de insecto" se refiere a líneas celulares derivadas de insectos y susceptibles a infección por baculovirus. Un especialista en la técnica está familiarizado con dichas líneas celulares y las técnicas necesarias para utilizarlas. Ejemplos representativos de líneas celulares de insecto incluyen líneas celulares de *Spodoptera frugiperda* (sf9) y *Trichoplusia ni* (Hi-5).

Las expresiones "células de *Trichoplusia ni* (High-5)" y "células de *Spodoptera frugiperda* (sf9)" se refieren a líneas celulares de insecto usadas en combinación con vectores de expresión de baculovirus. Un especialista en la técnica está familiarizado con estas líneas celulares y con cómo obtenerlas.

El término "insertar" se refiere a una manipulación de una secuencia de ADN mediante el uso de enzimas de restricción y ligasas mediante lo cual la secuencia de ADN de interés, que habitualmente codifica el gen de interés, puede incorporarse en el interior de otra molécula de ácido nucleico dirigiendo ambas moléculas con enzimas de restricción apropiadas para crear solapamientos compatibles y después usando una ligasa para unir las moléculas juntas. Un especialista en la técnica está muy familiarizado con dichas manipulaciones y pueden hallarse ejemplos en Sambrook *et al.* (Sambrook, Fritsch, y Maniatis, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, 1989), que se incorpora por la presente por referencia en su totalidad incluyendo cualquier dibujo, figura y tabla.

El término "adyuvante" se refiere a una sustancia que se proporciona con el antígeno o inmunógeno de elección, por ejemplo, la proteína o polipéptido contra el cual se desea una respuesta inmune, para potenciar la respuesta inmune cuando se intenta crear una respuesta inmune en un animal contra el antígeno o inmunógeno de elección. Un especialista en la técnica está familiarizado con los adyuvantes apropiados a seleccionar y usar. Los adyuvantes apropiados para uso en seres humanos incluyen sales de aluminio y MF59 (Singh y O'Hagan, Nature Biotech 17:1075-81, 1999). Se están desarrollando otros adyuvantes (*id.*) y pueden usarse junto con la presente invención.

La expresión "hemocianina de lapa californiana" o "KLH" se refiere a una proteína que se aísla de lapas californianas que se usa habitualmente como proteína vehículo en los procesos de inmunización. Un especialista en la técnica está familiarizado con el significado de la expresión hemocianina de lapa californiana.

- 5 El término "citoquina" se refiere a una familia de factores de crecimiento, (gluco)proteínas solubles, principalmente secretadas de leucocitos. Las citoquinas estimulan respuestas inmunes tanto humorales como celulares, así como la activación de células fagocíticas. Las citoquinas se sintetizan, almacenan y transportan por diversos tipos celulares no solamente dentro del sistema inmune (linfoquinas, interleuquinas, monoquinas, factores de necrosis tumoral, interferones) sino también por otras células que están asociadas con el estudio de hematología (factores estimuladores de colonias), oncología (factores de crecimiento transformante), y biología celular (factores de crecimiento peptídico, proteínas de choque térmico u otras proteínas de estrés).

15 Las citoquinas secretadas a partir de linfocitos se llaman linfoquinas, mientras que aquellas secretadas por monocitos o macrófagos se mencionan como monoquinas. Muchas de las linfoquinas también se mencionan como interleuquinas (IL), ya que no solamente se secretan por leucocitos sino que también son capaces de afectar a respuestas celulares de leucocitos. Específicamente, las interleuquinas son factores de crecimiento dirigidos a células de origen hematopoyético.

20 La expresión "factor de crecimiento" se refiere a una proteína que se une a receptores sobre la superficie de una célula y posteriormente activa la proliferación y/o diferenciación celular. Muchos factores de crecimiento son bastantes versátiles y pueden actuar estimulando la división celular en una amplia diversidad de tipos celulares, mientras que otros son específicos de un tipo celular particular.

25 El término "quimioquina" se refiere a un grupo de pequeñas citoquinas pro-inflamatorias que funcionan como quimioatrayentes y activadores para leucocitos y representan una superfamilia de más de 30 citoquinas quimiotácticas. Orquestan la activación y migración de células del sistema inmune desde la sangre o la médula ósea al sitio de infección y el tejido dañado. Las quimioquinas también desempeñan un papel esencial en el crecimiento y proliferación de células madre primitivas halladas en médula ósea que a su vez se desarrollan en células inmunes maduras. Las quimioquinas están implicadas en un amplio intervalo de enfermedades agudas e inflamatorias y ejercen en su acción uniéndose a receptores de la clase de siete hélices transmembrana.

35 Las quimioquinas frecuentemente varían de 8 a 11 kDa de peso molecular, son activas sobre un intervalo de concentración de 1 a 100 ng/ml, y se producen por una amplia diversidad de tipos celulares. La producción de quimioquinas típicamente se induce por irritantes exógenos y mediadores endógenos tales como IL-1, TNF-alfa, y PDGF. Las quimioquinas se unen a receptores de superficie celular específicos y pueden considerarse las citoquinas de segundo orden que parecen ser menos pleiotrópicas que las citoquinas pro-inflamatorias de primer orden porque no son potentes inductoras de otras citoquinas y muestran funciones más especializadas en la inflamación y la reparación.

40 La expresión "factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos" o "GM-CSF" se refiere a una pequeña proteína (menos de 20 kDa) secretada. Se une a receptores de superficie celular específicos y funciona como estimulador específico de especie de células de médula ósea. Estimula el crecimiento y diferenciación de varios linajes de células hematopoyéticas incluyendo células dendríticas, granulocitos, macrófagos, eosinófilos, y eritrocitos. En particular, esta citoquina también desempeña un papel en la conformación de la inmunidad celular aumentando la proliferación de células T (Santoli et al., J.Immunol. 141 (2):519-26, 1988), aumentando la expresión de moléculas de adhesión en granulocitos y monocitos (Young et al., J.Immunol. 145(2):607-15, 1990; Grabstein et al., Science 232(4749):506-08, 1986), y aumentando la presentación de antígeno (Morrissey et al., J.Immunol 139(4):1113-9, 1986; Heufler et al., J. Exp. Med. 167(2):700-05, 1988; Smith et al., J.Immunol. 144(5):1777-82, 1990).

50 La expresión "proteína quimiotáctica de monocitos-3" o "MCP-3" se refiere a una quimioquina producida principalmente por monocitos. MCP-3 tiene un amplio espectro de actividad quimiotáctica y atrae monocitos, células dendríticas, linfocitos, células natural killer, eosinófilos, basófilos, y neutrófilos. El ADNc se clonó en 1993 por Minty et al. Eur Cytokine Netw 4(2):99-110, 1993, y Opdenakker et al., Biochem Biophys Res Commun., 191(2):535-42, 1993. Sus propiedades se han revisado recientemente por Proost et al., J Leukoc Biol. 59(1):67-74, 1996.

55 El término "vector de expresión" se refiere a una construcción de ADN recombinante que está diseñada para expresar un gen seleccionado de interés, habitualmente una proteína, cuando se inserta apropiadamente en el vector de expresión. Un especialista en la técnica entiende la expresión. Los vectores de expresión habitualmente incluyen un promotor en el extremo 5' del sitio en que se inserta el gen de interés y una región terminadora en el extremo 3' del sitio. Frecuentemente, el gen de interés se inserta en el sitio apropiado mediante sitios seleccionados de escisión por enzimas de restricción. La expresión "vector de expresión" también se refiere a una construcción de ADN tal como se ha descrito anteriormente en que ya se ha insertado el gen de interés que codifica el producto de interés.

65 La expresión "vector de expresión de baculovirus" se refiere a una construcción de ADN que está diseñada para expresar un gen seleccionado cuando se usa en el sistema de baculovirus. Cualquiera de los baculovirus o vectores

de expresión potenciales diseñados para funcionar en el sistema de baculovirus puede usarse en la presente invención. De un modo similar, la expresión "vector de expresión" es un género que abarca la realización particular de vectores de expresión de baculovirus, pero los "vectores de expresión" pueden funcionar en células y líneas celulares a parte de, o además de, líneas celulares de insecto.

5 La expresión "permite la expresión de" se refiere a colocar un vector de expresión en un entorno en que se expresará el gen de interés. Esto habitualmente significa insertar el vector de expresión en un tipo celular apropiado en que el promotor y otras regiones necesarias para la expresión génica se reconocerán por los componentes de la célula hospedadora y causarán la expresión del gen de interés. La expresión normalmente consta de dos etapas:
10 transcripción y traducción. La expresión también puede realizarse in vitro usando componentes derivados de células. Un especialista en la técnica está familiarizado con estas técnicas, y dichas técnicas se exponen en Sambrook *et al.* (Sambrook, Fritsch, y Maniatis, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, 1989). En la realización preferida, el producto expresado es una proteína o polipéptido.

15 La expresión "secuencia señal secretora" se refiere a una secuencia peptídica. Cuando esta secuencia se traduce en fase como un péptido unido al extremo amino-terminal de un polipéptido de elección, la secuencia señal secretora causará la secreción del polipéptido de elección por interacción con la maquinaria de la célula hospedadora. Como parte del proceso de secreción, esta secuencia señal secretora se escindirán, dejando solamente el polipéptido de interés después de que se haya exportado. En realizaciones preferidas, se emplea la
20 secuencia señal secretora de la melitina de abeja melífera. En otras realizaciones preferidas, se emplea la secuencia señal secretora de la fosfatasa alcalina placentaria humana. La presente invención no está limitada por estas secuencias señal secretoras y pueden sustituirse por otras bien conocidas por los especialistas en la técnica en lugar de, o además de, estas. La expresión "secuencia señal secretora" también se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido secretor.

25 El término "ELISA" se refiere a "ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas" en el que se determina la presencia o concentración de una proteína por su unión al pocillo de plástico de una placa ELISA seguido por su posterior detección por anticuerpos específicos para la proteína a cuantificar o detectar.

30 La expresión "control por promotor" se refiere a una disposición de ADN en un vector de expresión en que un promotor está colocado 5' a un gen de interés y causa la transcripción de la secuencia de ADN en una molécula de ARNm. Esta molécula de ARNm después se traduce por la maquinaria de la célula hospedadora. Un especialista en la técnica está muy familiarizado con el significado de esta expresión.

35 Las expresiones "proteína A", "proteína G", y "proteína L" se refieren a proteínas bacterianas específicas que son capaces de unirse específicamente a moléculas de inmunoglobulina sin interaccionar con un sitio de unión a antígeno. La proteína A es un polipéptido aislado de *Staphylococcus aureus* que se une a la región Fc de moléculas de inmunoglobulina. La proteína G es una proteína de la pared celular bacteriana con afinidad por inmunoglobulina G (IgG), que se ha aislado de una cepa de estreptococos humanos de grupo G (G148). La proteína L es una
40 proteína de unión a cadena ligera de inmunoglobulina expresada por algunas cepas de la especie bacteriana anaeróbica *Peptostreptococcus magnus*.

La expresión "linfoma de células B" se refiere a un cáncer que surge en células del sistema linfático a partir de células B. Las células B son glóbulos blancos que se desarrollan a partir de la médula ósea y producen anticuerpos.
45 También se conocen como linfocitos B.

La expresión "linfoma de células B de grado bajo refractario" se refiere a un linfoma de células B de bajo grado que no ha respondido al tratamiento. La expresión "linfoma de células B de grado bajo" se refiere a un linfoma que tiende a crecer y propagarse lentamente, incluyendo linfoma celular escindido pequeño folicular. También se llaman
50 linfomas indolentes debido a su crecimiento lento.

La expresión "linfoma folicular de células B" se refiere a un tipo de linfoma no Hodgkin. Es un tipo indolente (de crecimiento lento) de linfoma.

55 Pueden hallarse definiciones y caracterizaciones adicionales de linfomas de bajo grado en internet en http://ritux-an.com/professional/clinical_information/class/index.html.

El término "aislar" referido a una proteína o polipéptido, se refiere a retirar un polipéptido o proteína de origen natural de su entorno celular normal o se refiere a retirar un polipéptido o proteína sintetizado en un sistema de expresión (tal como el sistema de baculovirus descrito en este documento) de otros componentes del sistema de expresión. Por tanto, la secuencia polipeptídica puede estar en una solución libre de células o colocarse en un entorno celular diferente. El término no implica que la secuencia polipeptídica sea la única cadena aminoacídica presente, sino que está esencialmente libre (al menos aproximadamente un 90 - 95% pura) de material no basado en aminoácidos asociado de forma natural con la misma.
60
65

Mediante el uso del término "enriquecido" en referencia al polipéptido se entiende que la secuencia aminoacídica específica constituye una fracción significativamente mayor (2 a 5 veces) de las secuencias aminoacídicas totales presentes en las células o la solución de interés que en células normales o enfermas o en las células a partir de las cuales se obtiene la secuencia. Esto podría causar una persona por reducción preferencial en la cantidad de las secuencias aminoacídicas presentes, o por un aumento preferencial en la cantidad de la secuencia aminoacídica específica de interés, o por una combinación de las dos. Sin embargo, debe apreciarse que enriquecido no implica que no haya otras secuencias aminoacídicas presentes, sólo que la cantidad relativa de la secuencia de interés se ha aumentado significativamente. El término significativo se usa en este documento para indicar que el nivel de aumento es útil para la persona que hace dicho aumento, y generalmente indica un aumento relativo a otras secuencias aminoacídicas de aproximadamente al menos 2 veces, más preferiblemente al menos 5 a 10 veces o incluso más. El término tampoco implica que no haya secuencias aminoacídicas de otras fuentes. La otra fuente de secuencias aminoacídicas puede, por ejemplo, comprender una secuencia aminoacídica codificada por un genoma de levadura o bacteriano, o un vector de clonación tal como pUC19. En realizaciones preferidas, la secuencia aminoacídica es una proteína quimérica descrita anteriormente. Se entiende que el término cubre solamente aquellas situaciones en que ha intervenido el hombre para aumentar la proporción de la secuencia aminoacídica deseada.

También es ventajoso para algunos propósitos que la secuencia aminoacídica esté en forma purificada. El término "purificado" en referencia a un polipéptido no requiere pureza absoluta (tal como una preparación homogénea); en su lugar, representa una indicación de que la secuencia es relativamente más pura que en el entorno natural. En comparación con el nivel natural este nivel debe ser al menos 2 a 5 veces mayor (por ejemplo, en términos de mg/ml). Se contempla expresamente la purificación de al menos de un orden de magnitud, preferiblemente dos o tres órdenes, y más preferiblemente cuatro o cinco órdenes de magnitud. La sustancia está preferiblemente libre de contaminación a un nivel funcionalmente significativo, por ejemplo un 90%, 85%, o 99% puro.

La expresión "unido de forma funcional" se refiere a una disposición de ADN en la que una región de control, tal como un promotor o potenciador, está unida a un gen de ADN de interés conectado de modo que provoque su transcripción, y por tanto permita su traducción. La expresión "unido de forma funcional" también puede referirse a una secuencia de ADN que codifica una señal de procesamiento, tal como una secuencia señal secretora, conectada a un gen que codifica un polipéptido para formar una única fase de lectura abierta. Después de la transcripción y la traducción, la secuencia señal secretora tiene el potencial de provocar la exportación del polipéptido traducido. Un especialista en la técnica está familiarizado con el significado de esta expresión.

Derivados funcionales de proteínas quiméricas útiles

En este documento también se proporcionan derivados funcionales de un polipéptido o ácido nucleico de la invención. Por "derivado funcional" se entiende un "derivado químico", "fragmento" o "variante" del polipéptido o ácido nucleico de la invención, según se definen estos términos a continuación. Un derivado funcional retiene al menos una parte de la función de la proteína, por ejemplo, reactividad con un anticuerpo específico para la proteína o la actividad de unión mediada a través de dominios no catalíticos, lo que permite su utilidad de acuerdo con la presente invención. Es bien sabido en la técnica que debido a la degeneración del código genético, numerosas secuencias de ácido nucleico diferentes pueden codificar la misma secuencia de aminoácidos. Igualmente, también es bien sabido en la técnica que pueden hacerse cambios conservativos en el aminoácido para llegar a una proteína o polipéptido que retenga la funcionalidad del original. En ambos casos, se pretende que todas las permutaciones queden cubiertas por esta descripción.

Se incluyen dentro del alcance de esta invención los equivalentes funcionales de las moléculas de ácido nucleico aisladas descritas en este documento. La degeneración del código genético permite la sustitución de ciertos codones por otros codones que especifican el mismo aminoácido y por tanto darían lugar a la misma proteína. La secuencia de ácido nucleico puede variar sustancialmente ya que, con la excepción de la metionina y el triptófano, los aminoácidos conocidos pueden codificarse por más de un codón. Por tanto, todo o partes de los genes de la invención podrían sintetizarse para dar una secuencia de ácido nucleico significativamente diferente de una secuencia que se halla en la naturaleza. La secuencia de aminoácidos codificada de los mismos, sin embargo, se conservaría.

Un "derivado químico" del complejo contiene restos químicos adicionales que normalmente no son parte de la proteína. Se incluyen modificaciones covalentes de la proteína o péptidos dentro del alcance de esta invención. Dichas modificaciones pueden introducirse en la molécula haciendo reaccionar los restos aminoacídicos diana del péptido con un agente orgánico de derivatización que sea capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o restos terminales, como se describe a continuación. También puede constar de carbohidratos de unión a la proteína además de los carbohidratos normales unidos por el sistema de expresión de baculovirus de la invención.

Más habitualmente se hacen reaccionar restos cisteinilo con α -haloacetatos (y las aminas correspondientes), tales como ácido cloroacético o cloroacetamida, para dar derivados carboximetilo o carboxiamidometilo. Los restos cisteinilo también se derivatizan por reacción con bromotrifluoracetona, fosfato de cloroacetilo, N-alquilmaleimidas, 3-nitro-2-piridil disulfuro, metil 2-piridil disulfuro, p-cloromercuribenzoato, 2-cloromercuri-4-nitrofenol, o cloro-7-

nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol.

Los restos histidilo se derivatizan por reacción con dietilprocarbonato a pH 5,5-7,0 porque este agente es relativamente específico de la cadena lateral histidilo. El bromuro de parabromofenacilo también es útil; la reacción se realiza preferiblemente en cacodilato sódico 0,1 M a pH 6,0.

Los restos lisinilo y amino terminales se hacen reaccionar con ácido succínico u otros ácidos carboxílicos anhídridos. La derivatización con estos agentes tiene el efecto de invertir la carga de los restos lisinilo. Otros reactivos adecuados para derivatizar restos que contienen amina primaria incluyen imidoésteres tales como picolinimidato de metilo; fosfato de piridoxal; piridoxal; clorobomhidruo; ácido trinitrobencenosulfónico; O-metilisourea; 2,4 pentanodiona; y la reacción con glioxilato catalizada con transaminasa.

Los restos arginilo se modifican por reacción con uno o varios reactivos convencionales, entre ellos fenilglioxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona, y ninhidrina. La derivatización de restos arginina requiere que la reacción se realice en condiciones alcalinas a causa del elevado pK_a del grupo funcional guanidina. Además, estos reactivos pueden reaccionar con los grupos de lisina así como el grupo α -amino de arginina.

Los restos tirosilo son dianas bien conocidas de modificación para la introducción de marcadores espectrales por reacción con compuestos aromáticos diazonio o tetranitrometano. Más habitualmente, se usan N-acetilimidizol y tetranitrometano para formar especies O-acetil tirosilo y derivados 3-nitro, respectivamente.

Los grupos laterales carboxilo (aspartilo o glutamilo) se modifican selectivamente por reacción con carbodiimida ($R'-N-C-N-R'$) tal como 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil(4-etil)carbodiimida o 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil)carbodiimida. Además, los restos aspartilo y glutamilo se convierten en restos asparaginilo y glutaminilo por reacción con iones amonio.

Los restos glutaminilo y asparaginilo se desamidán frecuentemente en los restos glutamilo y aspartilo correspondientes. Como alternativa, estos restos se desamidán en condiciones levemente ácidas. Cualquier formar de estos restos está dentro del alcance de esta invención.

Otras modificaciones incluyen la glucosilación in vitro de polipéptidos o proteínas.

La derivatización con agentes bifuncionales es útil, por ejemplo, para la reticulación de péptidos componentes de la proteína entre sí o con otras proteínas en un complejo a una matriz de soporte insoluble en agua o a otros vehículos macromoleculares. Los agentes de reticulación habitualmente usados incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo ésteres de disuccinimidilo tales como 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato), y maleimidias bifuncionales tales como bis-N-maleimido-1,8-octano. Los agentes de derivatización tales como ditiolpropioimidato de metil-3-[p-azidofenilo] producen intermedios fotoactivables que son capaces de formar entrecruzamientos en presencia de luz. Como alternativa, se emplean matrices reactiva insolubles en agua tales como carbohidratos activados con bromuro de cianógeno y los sustratos reactivos descritos en las patentes de Estados Unidos Nº 3.969.287; 3.691.016; 4.195.128; 4.247.642; 4.229.537; y 4.330.440 para la inmovilización de proteínas.

Otras modificaciones incluyen hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de restos serilo o treonilo, mutilación de los grupos α -amino de cadenas laterales de lisina, arginina, e histidina (Creighton, T.E., *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pág. 79-86, 1983), acetilación de la amina N-terminal y, en algunos casos, amidación de los grupos carboxilo C-terminales.

Dichos restos derivatizados pueden mejorar la estabilidad, solubilidad, absorción, semi-vida biológica, y similares. Los restos pueden eliminar o atenuar, como alternativa, cualquier efectos secundario indeseable del complejo proteico y similares. Los restos capaces de mediar dichos efectos se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990).

Un derivado funcional de una proteína con restos aminoácidos delecionados, insertados y/o sustituidos puede prepararse usando técnicas convencionales bien conocidas para los especialistas en la técnica. Por ejemplo, los componentes modificados de los derivados funcionales pueden producirse usando técnicas de mutagénesis dirigida al sitio (como se ejemplifica por Adelman et al., *DNA* 2:183, 1983) en las que se modifican nucleótidos en el ADN que codifica la secuencia de modo que se modifica la una secuencia codificante modificada, y después de ello expresando este ADN recombinante en una célula hospedadora procariota o eucariota, usando técnicas tales como las descritas anteriormente. Como alternativa, pueden prepararse convenientemente proteínas con deleciones, inserciones y/o sustituciones de aminoácidos por síntesis química directa, usando métodos bien conocidos en la técnica. Los derivados funcionales de las proteínas típicamente muestran la misma actividad biológica cualitativa que las proteínas nativas.

Usos de las proteínas quiméricas

Una cantidad eficaz de proteína quimérica se suministra de acuerdo con la invención. "Cantidad eficaz" se refiere a una cantidad que provoca que se produzca la respuesta biológica deseada. Lo que constituye dicha cantidad variará, y depende de una diversidad de factores, incluyendo la proteína quimérica particular, la respuesta biológica deseada a provocar, la formulación de la proteína quimérica, la edad, peso, género, y salud del organismo a tratar, el régimen de dosificación, la afección o enfermedad a tratar o prevenir, etc.

Las proteínas quiméricas descritas en este documento pueden administrarse en composiciones farmacéuticas donde se mezclan con otros ingredientes activos, como en terapia de combinación, o vehículos o excipientes adecuados. Las técnicas de formulación y administración de las proteínas quiméricas pueden hallarse en "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición.

1. Vías de administración

Las vías adecuadas de administración pueden incluir, por ejemplo, administración oral, rectal, transmucosa, o intestinal; suministro parenteral, incluyendo inyecciones intramusculares, subcutáneas, intravenosas, intramedulares, así como inyecciones intratecales, intraventriculares directas, intraperitoneales, intranasales, o intraoculares. Un especialista en la técnica entenderá las diversas modificaciones que se harían para adaptar la composición a la vía particular de administración.

2. Composición/formación

Las composiciones farmacéuticas pueden fabricarse de un modo que en sí mismo es conocido, por ejemplo, mediante procesos convencionales de mezcla, disolución, granulación, formación de grageas, levigación, emulsión, encapsulado, inmovilización o liofilización.

Las composiciones farmacéuticas para su uso de acuerdo con la presente invención, por tanto, pueden formularse de un modo convencional usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables, comprendiendo excipientes y auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. La formulación apropiada es dependiente de la vía de administración elegida.

Para inyección, los agentes de la invención pueden formularse en soluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank, solución de Ringer, o tampón salino fisiológico. Para administración transmucosa, se usan en la formulación penetrantes apropiados para la barrera a penetrar. Dichos penetrantes son generalmente conocidos en la técnica.

Para administración oral, los compuestos pueden formularse fácilmente combinando los compuestos activos con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Dichos vehículos posibilitan que los compuestos de la invención se formen en forma de comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas, suspensiones y similares, para ingesta oral por un paciente a tratar. Los vehículos adecuados incluyen excipientes tales como cargas tales como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol, o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, y/o polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, pueden añadirse agentes disgregantes, tales como polivinilpirrolidona reticulada, goma de agar, o ácido alginico o una sal del mismo tal como alginato sódico.

Los núcleos de gragea se proporcionan con recubrimientos adecuados. Para este propósito, pueden usarse soluciones concentradas de azúcar, que pueden contener opcionalmente goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel carbopol, polietilenglicol, y/o dióxido de titanio, soluciones de laca, y disolventes orgánicos o mezclas de disolventes adecuados. Pueden añadirse colorantes o pigmentos a los comprimidos o recubrimientos de gragea para la identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuesto activo.

Las preparaciones farmacéuticas que pueden usarse de forma oral incluyen cápsulas de ajuste por presión hechas de gelatina, así como cápsulas selladas blandas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste por presión pueden contener los ingredientes activos en mezcla con una carga tal como lactosa, aglutinantes tales como almidones, y/o lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En cápsulas blandas, los compuestos activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida, o polietilenglicoles líquidos. Además, pueden añadirse estabilizantes. Todas las formulaciones para administración oral deben estar en dosificaciones adecuadas para dicha administración.

Para administración bucal, las composiciones pueden adoptar la forma de comprimidos o pastillas formuladas de un modo convencional.

Para administración por inhalación, los compuestos para su uso de acuerdo con la presente invención se suministran convenientemente en forma de una presentación de pulverización en aerosol desde envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para su uso en un inhalador o insuflador pueden formularse conteniendo una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

Los compuestos pueden formularse para administración parenteral por inyección, por ejemplo, por inyección en embolada o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes multidosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden adoptar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulaciones tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

Las formulaciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de los compuestos activos en forma soluble en agua. Además, las suspensiones de los compuestos activos pueden prepararse en forma de suspensiones oleosas de inyección apropiadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Las suspensiones acuosas de inyección pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol, o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes adecuados o agentes que aumentan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

Como alternativa, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso.

Además de las formulaciones descritas previamente, los compuestos también pueden formularse en forma de una preparación de depósito. Dichas formulaciones de acción larga pueden administrarse por implante (por ejemplo subcutáneo o intramuscular) o por inyección intramuscular. Por tanto, por ejemplo, los compuestos pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, en forma de una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados moderadamente solubles, por ejemplo, como una sal moderadamente soluble.

Un vehículo farmacéutico para los compuestos hidrófobos de la invención es un sistema codisolvente que comprende alcohol bencílico, un tensioactivo no polar, un polímero orgánico miscible en agua, y una fase acuosa. El sistema codisolvente puede ser el sistema codisolvente VPD. VPD es una solución del 3% p/v de alcohol bencílico, el 8% p/v del tensioactivo no polar polisorbato 80, y el 65% p/v de polietilenglicol 300, compensado en volumen en etanol absoluto. El sistema codisolvente VPD (VPD:D5W) consta de VPD diluido 1:1 con una solución al 5% de dextrosa en agua. Este sistema codisolvente disuelve bien compuestos hidrófobos, y en sí mismo produce baja toxicidad tras administración sistémica. Naturalmente, las proporciones de un sistema codisolvente pueden variarse considerablemente sin destruir sus características de solubilidad y toxicidad. Además, la identidad de los componentes codisolventes puede variarse: por ejemplo, pueden usarse otros tensioactivos no polares de baja toxicidad en lugar de polisorbato 80; el tamaño de fracción de polietilenglicol puede variarse, otros polímeros biocompatibles pueden remplazar el polietilenglicol, por ejemplo, polivinilpirrolidona; y otros azúcares o polisacáridos pueden sustituir la dextrosa.

Como alternativa, pueden emplearse otros sistemas de suministro para las composiciones. Los liposomas y emulsiones son ejemplos bien conocidos de vehículos de suministro o vehículos para fármacos hidrófobos. También pueden emplearse ciertos disolventes orgánicos tales como dimetilsulfóxido, aunque habitualmente a costa de mayor toxicidad. Además, los compuestos pueden suministrarse usando un sistema de liberación sostenida, tal como matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contiene el agente terapéutico. Se han establecido diversos materiales de liberación sostenida y son bien conocidos para los especialistas en la técnica. Las cápsulas de liberación sostenida pueden, dependiendo de su naturaleza química, liberar los compuestos durante unas pocas semanas hasta más de 100 días. Dependiendo de la naturaleza química y la estabilidad biológica del reactivo terapéutico, pueden emplearse estrategias adicionales para la estabilización de proteínas.

Las composiciones farmacéuticas también pueden comprender vehículos o excipientes adecuados en fase sólida o de gel. Ejemplos de dichos vehículos o excipientes incluyen, aunque sin limitación, carbonato cálcico, fosfato cálcico, diversos azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina, y polímeros tales como polietilenglicoles.

Muchos de los compuestos de la invención pueden proporcionarse en forma de sales con contrapones farmacéuticamente compatibles. Las sales farmacéuticamente compatibles pueden formarse con muchos ácidos, incluyendo, aunque sin limitación, ácido clorhídrico, sulfúrico, acético, láctico, tartárico, málico, succínico, etc. Las sales tienden a ser más solubles en disolventes acuosos u otros disolventes protónicos que son las formas de base libre correspondientes.

3. Dosificación eficaz

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en la presente invención incluyen composiciones en las que los ingredientes activos están contenidos en una cantidad eficaz para conseguir su propósito pretendido. Más específicamente, una cantidad terapéuticamente eficaz significa una cantidad de compuesto eficaz para prevenir, aliviar o mejorar síntomas de la enfermedad o para o prolongar la supervivencia del sujeto que se está tratando. La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz pertenece a las capacidades de los especialistas en la técnica, especialmente a la luz de la descripción detallada proporcionada en este documento.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de los compuestos descritos en este documento pueden determinarse por procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la LD₅₀ (la dosis letal para el 50% de la población) y la ED₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La proporción de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la proporción entre la LD₅₀ y la ED₅₀. Se prefieren compuestos que muestran elevados índices terapéuticos. Los datos obtenidos de estos ensayos de cultivo celular y estudios en animales pueden usarse en la formulación de una gama de dosificaciones para su uso en seres humanos. La dosificación de dichos compuestos se encuentra preferiblemente dentro un intervalo de concentraciones en circulación que incluyen la ED₅₀ con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. La formulación exacta, la vía de administración y la dosificación pueden elegir las los médicos individualmente en vista del estado del paciente. (Véase por ejemplo, Fingl et al., "The Pharmacological Basis of Therapeutics," Cap. 1 pág.1, 1975).

La cantidad de dosificación y el intervalo pueden ajustarse individualmente para proporcionar niveles plasmáticos del resto activo que sean suficientes para mantener el efecto requerido, o la concentración mínima eficaz (MEC). La MEC variará para cada compuesto. Las dosificaciones necesarias para conseguir la MEC dependerán de las características individuales y la vía de administración. Sin embargo, pueden usarse ensayos de HPLC o bioensayos para determinar las concentraciones plasmáticas.

Los intervalos de dosificación también pueden determinarse usando el valor de MEC. Los compuestos deben administrarse usando un régimen que mantenga los niveles plasmáticos por encima de la MEC durante el 10-90% del tiempo, preferiblemente entre el 30-90% y mucho más preferiblemente entre el 50-90%.

En casos de administración local o captación selectiva, la concentración local eficaz del fármaco puede no estar relacionada con la concentración plasmática.

La cantidad de composición administrada dependerá, por supuesto, del sujeto que se esté tratando, el peso del sujeto, la gravedad de la afección, el modo de administración y el criterio del médico.

4. Envasado

Las composiciones pueden presentarse, si se desea, en un envase o dispositivo dispensador que puede contener una o más formas de dosificación unitarias que contienen el ingrediente activo. El envase puede comprender, por ejemplo, láminas metálicas o de plástico, tal como un envase blíster. El envase o dispositivo dispensador puede estar acompañado por instrucciones para su administración. El envase o dispensador también puede estar acompañado de un aviso asociado con el recipiente en forma prescrita por una agencia gubernamental reguladora de la fabricación, uso, o venta de agentes farmacéuticos, reflejando dicho aviso la aprobación por parte de la agencia de la forma del polinucleótido para administración a seres humanos o administración veterinaria. Dicho aviso, por ejemplo, puede ser el etiquetado aprobado por la U.S. Food and Drug Administration para la prescripción de fármacos, o el prospecto del producto aprobado. Las composiciones que comprenden un compuesto de la invención formulados en un vehículo farmacéutico compatible también pueden prepararse, colocarse en un recipiente apropiado, y etiquetarse para el tratamiento de una afección indicada. Las afecciones adecuadas indicadas en la etiqueta pueden incluir el tratamiento de un tumor, el tratamiento de la artritis reumatoide, el tratamiento de la diabetes, y similares.

SECCIÓN EXPERIMENTAL

1. PROCESAMIENTO TISULAR PARA LA IDENTIFICACIÓN Y CLONACIÓN DEL IDIOTIPO (ID) DE LINFOMA NO HODGKIN:

Se hicieron biopsias de muestras tumorales de un ganglio linfático periférico según indicaciones clínicas en condiciones estériles y se usaron para generar proteínas de inmunoglobulina quiméricas recombinantes específicas del idiotipo del paciente. El material restante de la biopsia del ganglio linfático se almacenó en nitrógeno líquido en un banco celular de tejidos para su futuro uso.

a. Aislamiento de células: Se obtuvieron suspensiones celulares individuales de las biopsias de ganglio linfático del paciente empujando el tejido de linfoma biopsiado a través de un tamiz desechable de malla de acero de 0,38 mm mientras se sumergía en PBS estéril. Las células dispersadas se lavaron dos veces en PBS, después se

resuspendieron y se contaron. Se procesó una fracción del 10% de las células para la extracción del ARN total y las células restantes se archivaron en nitrógeno líquido después de resuspensión en medio de cultivo tisular RPMI 1640 que contenía suero bovino fetal al 30% (v/v) y DMSO al 10% (v/v). Todo el procesamiento de las muestras clínicas se realizó en una cabina de seguridad biológica.

- 5 b. Preparación de ARN total: El ARN total de las células homogenizadas del ganglio linfático se aisló usando el kit RNeasy (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. El ARN total se cuantificó por espectrofotometría.
- c. Síntesis de ADNc: Se usaron aproximadamente 2,0 µg de ARN total como molde para la síntesis la primera hebra de ADNc usando el sistema de preamplificación Superscript (GIBCO-BRL) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se usó el oligo(dT) proporcionado con el kit para cebar el ADNc.
- 10 d. Amplificación por PCR de genes que codifican las cadenas pesada y ligera de linfoma: Las cadenas tanto pesada como ligera de las inmunoglobulinas específicas de linfoma se identificaron del siguiente modo. Se combinaron alícuotas del ADNc monocatenario de linfoma con una serie de cebadores oligonucleotídicos con sentido específicos de la secuencia líder de V_H y V_L que representaban todas las subfamilias V_H , V_K , y V_λ conocidas, enumerados en la Tabla 1, apareados con los cebadores antisentido específicos de la región constante IgM, IgG, IgA, o Ig κ e Ig λ . Estas
- 15 muestras entonces se amplificaron por PCR y se analizaron por electroforesis en gel de agarosa. Se realizaron reacciones paralelas usando el ADNc preparado a partir de los linfocitos de la sangre periférica del paciente. Una comparación de los productos de PCR generados por cada par de cebadores derivados de muestras que contenían PBL normal o ADNc de biopsia de ganglio linfático conduciría a la identificación de la subfamilia V_H y V_K o V_λ candidata específica de tumor sobre-representada en el linfoma, y el isotipo de las cadenas pesada y ligera.
- 20 Los productos génicos candidatos de la región V de tumor después se escindieron, y se determinó su secuencia de ácido nucleico para ensayar la capacidad de clonación. Para cada paciente, se realizaron dos ensayos independientes a partir de las fracciones celulares de partida.
- Se amplificó un microlitro de la reacción de ADNc (que representa el 5% del volumen de reacción total de ADNc) durante 35 ciclos en 50 µl de volumen usando el kit HotStarTaq Master Mix (Qiagen). Condiciones de ciclo: 95°C 15
- 25 min., 65°C 4 min., 72°C 1 min., seguido de 94°C 1 min., 61°C 30 segundos, 72°C 1 min. durante 34 ciclos; y una etapa de extensión final a 72°C durante 7 min. Se analizó una alícuota de 10 µl de cada reacción por electroforesis en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio.

TABLA 1 Secuencias cebadoras usadas para la amplificación de las cadenas pesada y ligera de linfoma		
'(GA)' significa una G o una A, '(TC)' significa una T o una C.		
	NOMBRE DEL CEBADOR	SECUENCIA DEL CEBADOR (5' 3')
491	$V_{H1}L$	TCACCATGGACTGGACCTGGAG SEC ID N° 38
492	$V_{H2}L.1$	ACCATGGACATACTTTGTTCACGC SEC ID N° 39
493	$V_{H2}L.2$	ACCATGGACACACTTTGCTCCACGC SEC ID N° 40
494	$V_{H3}L.1$	ACCATGGAGTTTGGGCTGAGCTG SEC ID N° 41
495	$V_{H3}L.2$	ACCATGGAAGTGGGGCTCCGCTG SEC ID N° 42
496	$V_{H4}L$	AAGAACATGAAACACCTGTGGTTCTTC SEC ID N° 43
497	$V_{H5}L$	ATCATGGGGTCAACCGCCATCCT SEC ID N° 44
498	$V_{H6}L$	ACAATGTCTGTCTCCTTCCTCATC SEC ID N° 45
516	$V_{K1}L$	ACATGAGGGTCCCCGCTCAGC SEC ID N° 46
517	$V_{K2}L$	TCAGTCTCTGGGGCTGCTAATG SEC ID N° 47
515	$V_{K3}L$	CTTCCTCTGCTACTCTGGCTC SEC ID N° 48
518	$V_{K4}L$	GCAGACCCAGGTCTTCATTTCTC SEC ID N° 49
519	$V_{K5}L$	CCAGGTTACCTCCTCAGCTTC SEC ID N° 50
520	$V_{K6}L$	GGTTTCTGCTGCTCTGGGTTCC SEC ID N° 51
522	$V_{\lambda 1}L$	TCACTG(TC)(GA)CAGGGTCTGGGC SEC ID N° 52
523	$V_{\lambda 2}L$	ACTCAGG(GA)CACAGG(GA)TCCTGG SEC ID N° 53
524	$V_{\lambda 3}L.1$	TTGCTTACTGCACAGGATCCGTG SEC ID N° 54
525	$V_{\lambda 3}L.2$	CTTGCTCACTTTACAGTTCTGTG SEC ID N° 55
526	$V_{\lambda 3}L.3$	CTCACTCTTTCATAGGTTCTGTG SEC ID N° 56
527	$V_{\lambda 3}L.4$	TCAACCTCTACACAGGCTCTATTG SEC ID N° 57
528	$V_{\lambda 3}L.5$	CTCACTCTCTGCACAG(GT)CTCTG(AT)G SEC ID N° 58

TABLA 1 Secuencias cebadoras usadas para la amplificación de las cadenas pesada y ligera de linfoma		
'(GA)' significa una G o una A, '(TC)' significa una T o una C.		
529	V _{λ4} L.1	CATTTTCTCCACAGGTCTCTGTGC SEC ID Nº 59
530	V _{λ4} L.2	CCTCCACTG(GC)ACAGGGTCTCTC SEC ID Nº 60
531	V _{λ5} L	CTCTCACTGCACAGGTTCCCTC SEC ID Nº 61
532	V _{λ6} L	CGCTCACTGCACAGGTTCTTGG SEC ID Nº 62
533	V _{λ7} L	CTTGCTGCCCAGGGTCCAATTC SEC ID Nº 63
534	V _{λ8} L	TGCTTATGGATCAGGAGTGGATTG SEC ID Nº 64
535	V _{λ9} L	CAGTCTCCTCACAGGGTCCCTC SEC ID Nº 65
536	V _{λ10} L	TCACTCACTCTGCAGTGTCACTG SEC ID Nº 66
	IgG Constante-E	CTGAGTTCCACGACACCGTCAC SEC ID Nº 69
	IgM Constante-E	GGGAATTCTCACAGGAGACGAGG SEC ID Nº 70
	C _κ -E	TTGGAGGGCGTTATCCACCTTC SEC ID Nº 71
	C _λ -E	GAAGTCACTTATGAGACACACCAG SEC ID Nº 72
	IgG Constante-1	GGAAGTAGTCCTTGACCAGGCAG SEC ID Nº 73
	IgM Constante-1	GGGAAAAGGGTTGGGCCCGATGCAC SEC ID Nº 74
	C _κ -I	GGGAAAAGGGTTGGGCCCGATGCAC SEC ID Nº 75
	C _λ -I	GGAACAGAGTGACACTGGGTGCAGCCTTGGGCTG SEC ID Nº 76
	C _λ corriente abajo	TGCCGTGGCAGGAGGTATTTTATTATGACTGTCT CCTTGCTATTATGAACATTCTGTAGGGGCCA SEC ID Nº 77
	C _λ - 5'	GTCAGCCCCAAGGCTGCACCCAGTGTCACTCTGTTCC SEC ID Nº 78
	C _λ - 3'	CGTATCAAGCTTTTACTATGAACATTCTGTAGGGGC CAC SEC ID Nº 79
	λ-relleno 1	CCTTTGATAACACCCA SEC ID Nº 80
	λ-relleno 1'	GTGTTATCAAAGG SEC ID Nº 81
	γ-relleno 1	5'-CTAGTTTGATAAGGGCC-3' SEC ID Nº 82
	γ-relleno 1'	5'-CTTATCAAA-3' SEC ID Nº 83
	κ-relleno 1	5'-CCTTTGATAACACCAA-3' SEC ID Nº 84
	κ-relleno 1'	5'- -3' SEC ID Nº 85

- e. Clonación y secuenciación de productos de PCR: Los productos de PCR de las reacciones que se determinó que contenían las secuencias variables específicas de tumor para las cadenas pesada y ligera se clonaron directamente en el plásmido pCR2.1-TOPO según las recomendaciones del fabricante, y se introdujeron en células Top10 competentes de *E. coli* (Invitrogen). Se prepararon veinticuatro plásmidos de ADN miniprep a partir de colonias bacterianas resistentes a carbenicilina usando el kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen), y se cuantificaron por espectrofotometría. Se secuenciaron doscientos ng de cada plásmido usando el kit Cy5/Cy5.5 Dye Primer Cycle Sequencing (Visible Genetics). Después de completarse las reacciones de secuenciación, las muestras se sometieron a electroforesis en el OpenGene Automated DNA Sequencing System y los datos se procesaron con el paquete de software GeneObjects (Visible Genetics). Se realizaron análisis adicionales incluyendo alineaciones de secuencia usando el software de análisis de ADN SEQUENCHER Versión 4.1.2 (GENE Codes Corp.). Una secuencia derivada de la región V podía considerarse específica de tumor si estaba presente en el 75% de las muestras, por ejemplo, si 18 o más de las 24 forman un grupo consenso cuando se analizan usando el software anterior utilizando los parámetros por defecto. Se compararían dos muestras de biopsia independientes cuando se dispusiera de ellas.

f. Síntesis de ADNc y generación de productos 5'RACE: Debido a la existencia de mutaciones en las secuencias V_H y V_L, a veces no es posible identificar los reordenamientos de inmunoglobulina específicos de tumor. Como alternativa a la estrategia de PCR específica de secuencia *supra*, puede emplearse una estrategia de 5' RACE PCR

para identificar los reordenamientos de inmunoglobulina (Ig) específicos de tumor. Todas las etapas para la síntesis de la primera hebra de ADNc para la generación de productos de PCR específicos de Ig se realizan de acuerdo con las directrices del fabricante (sistema 5' RACE para la rápida amplificación de extremos de ADNc, versión 2.0, Gibco BRL), con ligeras modificaciones. Se usan aproximadamente 2,5 µg de ARN total como molde para cada síntesis de la primera hebra de ADNc en presencia de cebadores antisentido específicos complementarios a la región constante de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina utilizada por la población de células B de interés (SEC ID N° 69 para IgG, SEC ID N° 70 para IgM, SEC ID N° 71 para C_κ, y SEC ID N° 72 para C_λ). Las reacciones de ADNc se purifican sobre cartuchos de centrifugación GlassMAX, generando un volumen final de 50 µl cada una. Una alícuota de 10 µl de cada ADNc purificado se marca con una cola oligo(dC) con desoxinucleotidil transferasa terminal en un volumen de 25 µl, generando los moldes a usar para posteriores reacciones de PCR. La configuración de PCR utiliza un cebador corriente arriba que contiene una huella poli(G) proporcionada por el fabricante y un cebador antisentido específico de Ig interior al usado para la síntesis de primera hebra de ADNc (SEC ID N° 73 para IgG, SEC ID N° 74 para IgM, SEC ID N° 75 para C_κ, y SEC ID N° 76 para C_λ). Se amplifican cinco µl de molde en un volumen de 50 µl del siguiente modo: 95°C durante 15 min., 55°C durante 4 min., 72°C durante 1 min., seguido de 94°C durante 1 min., 55°C durante 30 segundos, 72°C durante 1 min. durante 34 ciclos, y una etapa de extensión final a 72°C durante 7 min. Los productos finales de PCR se separan por electroforesis en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio y la banda del tamaño apropiado (-500-600 pb) se aísla, se clona en el plásmido pCR2.1-TOPO como se ha descrito en 1e, *supra*.

2. CONSTRUCCIÓN DE LOS VECTORES EXPRESIÓN DE BACULOVIRUS PTRABACHULC_κHC_{γ1} Y PTRABACHULC_λHC_{γ1}

a. Clonación de secuencias señal secretoras en p2Bac: El vector base para las construcciones pTRABachULC_κHC_{γ1} y pTRABachULC_λHC_{γ1} fue p2Bac (Fig. 2, SEC ID N° 5, Invitrogen, Carlsbad, CA). Se clonaron dos secuencias señal secretoras en este vector base, y se creó el primer vector de expresión de baculovirus intermedio p2BacM. En general, el vector p2Bac se modificó primero utilizando oligonucleótidos complementarios que codificaban el dominio amino terminal de la secuencia señal secretora de la melitina de abeja melífera posicionado para estar bajo el control transcripcional del promotor baculoviral P10 de AcNPV. Para la clonación de la secuencia de melitina, se digirieron 2 µg de p2Bac con Not I y Spe I durante 4 horas a 37°C. El vector lineal se purificó después de electroforesis a través de un gel de agarosa al 1% usando resina Qiaex II (Qiagen, Chatsworth, CA). El ADN purificado después se eluyó con 50 µl agua y se determinó la concentración de ADN. Se mezcló un µg de cada uno de los cebadores Me1S/N (SEC ID N° 15) y MeIN/S (SEC ID N° 16) en 10 µl de tampón de digestión M (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN), y se calentó a 70°C durante 5 min., después se enfrió hasta temperatura ambiente para hibridar los cebadores complementarios. Se digirió el diez por ciento de los cebadores hibridados en 20 µl de reacción con Not I y Spe I durante 4 horas a 37°C, y los cebadores digeridos se purificaron después de electroforesis a través de un gel de poliácridamida al 15% con resina Qiaex H, y se determinó la concentración del ADN para los cebadores hibridados. Los ADN del vector p2Bac y el fragmento de melitina hibridado se ligaron a una proporción vector a inserto 1:10. El producto de ligamiento se transformó usando XL1-Blue *E. coli* competentes (Stratagene, San Diego, CA) y se sembró en una placa de agar con LB-carbenicilina para el cultivo durante una noche a 37°C. Se prepararon colonias miniprep mediante protocolos convencionales, y se secuenciaron los plásmidos para comprobar la construcción. El vector resultante p2BacM contenía la secuencia señal secretora de melitina. El vector p2BacM se modificó adicionalmente de forma similar para que codificara el dominio amino terminal de la secuencia señal secretora de la fosfatasa alcalina placentaria humana bajo el control transcripcional del promotor de la polihedrina de AcNPV, creando un segundo vector de expresión de baculovirus intermedio p2BacMA. El procedimiento usado para introducir la secuencia de la fosfatasa alcalina introduce fue en líneas generales clonación el siguiente modo: se digirieron 2 µg del plásmido p2BacM con Bam HI y Eco RI, el vector lineal se purificó en gel a partir de gel de agarosa con resina Qiaex II y se eluyó en 50 µl de agua. Se determinó la concentración de ADN del vector. Se mezclaron un µg de cada uno de los cebadores APB/E (SEC ID N° 17) y APE/B (SEC ID N° 18) en 10 µl de tampón de digestión M, y se calentaron hasta 70°C durante 5 min. y después se enfriaron hasta temperatura ambiente para hibridar los cebadores complementarios. Se digirió el diez por ciento de los cebadores hibridados en 20 µl de reacción con Bam HI y Eco RI durante 4 horas a 37°C. Los cebadores digeridos después se purificaron a partir del gel de poliácridamida al 15% con resina Qiaex II. También se determinó la concentración de ADN de los cebadores digeridos. Entonces se ligaron el vector p2BacM lineal y el fragmento de fosfatasa alcalina a una proporción vector a inserto 1:10, y el producto de ligamiento se transformó usando XL1-Blue *E. coli* competentes y se sembró en una placa de agar con LB-carbenicilina para cultivo durante una noche a 37°C. Se prepararon colonias miniprep y los plásmidos se secuenciaron para comprobar la construcción. El vector intermedio p2BacMA resultante contendría una secuencia señal secretora para una fosfatasa alcalina placentaria humana. El plásmido p2BacMA se transformó adicionalmente en la cepa SCS-110 *E. coli* (Stratagene) que carece de actividad *dcm* metilasa para la posterior clonación de la región constante κ en el sitio Stu I sensible a metilo.

b. Amplificación y clonación de las regiones constantes de las cadenas IgG_{γ1} y ligera: Los dominios constante kappa (κ) humano y constante IgG_{γ1} humano del anticuerpo monoclonal humano 9F12 se amplificaron por PCR a partir del ARN extraído de la línea celular humana 9F12 (ATCC N° HB8177). La región constante κ se clonó

tras la secuencia señal de la fosfatasa alcalina. La región constante IgG_{γ1} se insertó corriente abajo de la secuencia señal secretora de la melitina creando de este modo el vector (pTRABacHuLC_κHC_{γ1}, Fig. 5a). Se produjo un vector que contenía la región constante de cadena ligera lambda (λ) humana (pTRABacHuLC_λHC_{γ1}, Fig. 5b) remplazando la región constante de cadena ligera κ con una región constante de cadena ligera λ. Las cadenas ligeras se aislaron por RT-PCR a partir de una preparación de ARN celular de leucemia linfocítica crónica. La descripción detallada de los procedimientos de clonación es la siguiente.

c. Amplificación de los fragmentos de región constante 9F12 κ e IgG_{γ1}: Se extrajo el ARN total de células 9F12 (ATCC N° BB8177) usando el kit RNeasy (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. Se sintetizó un ADNc monocatenario usando la transcriptasa inversa Superscript (GIBCO BRL, Rockville, MD) con cebadores oligo(dT). Una vigésima parte del ADNc monocatenario sintetizado se amplificó en 100 μl de reacciones de PCR con Expand High Fidelity Taq (Roche) usando oligonucleótidos específicos de κ e IgG_{γ1} (SEC ID N° 21 más SEC ID N° 22 y SEC ID N° 19 más SEC ID N° 20, respectivamente). Los fragmentos amplificados de la inmunoglobulina 9F12 se purificaron de agarosa SeaKem al 1,5% con resina Qiaex II y se eluyeron con 50 μl de agua. Se determinaron las concentraciones de ADN para los fragmentos. Los fragmentos purificados de la inmunoglobulina 9F12 se ligaron por separado en el vector de clonación por PCR TA-II (Invitrogen). Los productos de ligamiento se transformaron usando XLI-Blue *E. coli* competentes y se sembraron en una placa de agar con LB-carbenicilina para cultivo durante una noche a 37°C. Se prepararon colonias miniprep y se secuenció el ADN plasmídico.

d. Inserción de la región constante 9F12 κ en el vector de expresión: Para el dominio constante κ, se digirieron 5 μg de ADN plasmídico que contenía una región constante κ y 2 μg de ADN para el vector p2BacMA purificado de SCS110 *E. coli* con Stu I y Hind III. Se purificaron en gel un fragmento de 320 pb que contenía la región constante κ y un fragmento de 7,1 kb que contenía el vector p2BacMA con Quiex II y se eluyeron en 50 μl de agua. Se determinaron las concentraciones de ADN para ambos fragmentos. Los fragmentos purificados después se ligaron con el kit Rapid Ligation (Roche). Los productos de ligamiento se transformaron usando XLI-Blue *E. coli* competentes y se sembraron en una placa de agar con LB-carbenicilina para cultivo durante una noche a 37°C. Se prepararon colonias bacterianas miniprep y se secuenció el ADN recombinante para verificar la inserción de la región constante κ apropiada. El vector plasmídico resultante fue pTRABacLC_κ.

e. Adición del dominio constante IgG_{γ1} al vector: El dominio constante IgG_{γ1} se añadió al vector digiriendo primero 5 μg de ADN plasmídico que contenía la región constante IgG_{γ1} y 2 μg de ADN plasmídico para el vector pTRABacLC_κ con Spe I y Xba I. Se purificaron en gel un fragmento de 1 kb de la región constante IgG_{γ1} y un fragmento de 7,4 kb del vector pTRABacLC_κ a partir de lechos de agarosa con Quiex II y se eluyeron en 50 μl de agua. Se determinaron las concentraciones de ADN para ambos fragmentos. Los fragmentos purificados después se ligaron con el kit Rapid Ligation (Roche). Los productos de ligamiento se transformaron usando XLI-Blue *E. coli* competentes y se sembraron en una placa de agar con LB-carbenicilina para cultivo durante una noche a 37°C. Se prepararon colonias miniprep y se determinaron el ligamiento y la orientación de la inserción IgG_{γ1} por análisis de restricción y secuenciación de los sitios de restricción. El vector recombinante resultante fue pTRABacHuLC_κHC_{γ1}.

Este plásmido, pTRABacHuLC_κHC_{γ1}, se refinó adicionalmente para añadirle codones de parada de la traducción entre la secuencia secretora de la melitina, y la secuencia de la región C_{γ1} y la secuencia secretora de la fosfatasa alcalina y la secuencia de la región C_κ, respectivamente. Para conseguir estas modificaciones, se linealizó el vector pTRABacHuLC_κHC_{γ1} después de digestión con Spe I + Apa I. El vector linealizado después se ligó con los cebadores complementarios hibridados γ1-relleno 1 (SEC ID N° 82) y γ1-relleno 1' (SEC ID N° 83) para introducir los codones de parada en fase. El vector resultante de esta modificación se linealizó posteriormente después de digestión con Stu I (AGGCCT) + Dra III (CACnnnGTG) y después se ligó con los cebadores complementarios hibridados κ-relleno 1 (SEC ID N° 84) y κ-relleno 1' (SEC ID N° 81) para introducir los codones de parada en fase. El efecto neto de estas modificaciones se indica en las secuencias mostradas en las Figuras 6C y 6D, respectivamente. (Las secuencias añadidas están resaltadas por un doble subrayado y negrita.)

f. Adición de la región constante λ a los vectores: Se extrajo el ARN total de linfocitos de sangre periférica (PBL) purificada obtenida de un paciente con leucemia linfocítica crónica (CLL) que presentaba un idiотipo de cadena ligera λ usando el kit RNeasy (Qiagen).

Se usaron aproximadamente 2,0 μg de ARN total como molde para la síntesis de la primera hebra de ADNc usando el sistema de preamplificación Superscript (Gibco BRL) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se usó oligo(dT) para el cebado. Una vigésima parte del ADNc monocatenario sintetizado se amplificó en una reacción de PCR usando un cebador corriente arriba idéntico a una parte de la secuencia señal Vλ (SEC ID N° 54) y un cebador corriente abajo (SEC ID N° 77) complementario a los varios codones últimos de la región constante λ así como una parte de la región 3' no traducida. Los productos de PCR se clonaron en el vector pCRII (Invitrogen) y se secuenciaron para confirmar la identidad. Se eligió un plásmido que contenía la secuencia correcta de la región constante λ como molde para una segunda PCR. En esta reacción se utilizaron un oligonucleótido con sentido, Cλ-5' (SEC ID N° 78), que contenía un sitio de restricción Dra III diseñado, correspondiente a la secuencia en la región constante λ inmediatamente corriente abajo del Jλ y un cebador oligonucleotídico antisentido que contiene Hind III, Cλ-3' (SEC ID N° 79) que abarca el codón PARADA inmediatamente después de la región constante λ. El producto de PCR resultante se clonó en el vector pCR2.1-TOPO y se secuenció. Se liberó un fragmento que contenía la

secuencia de región constante λ tras la restricción con Hind III de algunos de los plásmidos, dependiendo de la orientación del inserto. Este fragmento de restricción se aisló en gel y se clonó en pTRABacHuLC $_{\kappa}$ HC $_{\gamma 1}$ (Figura 5A), tras la linealización después de digestión con Hind III, generando un plásmido intermedio que contenían ambas regiones constantes λ y κ . La restricción de este plásmido con Stu I y Dra III provocó la eliminación de las secuencias κ . Este plásmido linealizado después se ligó con los cebadores complementarios hibridados λ -relleno 1 (SEC ID N° 80) y λ -relleno 1' para generar la versión final de pTRABacHuLC $_{\lambda}$ HC $_{\gamma 1}$ (Figura 5B).

3. INSERCIÓN DE GENES PARA LAS REGIONES V_H Y/O V_L DE IDIOTIPO DERIVADAS DEL PACIENTE EN UN VECTOR DE EXPRESIÓN

Usando pTRABacHuLC $_{\kappa}$ HC $_{\gamma 1}$ o pTRABacHuLC $_{\lambda}$ HC $_{\gamma 1}$, fue posible insertar genes para cualquier región V_L que contuviera las secuencias únicas de clonación Stu I y Dra III entre la secuencia señal de la fosfatasa alcalina y la región constante κ o λ , y los genes para cualquier región V_H que contuviera las secuencias únicas de clonación Spe I y Apa I entre la secuencia señal secretora melitina y la región constante IgG $_{\gamma 1}$ (véase la Figura 5A y 5B). El vector de expresión resultante entonces pudo utilizarse para transducción en células de insecto de *Spodoptera frugiperda* (Sf-9) para producir brotes de baculovirus recombinante. El baculovirus recombinante después se amplificó en serie en células Sf-9 para producir una solución madre de baculovirus recombinante de elevado título. Esta solución madre de baculovirus recombinante de elevado título entonces se usó para infectar células de *Trichoplusia ni* (High-5) para la posterior producción de proteína IgG quimérica. Puede hallarse una lista de todos los cebadores oligonucleotídicos usados en la construcción de pTRABacHuLC $_{\kappa}$ HC $_{\gamma 1}$ o pTRABacHuLC $_{\lambda}$ HC $_{\gamma 1}$ en la Tabla 2.

Después de aislar las secuencias derivadas de tumor para las regiones V_H y/o V_L como se ha descrito anteriormente, se preparan los cebadores oligonucleotídicos que incluyen los 40 nucleótidos terminales del péptido líder de melitina (para clonación de la cadena pesada de Ig) (SEC ID N° 8 -CAGATCACTA GTTTTATGG TCGTGATACAT TTCTTACATC TATGCG), los 28 nucleótidos terminales del péptido líder de fosfatasa alcalina (para clonación de la cadena ligera de Ig) (SEC ID N° 9 - CTGAGTAGGC CTGAGGCTAC AGCTCTCCCT GGGC), y los primeros 21 a 24 nucleótidos de las proteínas respectivas de la región V_H o V_L. Se usaron cebadores oligonucleotídicos inversos de la región constante de cadena pesada o ligera (IgG: SEC ID N° 10 - GGAAGTAGTC CTTGACCAGG CAG; IgM: SEC ID N° 11-GGAAAAGGG TTGGGCCCGA TGCAC; Ig $_{\kappa}$: SEC ID N° 12 - GATGAAGACA CTTGGT-GCAG CCACAG; Ig $_{\lambda}$: SEC ID N° 13: GGAACAGAGT GACACTGGGT GCAGCCTTGG GCTG). Se usan los plásmidos recombinantes identificados previamente como poseedores de las secuencias clonales V_H o V_L como moldes para la segunda ronda de PCR. Las condiciones de ciclo fueron como se ha descrito *supra*.

Los moldes plasmídicos se combinaron con un cebador de región constante IgG $_{\gamma 1}$, IgM, Ig $_{\lambda}$, o Ig $_{\kappa}$ complementario a los aminoácidos codificantes de codones 141-149, 115-123, 108-119, y 109-117 respectivamente y el cebador de fusión apropiado del líder/región V. Por ejemplo, para un paciente, los cebadores usados fueron la SEC ID N° 67 para V_{H3} y la SEC ID N° 68 para V_{K3} (SEC ID N° 67: CAGATCACTA GTTTTATGG TCGTGATACAT TTCTTACATC TATGCGGAGA TGAAATTGGT GGAGTCTGGG; SEC ID N° 68: CTGAGTAGGC CTGAGGCTAC AGCTCTCCCT GGGCGAAGTT GTGTTGACTC AGTCTCC). Las condiciones de ciclo fueron como se ha descrito anteriormente.

a. Inserción de la región variable de cadena ligera en el vector de expresión: Se digirieron un producto V_L obtenido por PCR y 2 μ g del vector de casete correspondiente pTRABacHuLC $_{\kappa}$ HC $_{\gamma 1}$ o pTRABacHuLC $_{\lambda}$ HC $_{\gamma 1}$ con Stu I y Dra III. El fragmento de ADN de 350 pb de la región V_L obtenida del paciente y el fragmento de 8,4 kb para el vector lineal pTRABacHuLC $_{\kappa}$ HC $_{\gamma 1}$ o pTRABacHuLC $_{\lambda}$ HC $_{\gamma 1}$ se purificaron de lechos de gel de agarosa con resina Qiaex II y se eluyeron en 50 μ l de agua. Se determinaron las concentraciones de ADN para ambos fragmentos y después los fragmentos se ligaron usando el kit Rapid Ligation (Roche). Los productos de ligamiento se usaron para transformar XL1-Blue *E. coli* competentes que posteriormente se sembraron en una placa de agar con LB-carbenicilina para cultivo durante una noche a 37°C. Se prepararon colonias miniprep y los plásmidos de ADN recombinante se verificaron por análisis de restricción y secuenciación. El vector resultante se denominó pTRABac(NHL-V_L)C $_{\kappa}$ HC $_{\gamma 1}$ o pTRABac(NHL-V_L)LC $_{\lambda}$ HC $_{\gamma 1}$.

b. Inserción de la región variable de cadena pesada en el vector de expresión: Se digirieron un producto V_H obtenido por PCR y 2 μ g del vector de casete pTRABac(NHL-V_L)LC $_{\kappa}$ HC $_{\gamma 1}$ o pTRABac(NHL-V_L)LC $_{\lambda}$ HC $_{\gamma 1}$ con Spe I y Apa I. El fragmento de ADN de 350 pb de la región V_H obtenida del paciente y el fragmento de 8,8 kb para el vector lineal pTRABac(NHL-V_L)LC $_{\kappa}$ HC $_{\gamma 1}$ o pTRABac(NHL-V_L)LC $_{\lambda}$ HC $_{\gamma 1}$ se purificaron de lechos de gel de agarosa con resina Qiaex II y se eluyeron en 50 μ l de agua. Se determinaron las concentraciones de ADN para ambos fragmentos y después los fragmentos se ligaron usando el kit Rapid Ligation (Roche). Los productos de ligamiento se usaron para transformar XL1-Blue *E. coli* competentes que posteriormente se sembraron en una palca de agar con LB-carbenicilina para cultivo durante una noche a 37°C. Se prepararon colonias miniprep y los plásmidos de ADN recombinante se verificaron por análisis de restricción y secuenciación. El vector resultante se denominó pTRABac(NHL-V_L)LC $_{\kappa}$ (NHL-V_H)HC $_{\gamma 1}$, pTRABac(NHL-V_L)LC $_{\lambda}$ (NHL-V_H)HC $_{\gamma 1}$ y se le asigna un número de referencia correspondiente a un paciente, por ejemplo, FV8786-001.

TABLA 2. Secuencias cebadoras para la construcción de los vectores de transferencia de baculovirus pTRABacHuLC _κ HC _{γ1} y pTRABacHuLC _λ HC _{γ1} .	
NOMBRE DEL CEBADOR	SECUENCIA DEL CEBADOR (5' 3')
1. N-terminal de melitina (MeIS/N y MeIN/S)	ACTAGTGCAACGTTGACTAAGAATTTTCATGCGGCCGC (SEC ID N° 15) GCGGCCGCATGAAATTCTTAGTCAACGTTGCACTAGT (SEC ID N° 16)
2. N-terminal de fosfatasa alcalina placentaria humana (APB/E y APE/B)	GCGGATCCATGGTGGGA.CCCTGCATGCTGCTGCTGCTGCTGCTG CTAGGCCTggaattcc (SEC ID N° 17) GGAATTCAGGCCTAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCATGCAGGGT CCCACCATGGATCCGC (SEC ID N° 18)
3. Constante cadena pesada IgG _{γ1} : Corriente arriba	TGTGACTAGTATGTATCGGCCCATCGGTCTTCCCCCT (SEC ID N° 19)
Corriente abajo	TTTCTAGACTATTATTTACCCGGAGACAGGGAGAG (SEC ID N° 20)
4. Constante cadena ligera kappa: Corriente arriba	CTAGGCCTATGTATCACCAAGTGTCTTCATCTTCCCGC CATCT (SEC ID N° 21)
Corriente abajo	CCCAAGCTTCTATTAACACTCTCCCCTGTTGAAGCT (SEC ID N° 22)

4. Transfección de líneas celulares de insecto con vectores de expresión que contienen la región variable y producción de proteínas quiméricas recombinantes:

a. Cultivo de células de insecto: Se transfectaron dos líneas celulares de insecto establecidas (Sf9 y High-5) con vectores baculovirales modificados para producir las proteínas recombinantes quiméricas V_H/inmunoglobulina y/o V_L/inmunoglobulina. Todas las células de insecto se cultivaron a 28°C en medio de insecto sin suero ESF-921 (Expression Systems LLP) que contenía 50 µg/l de gentamicina en matraces de agitación ventilados estériles desechables (Coming), a 140-150 rpm, con no más del 50% del volumen de líquido. Las células se pasaron cada 2 a 3 días. Las células congeladas se descongelaron (medio de criopreservación: 10% de DMSO, 40% de medio ESF-921, 50% de medio condicionado High-5) a partir de un banco celular de trabajo para lote de producto o cada seis semanas para asegurar una solución madre continua de células de crecimiento exponencial que no fuera retráctil a infección por baculovirus.

b. Transfección de células Sf9 y ensayo de recombinación: Los vectores de expresión de baculovirus modificados que contenían genes para las regiones V_H y/o V_L y genes que codificaban las regiones constantes de cadena pesada y/o ligera de inmunoglobulina se co-transfectaron en células Sf9 usando el kit de transfección BacVector-3000 (Invitrogen). Se picaron diez placas individuales de capas de agarosa. Se usaron virus de placas aisladas para infectar matraces T-25 sembrados con células Sf-9 a una confluencia del 50% en 5 ml de medio ESF-921. Los aislados virales clonales amplificados en matraces T-25 se ensayan por PCR, usando dos cebadores (SEC ID N° 36 - TTTACTGTTT TCGTAACAGT TTTG) y (SEC ID N° 37 - GGTGCTTAAC AATGGGGAAG CTG) para asegurar la capacidad de clonación de las placas aisladas y que no hubiera contaminación con virus de tipo silvestre. En general, se cotransfectaron 200 ng de plásmido vectorial de transferencia recombinante con Bac-Vector-3000 de triple corte como se describe en el manual Bac Vector (Novagen) usando el reactivo lipídico Eufectin suministrado. Esta mezcla de transfección se sometió a diluciones en serie de factor 5. Se sembraron alícuotas de cien microlitros en placas de cultivo tisular de 60 mm que contenían 2,5 x 10⁶ células Sf9 adherentes. Después de 1 hora, las células se recubren con 4 ml de una solución de agarosa al 1% en medio de cultivo ESF-921. Se picaron diez clones individual de las células transfectadas cultivadas en capas de agarosa después de teñir las células vivas usando Rojo Neutro (Sigma, St. Louis, MO) a t=144 horas post transfección. El virus se eluyó de los lechos de placa durante una noche en 1 ml de medio ESF-921. Se sembraron matraces T-25 con células Sf-9 a una confluencia del 50% en 5 ml de medio ESF-921, y se infectaron con 0,5 ml del virus clonal eluido. Noventa y seis horas post-infección, se retiraron 0,5 ml de medio de los matraces T-25; las células se retiraron por centrifugación y se ensayó el sobrenadante para la actividad inmunoglobulina por dot blot en nitrocelulosa. También se ensayó la ausencia de virus de tipo silvestre por PCR del siguiente modo.

Se añadió sobrenadante infeccioso (10 µl) que contenía baculovirus recombinante a 90 µl de tampón de lisis que contenía Tris 10 mM pH 8,3, KCl 50 mM, 0,1 mg/ml de gelatina, Nonidet P-40 al 0,45%, y Tween-20 al 0,45%, que contenía 6 µg de Proteinasa-K. La mezcla se calentó durante 1 hora a 60°C y la Proteinasa-K se desnaturizó por incubación a 95°C durante 10 min. Se retiraron veinticinco µl de la mezcla calentada a un tubo nuevo de PCR después de refrigeración, y se añadieron otros 25 µl de la mezcla que contenía Tris 10 mM pH 8,3, KCl 50 mM, 0,1 mg/ml de gelatina, NP-40 al 0,45%, Tween-20 al 0,45%, 400 µM de cada dNTP, MgCl₂ 5 mM, 50 pM de cada cebador de PCR (final), y 2,5 U de Taq polimerasa (Roche). El ADN viral se amplificó durante 40 ciclos a: 92°C durante 1 min., seguido de 58°C durante 1 min. y 72°C durante 1 min. Se usaron los cebadores de baculovirus recombinante PH directo (SEC ID N° 36) y PH inverso (SEC ID N° 37) para amplificar

el locus de la polihedrina que expresa el gen de la cadena ligera. Los productos de PCR se analizaron después de electroforesis a través de un gel de agarosa. El baculovirus recombinante amplificaría un fragmento de 1300 pb, mientras que el baculovirus de tipo silvestre produciría un fragmento de ~800 pb con estas series de cebadores. El virus recombinante contaminado con virus de tipo silvestre amplificaría ambos tamaños de fragmento.

c. Preparación de soluciones madre virales de elevado título en células de insecto Sf9: Se transfirieron dos ml de un cultivo primario T-25 a un matraz T-75 que contenía células Sf9 a una confluencia del 50% en 10 ml de medio ESF-921, y las células se cultivaron durante 120 horas a 28°C. Se transfirieron cinco ml de cultivos T-75 secundarios a un matraz de agitación de 150 ml que contenía 50 ml de células Sf9 a 2×10^6 células/ml, y las células se cultivaron durante 120 horas a 28°C. Se transfirieron 25 ml del matraz de agitación de 150 ml en 500 ml de células Sf-9 a 2×10^6 células/ml en un matraz de agitación de un litro, y se cultivaron a 28°C. Cuando los cultivos alcanzaron el 20% de células viables, determinado por tinción con azul de tripano (aproximadamente 120 a 144 horas post infección), se recogió el cultivo viral por centrifugación a 3000 xg, se distribuyó en tubos estériles de 50 ml, y la mitad de los tubos se almacenaron a 4°C con el resto a -80°C. Esta solución madre viral recogida de elevado título ($>1 \times 10^8$ pfu/ml) de 500 ml después se usó para infectar células de insecto High-5 para la producción de inmunoglobulina. Los títulos virales (pfu/ml) se determinaron usando un kit Baculovirus Rapid Titer (Clontech, Palo Alto, CA).

d. Producción de Ig en células de insecto High-5: Las células de insecto High-5 (BTI-TN-5B1-4) secretaron niveles más elevados (2-20 X) de inmunoglobulina recombinante en comparación con células Sf9, y se eligieron para la producción de proteína quimérica. Se sembraron células High-5 en fase log temprana ($1,0-2,0 \times 10^6$ células/ml) en matraces de cultivo desechables de 1 litro con cierres ventilados a 5×10^5 células/ml en medio ESF921 (Expression Systems LLP). Los matraces se agitaron a 140-150 rpm a 28°C, y el volumen de medio en los matraces se ajustó en el tiempo time a no más de 500 ml. Cuando las densidades celulares alcanzaron 1,5-2,5 células/ml en 500 ml de medio, los matraces se infectaron con solución madre de baculovirus recombinante de elevado título a una multiplicidad de infección (MOI) próxima a 0,5:1 (pfu:células). Los matraces entonces se agitaron a 140-150 rpm a 28°C; el cultivo se recogió 96 horas post-infección.

5. PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA QUIMÉRICA QUE COMPRENDE UNA INMUNOGLOBULINA V_H Y UNA INMUNOGLOBULINA V_L:

Las células y los desechos se retiraron por centrifugación durante 60 min. a aproximadamente 5.000 x g, seguido de filtración a través de una unidad de filtración estéril PES de 0,2µ. Las proteínas quiméricas se purificaron a partir del medio de cultivo tisular aclarado por cromatografía de afinidad con un cartucho High-Trap de Proteína-A (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ), seguido de cromatografía de intercambio iónico utilizando tecnología FPLC (Amersham Pharmacia). Las proteínas quiméricas purificadas se separaron por tamaño y se intercambió el tampón en PBS por cromatografía FPLC. Todos los reactivos usados para la purificación de proteínas fueron de calidad USP biotecnológica (GenAr, Mallinckrot Baker, Parris, KY) y con endotoxinas ensayadas por el fabricante. Se usó agua de calidad USP estéril para hacer todos los tampones y otras soluciones. Los tampones y otras soluciones se prepararon en una cabina de seguridad biológica, y se esterilizaron en filtro a través de unidades de filtro PES de 0,2 µm.

Purificación por afinidad de proteína A de las proteínas quiméricas: Se retiró el medio de cultivo tisular de los matraces de cultivo en crecimiento y se agitaron durante 60 min. a 5.000 x g para sedimentar las células y los desechos. El sobrenadante se esterilizó por filtración usando una unidad de filtro PES de 0,2 µ. Se añadió tampón Tris (1 M, pH 7,4) al medio filtrado que contenía proteínas quiméricas V_H y/o V_L-inmunoglobulina a una concentración final de 20 mM. El sobrenadante de cultivo tisular tamponado se cargó en un cartucho de afinidad de Sepharose con Proteína A recombinante HighTrap de 5 ml a un caudal de 1 a 5 ml/min con una bomba peristáltica P1 (Amersham Pharmacia) recogiendo el flujo continuo en un matraz limpio. La columna se lavó con 25 ml de PBS (pH 7,4) a 5 ml/min. Se invirtió la dirección del flujo y se lavó la columna con 25 ml adicionales de PBS. La columna se eluyó en inversión a 1 ml/min con ácido cítrico 0,05 M (pH 3,5) recogiendo fracciones de 1 ml. Podrían usarse del mismo modo otras columnas de proteína incluyendo, aunque sin limitación, proteína G, proteína L, o cualquier proteína que sea capaz de unirse a un dominio de unión de inmunoglobulina.

b. Cromatografía de intercambio iónico: Se equilibró un cartucho de intercambio catiónico de Sepharose High Trap SP de 5 ml con 50 ml de ácido cítrico 25 mM (pH 3,5) y NaCl 20 mM. Las proteínas quiméricas V_H y/o V_L-IgG eluidas por proteína A se cargaron directamente en la columna equilibrada de Sepharose High Trap SP usando una bomba peristáltica a un caudal de 1 ml/min. La columna se lavó con 25 ml de ácido cítrico 50 mM (pH 3,5) y NaCl 20 mM (Tampón A) a 2 ml/min. La columna se eluyó con un gradiente lineal (0% de Tampón B a 100% de Tampón B) para recoger fracciones de 1 ml a 1 ml/min. (Tampón B = carbonato Na 100 mM (pH 10,0) y NaCl 1 M). Las fracciones eluidas por intercambio iónico que contenían las proteínas quiméricas V_H y/o V_L-IgG se analizaron espectrofotométricamente por su OD₂₈₀. Se combinaron las fracciones de pico.

c. Cromatografía por exclusión de tamaño: La fracción Ig combinada del intercambio iónico SP después se cargó en una columna Hi Prep Sephacryl 26/60 S200 Hi Resolution (Pharmacia) que se había equilibrado en 5 volúmenes de columna de PBS (pH 7,2) después de un pre-lavado en 100 ml de agua estéril. Las proteínas Ig quiméricas se eluyeron en PBS a un caudal de 0,5 ml/min y se recogieron en fracciones de 1 ml. El pico principal de Ig se combinó y filtró a esterilidad a través de un filtro de 0,2 µ.

6. CONJUGACIÓN DE PROTEÍNA IDIOTÍPICA Y HEMOCIANINA DE LAPA CALIFORNIANA (KLH)

Una vez purificada, la proteína idiotípica se conjugó con KLH de calidad GMP (VACMUNE, Biosyn Corporation) mediante reticulación con glutaraldehído. Se combinaron al menos 5 mg de proteína idiotípica estéril purificada descrita *supra*, con un peso igual de KLH en un tubo cónico de 15 ml estéril y el volumen final se ajustó a 9 ml en PBS. Se añadió gota a gota un ml de glutaraldehído al 1% (solución acuosa de Calidad 1 al 25%, Sigma) a una concentración final del 0,1%. El tubo entonces se balanceó lentamente durante 4 horas a temperatura ambiente. El conjugado se dializó en DispoDialyzers estéril (Spectrum Labs) frente 2 litros de PBS estéril, con tres cambios de tampón durante al menos 24 horas en una campana de seguridad biológica. El conjugado final IgG/KLH en PBS se retira asépticamente de las cámaras de diálisis y se transfiere a un tubo estéril, se mezcla, después se forma en alícuotas en viales. Cada vial de producto final se etiquetó con el número de lote, el identificador del paciente, el número de vial y la fecha de formación del vial. Se ensayó el diez por ciento del lote final en viales para la esterilidad y se ensayó un vial para la presencia de endotoxina. Se retuvo un vial para propósitos de archivo.

7. ENSAYOS DE PRODUCTO

a. Secuencia de ADN del sobrenadante del lote de producción que contiene baculovirus: Se recogió una alícuota de 1 ml de muestra del sobrenadante de cultivo de producción celular de insecto infectado y se eliminaron los desechos celulares centrifugando a 3000 rpm durante 5 min en una centrífuga de sobremesa. Se combinó al menos 0,1 ml de este sobrenadante aclarado que contenía partículas baculovirales a una proporción de volumen de 1 a 9 con tampón de lisis (Tris 10 mM pH 8,3, KCl 50 mM, 0,1 mg/ml de gelatina, Nonidet P-40 al 0,45%, y Tween-20 al 0,45%), se sometió a proteólisis con proteinasa K (concentración final 60 µg/ml) durante 1 h a 60°C, seguido de desnaturalización durante 15 min. a 95°C. Después se combinaron veinticinco µl de este lisado con 25 µl adicionales del tampón de lisis anterior que contenía 400 µM de cada dNTP, MgCl₂ 5 mM, 25 pmol de los cebadores oligonucleotídicos directos e inversos (véase la Tabla 3; SEC ID N° 34 y SEC ID N° 31 para la identificación de V_H y SEC ID N° 35 y SEC ID N° 36 para la identificación de V_L, respectivamente), y 2,5 U de Taq polimerasa (Roche). Las condiciones de ciclo para la PCR de V_L son: desnaturalización inicial durante 2 min. a 92°C, seguido de 40 ciclos de 1 min. cada uno a 92°C, 58°C, y 72°C, con una extensión final de 7 min. a 72°C. Para la PCR de V_H, las condiciones de ciclo son las mismas excepto en que la temperatura de hibridación es de 64°C. Los productos de PCR se evaluaron para el tamaño y cantidad esperados por electroforesis en gel de agarosa. Posteriormente, se usaron dos o más cebadores anidados para secuenciar directamente los productos de PCR. (Véase la Tabla 3; SEC ID N° 30 y SEC ID N° 34 para la identificación de V_H, SEC ID N° 28 y SEC ID N° 35 para la identificación de V_K, y SEC ID N° 88 y SEC ID N° 35 para la identificación de V_λ, respectivamente.) Las secuencias de nucleótidos completas de V_H y V_L se determinaron usando el OpenGene Automated DNA Sequencing System (Visible Genetics) y el software de análisis de secuencia, como se ha descrito anteriormente y se compararon con las secuencias del gen V del vector pTRABac(NHL-FV-8786-XXX) correspondiente al idiotipo del paciente.

b. Cromatografía de filtración en gel Superose 6: La cromatografía de filtración en gel del Id purificado se realizó para evaluar la pureza de la proteína. La cromatografía de filtración en gel se realizó usando una columna de FPLC Superose 6 HR 10/30 (Amersham Pharmacia) con PBS como fase líquida. La integración del pico se realizó sobre los 20 más grandes por el software de FPLC usando los siguientes criterios para rechazar un pico de incluirse en la evaluación de área: altura menor 0,01 Au; anchura menor de 0,05 ml; área menor de 0,01 Au/ml. Las fracciones de cada columna procesada se recogieron y ensayaron para la actividad específica de inmunoglobulina humana por ELISA de captura, y se compararon con el cromatograma de OD₂₈₀.

c. Ensayo de inmunoglobulina; ELISA anti IgG humana: Se recubrieron los pocillos de una placa de microtitulación con 100 µl de una dilución de 3 µg/ml de anticuerpo de cabra específico anti-cadena pesada de IgG humana (Roche) en tampón carbonato durante una noche a 4°C, y se lavaron 2 veces con 100 µl de TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5). Los pocillos se bloquearon con 200 µl de TBSB (TBS + BSA al 1%) durante 1 hora a 22°C.

Se ensayó cada fracción del cromatograma correspondiente a un pico humano en TBSB. Se añadieron cien µl de muestra diluida en diluciones en serie de factor 2 a los pocillos por duplicado, y se incubaron 1 hora a 22°C. El ensayo se repitió con patrones purificados de IgG1/κ o IgG/λ humana (Sigma, St. Louis, MO). Los pocillos se lavaron 4 veces con 200 µl de TBST (TBS + Tween 20 al 0,1%). Se diluyó el anticuerpo de detección (cabra-anti-κ o λ humana-HRP (Fischer, Pittsburgh, PA) 1:2000 en TBSB, se añadieron 100 µl a los pocillos, y se incubaron durante 1 hora a 22°C. Los pocillos se lavaron 6 veces con 200 µl de TBST. Se añadieron cien µl de sustrato (componente TMB 1, KPL Inc, Gaithersburg, MD) a los pocillos, se revelaron durante 30 min. y se ensayaron a OD₆₂₀.

d. Criterios de liberación de proteína idiotípica: (1) La secuencia de ADN de los genes variables de idiotipo en baculovirus procedentes del sobrenadante de producción debe ser idéntica a la secuencia de ADN en el vector de producción. (2) La concentración de proteína idiotípica fue mayor de 0,5 mg/ml en base a la OD₂₈₀. (3) El área de pico principal fue mayor del 90% del área en los picos evaluados en cromatografía analítica en Superose 6. (4) El pico cromatográfico principal corresponde al pico de actividad de ELISA de IgGκ (o λ) humana.

El producto de vacuna final, Id-KLH, se ensayó para los niveles de endotoxina por un ensayo en microplaca de

turbidez cinética o un ensayo Limulus Amoebocyte Lysate (LAL) y obtuvo un nivel por debajo de 350 unidades de endotoxina (EU) por ml. Se ensayó el diez por ciento del lote para la esterilidad en un ensayo de 14 días y se fueron negativos o se desecharon.

- 5 La Tabla 3 muestra un resumen de las secuencias de cebador usadas para establecer la identidad del producto final.

TABLA 3. Secuenciación de cebador usadas para establecer la identidad del producto final.	
NOMBRE DEL CEBADOR	SECUENCIA DEL CEBADOR (5' 3')
1. Interno de fosfatasa alcalina placentaria humana	AAATGATAACCATCTCGC (SEC ID N° 25)
2. Externo de fosfatasa alcalina placentaria humana	TTTACTGTTTTTCGTAACAGTTTTG (SEC ID N° 26)
3. Antisentido de constante de cadena ligera kappa	TTGGAGGGCGTTATCCACCTTC (SEC ID N° 27)
4. Interno corriente abajo de constante de cadena ligera kappa	CTGTAAATCAACAACGCACAG (SEC ID N° 28)
5. Externo corriente abajo de constante de cadena ligera kappa	CAACAACGCACAGAATCTAG (SEC ID N° 29)
6. Interno de melitina	GGGACCTTTAATTCAACCCAACAC (SEC ID N° 30)
7. Externo de melitina	AAACGCGTTGGAGTCTTGTGTGC (SEC ID N° 31)
8. Interno corriente abajo de constante de cadena pesada IgG _{γ1}	GGAAGTAGTCCTTGACCAGGCAG (SEC ID N° 32)
9. Intermedio corriente abajo de constante de cadena pesada IgG _{γ1}	CTGAGTTCCACGACACCGTCAC (SEC ID N° 33)
10. Externo corriente abajo de constante de cadena pesada IgG _{γ1}	TAGAGTCCTGAGGACTGTAGGAC (SEC ID N° 34)
11. Corriente abajo de kappa y lambda:	5'-GGTCGTTAACAATGGGGAAGCTG-3' (SEC ID N° 35)
12. PH directo	5'-TTTACTGTTTTTCGTAACAGTTTTG-3' (SEC ID N° 36)
13. PH inverso	5'-GGTCGTTAACAATGGGGAAGCTG-3' (SEC ID N° 37)
14. Interno de constante lambda	5'-GAAGTCACTTATGAGACACACCAG-3' (SEC ID N° 88)

8. USO DE LA PROTEÍNA QUIMÉRICA DE LA INVENCION PARA EL TRATAMIENTO DE LINFOMA DE CÉLULAS B NO HODGKIN:

Se obtuvieron las regiones V_H y V_L de un paciente con linfoma de células B no Hodgkin. Usando el método 5' RACE descrito *supra*, se clonaron los genes que codifican estas regiones y se insertaron en el vector de expresión y se expresaron por los métodos de la presente invención. La Tabla 5 contiene las secuencias de ADN de las regiones V_H y V_L usadas para el vector de expresión. Los sitios Apa I y Dra III usados para la clonación están indicados por subrayado.

Tabla 5: Secuencias de región variable obtenidas de un paciente.

VH A / 07

GACATGTTGTTGGTGGGAATCGGGGGGAGGCCTGGTCCAGCCGGGGGAGTCCCTGAGACT
 CTCCTGTGTGGCCTCTAGATTCACCTTTAGAACGTTTTGGATGACCTGGGTCCGCCAAC
 TTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAATATAAATCAAGATGGCAGTCAGACGTAT
 CATGCGGACTCTGTAAAGGGCCGATTTACCATCTCCAGAGACAACGGCAGGAACCTCCCT
 ATTTTTACAAATGACAAGTCTGAGAGTCGCGGACACGGCTATATATTACTGTGCGACTA
 ATGAAACGTCCAGTGGCCTGGACTGCTGGGGCCAAGGAACCTGGTCACTGTCTCCTCA
 GCTTCCACCAAGGGCCC
 SEC ID N° 86

VKA / L6

GAAATCGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTCGTCTCCAGGAGACAGAGTCGC
 CCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAAGAAGTTACTTAAGTTGGTATCAACAGAAGG
 CTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCCATAATGCATCCAGTAGGGCCACTGGCATCCCG
 CCCAGATTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGTCGCCTAGA

**GACTGAAGATGCTGCAGTTTATTACTGTCAGCAACTTTATTTCTGGCCTCCGATATTAT
TTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGAATATCACACGAACTGTGGCTGCACCAAGTG**
SEC ID Nº 87

- 5 La proteína inmunoglobulina quimérica recombinante aislada producida para este paciente a partir de la información genética detallada anteriormente se conjugó con KLH y se administró con GM-CSF cinco veces durante un periodo de seis meses como se ha descrito *supra*. Se realizó una exploración CT en las áreas del cuello y la pelvis del paciente antes de la administración de la terapia y 9 meses después. Una comparación de la suma de los diámetros de 6 masas tumorales reveló una reducción del 60% nueve meses después del inicio de la terapia. (Obsérvese que estas cifras no están ajustadas para adaptarse al tamaño del ganglio linfático antes del diagnóstico de la enfermedad (véase, Cheson et al., J. Clin. Oncol., 17(4):1244, 1999.)
- 10

Tabla 6: Reducción en el tamaño de los ganglios linfáticos después del tratamiento.

	ANTES DE TXT. (Producto de diámetros; cm ²)	9 MESES POST TXT. (Producto de diámetros; cm ²)
GANGLIO LINFÁTICO 1	6,16	2,8
GANGLIO LINFÁTICO 2	5,0	1,6
GANGLIO LINFÁTICO 3	3,3	1,17
GANGLIO LINFÁTICO 4	3,78	1,44
GANGLIO LINFÁTICO 5	1,92	1,0
GANGLIO LINFÁTICO 6	1,08	0,80
SUMA DE DIÁMETROS	21,24	8,81

REIVINDICACIONES

1. Uso de una primera proteína quimérica y una segunda proteína quimérica para la fabricación de una composición para terapia de un linfoma de células B en un paciente humano,
 5 en el que dicha primera proteína quimérica comprende al menos una parte de una región V_H y al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina IgM; y
 en el que dicha segunda proteína quimérica comprende al menos una parte de una región V_L y al menos una parte de una segunda región constante de inmunoglobulina;
 en el que dicha fabricación comprende producir dichas proteínas quiméricas por un método que comprende:
 10 (a) aislar un gen que codifica dicha parte de dicha región V_H a partir de células B asociadas con dicho linfoma de células B del paciente;
 (b) insertar dicho gen que codifica dicha parte de dicha región V_H y un gen que codifica dicha parte de dicha región constante de inmunoglobulina IgM en un vector de expresión para permitir la expresión de dicha primera
 15 proteína quimérica;
 (c) aislar un gen que codifica dicha parte de dicha región V_L a partir de células B asociadas con dicho linfoma de células B del paciente;
 (d) insertar dicho gen que codifica dicha parte de dicha región V_L y un gen que codifica dicha parte de dicha segunda región constante de inmunoglobulina en un vector de expresión para permitir la expresión de dicha
 20 segunda proteína quimérica; y
 (e) producir dichas proteínas quiméricas introduciendo el vector de expresión en una línea celular de insecto;
 en el que la composición comprende adicionalmente una proteína vehículo conjugada con dicha proteína quimérica.
- 25 2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha región V_H o V_L es una región variable completa.
3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que dicha proteína vehículo es hemocianina de lapa californiana (KLH).
- 30 4. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha composición es para co-administración con una citoquina o quimioquina.
5. El uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicha citoquina es el factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF).
- 35 6. El uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicha quimioquina es la proteína quimiotáctica de monocitos 3 (MCP 3).
7. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la composición es para
 40 administración por inyección, inhalación, suministro oral o transdérmico.
8. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho linfoma de células B es un linfoma de grado bajo refractario o linfoma folicular de células B.
- 45 9. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho linfoma de células B es linfoma no Hodgkin.
10. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho vector de expresión es un vector de expresión de baculovirus.
- 50 11. El uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicho vector de expresión de baculovirus comprende una secuencia señal secretora de la melitina de abeja melífera y una secuencia señal secretora de la fosfatasa alcalina placentaria humana.
- 55 12. El uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicho vector de expresión de baculovirus comprende adicionalmente un promotor p10 del baculovirus AcNPV y un promotor de polihedrina de AcNPV, en el que dicho promotor p10 controla una secuencia señal secretora de la melitina de abeja melífera, y en el que dicho promotor de polihedrina controla una secuencia señal secretora de la fosfatasa alcalina placentaria humana.
- 60 13. El uso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que dicho gen que codifica una proteína quimérica que comprende una región V_H y una región constante de inmunoglobulina IgM está controlado por dicho promotor p10 en dicho vector de expresión de baculovirus, y dicho gen que codifica una proteína quimérica que comprende una región V_L y una segunda región constante de inmunoglobulina está controlado por dicho promotor de polihedrina en dicho vector de expresión de baculovirus.
- 65

14. El uso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que dicho gen que codifica dicha región V_H o V_L y dicha región constante de inmunoglobulina está controlado por dicho promotor p10 o dicho promotor de polihedrina en dicho vector de expresión de baculovirus.

5 15. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha línea celular de insecto es una línea celular de *Trichoplusia ni* (Hi-5) o *Spodoptera frugiperda* (sf9).

16. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dichas proteínas químéricas se analizan para su expresión por ELISA.

10 17. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dichas proteínas químéricas se aíslan usando una proteína seleccionada entre el grupo que consiste en proteína A, proteína G, proteína L y otras proteínas que son capaces de unirse a un dominio de unión de inmunoglobulina.

15 18. El uso de acuerdo con la reivindicación 17, en el que dicha proteína capaz de unirse a un dominio de unión de inmunoglobulina es un anticuerpo anti-inmunoglobulina.

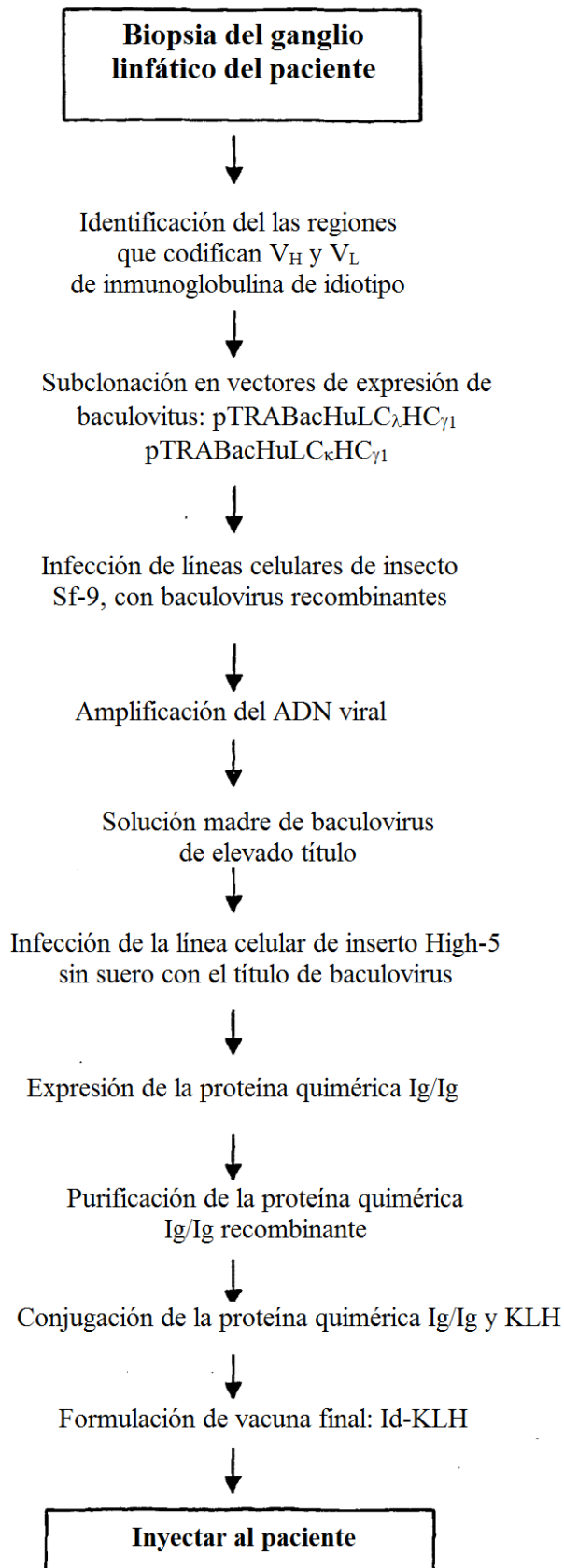


FIGURA 1

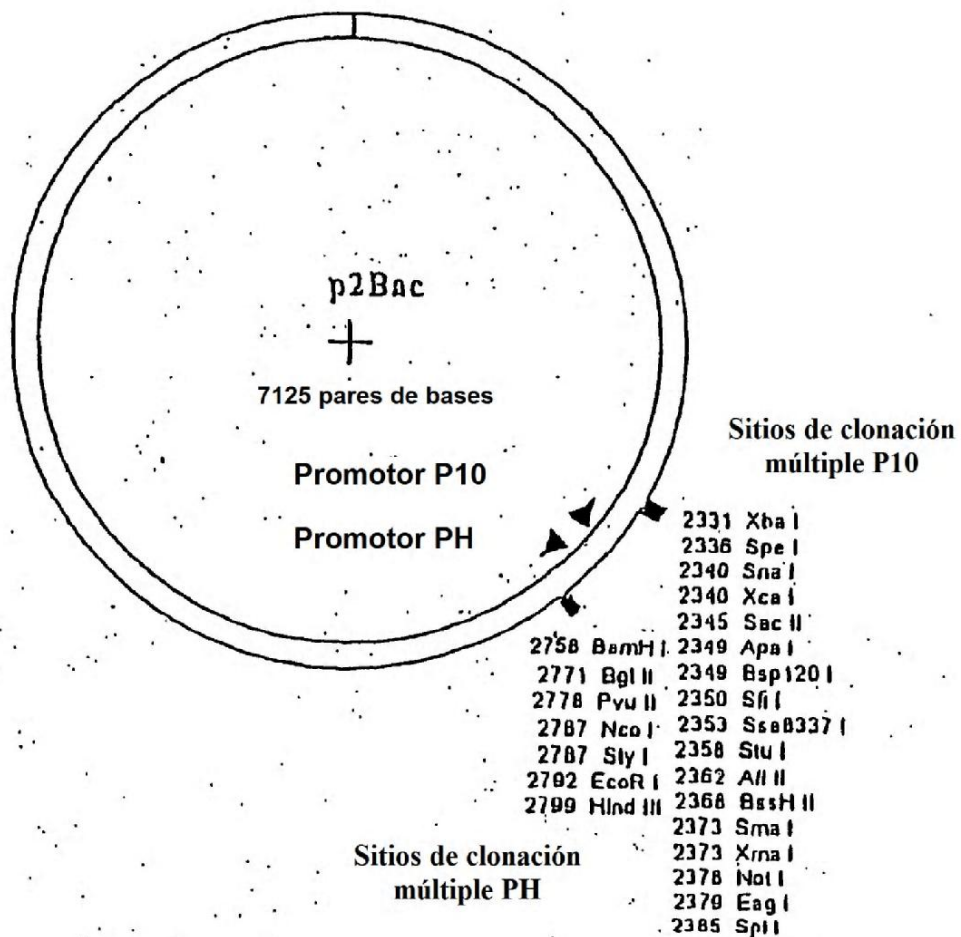


FIGURA 2

FIGURA 3A

FIGURA 3B

FIGURA 3B

TAAAGTTGCAGGACCACCTTCTGCGCTCGGCCCTTCGGCTGGCTTTATTTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTG
 GGTCGCGGTATCATTTGCAGCAC TGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACGACGACGGGAGTTCAG
 GCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCTCACTGATTAAGCATTTGGTAACCTCAAGACCAAGT
 TTAATCATATATATCTTTAGATTGATTTAAAACTTTCATTTTAAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTGAATATC
 TCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAGATCAAAAGGATCTTCTTGA
 GATCCTTTTTTCTGCGGTAAATCTGCTGCTTGGCAAAACAAAAACCCGCTACCAAGCGTGGTTTGTCTAGTGTAGCCGT
 AGAGCTACCAACTCTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAAATACCTGTCTTCTAGTGTAGCCGT
 AGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTACCAAGTGGCTGGTGGC
 AGTGGCGATAAGTCGTGCTTACCGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGCGCAGCGGTCGGGGTGAACGGG
 GGGTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCATTTGAGAAAGCG
 CCAQCTTCCCGAAGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGAGGCTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTT
 CCAGGGGAAACGCCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCTGATTTTGTGATGCTC
 GTCAGGGGGCGGAGCTTATGGAAACGCCAGCAACCGGCCCTTTTACGGTTCTTGGCCCTTTTGTGGCCCTTTTGTCTC
 ACATGTTCTTCCCTGCTTATCCCTGATTCGTGGATAACCGTATTACCGCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGC
 AGCGGAACGACCGAGCGCAGTGAGTGAGCGGAGGAAAGCGGAAGAGCGGCCCAATACGCAAAACCGCTCTCCCGCGCG
 TTGGCCGATTTCATTAATGCAGGTTAACCTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACATATAGGGAGACCGGCAGATCGATCT
 GTCGA

FIGURA 3C

FIGURA 4

Secuencia de ADN de pTRABac/9F12

GCAGTTCGTTGACGCCCTTCCTCCGTTGGCCGAACACGTCGAGCGGGTGGTGCATGACCAGCGGGCGTCCGCGACGCGACG
 CACAAGTATCTGTACACCGAATGATCGTCGGCGGAAGGCACGTCGGCCCTCCAAGTGGCAATATTGGCAAAATTCGAAAAATA
 TATACAGTTGGGTTGTTGCGCATATCTATCGTGGCGTTGGGCATGTACGTCCGAACGTTGATTTGCAATGCAAGCCGAAA
 TTAAATCATTCGGAATTAGTCCGATTAAACGTTGTACATCCTCGCTTTTAATCATGCCGTCGATTAAATCGCGCAATCGA
 GTCAGTGATCAAGTGTTGAAATAATGTTTCTTTGTATTCCCGAGTCAAGCGCAGCGGTATTTTAAACAACCTAGCCAT
 CTTGTAAGTTAGTTTCAATTTAATGCAACTTTATCCATAATATATATTATGTCACGTCGCAAGATTAACAATGCGCCCCG
 TTGTCGCATCTCAACACGA CTATGATAGAGATCAATAAAGCGCGAATTAAATAGCTTGCACGCAACGTCACGATCTG
 TGCACGCGTTCCGGCACGAGCTTTGATTGTAATAAGTTTACGAGCGATGACATGACCCCCGTAGTGACAAACGATCAC
 GCCAAAGAACTGCCGACTACAAATTAACCGAGTATGTCCGGTGACGTTAAACTATTAAGCCATCCAAATCGACCGTTAG
 TCGAATCAGGACCGCTGGTGCAGAGCCCGGAAGTATGGCGAATGATCGTATAACGTTGGAGTCCGCTCATTAGAGC
 GTCATGTTTAGACAAGAAAGCTACATATTTAATTGATCCCGATGATTTTATTGATAAATTGACCCCTAACTCCATACACGG
 TATTCTACAATGGCGGGTTTGGTCAAAATTTCCGAGCTGCGATTGTACATGCTGTTAACGGCTCCGCCACTATTAAAT
 GAAATTAATAATTTCCAAATTTTAAACCGCAGCAAGAGAAACATTTGTATGAAAGAATGCGTAGAAGAAAGAAAAATGT
 CGTCGACATGCTGAACAACAAGATTAAATATGCCCTCCGTGTATAAAAAAATATTGAACGATTGAAAGAAAAACAATGTAC
 CGCGCGCGGTATGTACAGGAAGAGGTTTATACATAAAGCTGTACATTGCAAAACGTGGTTTCGTGTGCCAAGTGTGAAAAAC
 CGATGTTTAATCAAGGCTCTGACGCATTTCTACAACCCAGACTCCAAGTGTGGGTGAAGTCATGCACTCTTGTGGCAACTGCA
 ATCCCAAGATGTGTATAAACCAACCAACTGCCAAAAAATGAAAACTGTGACRAAGCTCTGTCCGTTTGTGCTGGCAACTGCA
 AGGGTCTCAATCCCTATTGTAAATTATTGAATAATAAACAATATAAATGCTAAATTTGTTTATTATAACGATACAAAC
 CAAACGCAACAAGAACATTTGTAGTATTATCTATAAATTGAAAAACGCGTAGTTATAATCGCTGAGGTAAATATTAAATCA
 TTTTCAAATGATTCACAGTTAATTGCGACAAATAAATTTATTTTACATAAACTAGACGCTTGTGCTCTTCTCTCTC
 GTATTCCTCTCTTTTTCATTTTCTCTCATAAAAAATTAACAATAGTTATTCGTATCCATATATGATCTATCGTATA
 GAGTAAATTTTGTGTCATAAATAATATATGCTCTTTTAAATGGGGTGTATAGTACCGCTGCGCATAGTTTCTCTGTAA
 TTTTACAACAGTGTCTATTTCTGGTAGTTCTTCGGAGTTGTTGTTTAAATTAATAATTAATAATCAATGAATTTGGG
 ATCGTCGGTTTGTACAAATATGTTGCCGCAATAGTACGAGCTTCTTCTAGTTCAATTAACCATTTTGTAGCAGCACCG
 GATTAAACATAACTTTCCAAAATGTTGTACGACCGTTAAACAAAAACAGTTCACCTCCCTTTTCTATATACTATTGTCTGCG
 AGCAGTTGTTGTTGTTAAATAATAACAGCCATTGTAATGAGACGCAAACTAATATCACAAACTGGAAATGTCTATCAA
 TATATAGTTGCTGATATCTCCCCAGCATGCCTGTCTATTGTCTTCCCCAATCTCTCCCCCTTGTGTCTGCTGCTCCCAACCCAC

Figura 4 (cont.)

CCCCAGAAATGACACACCTACTCAGACAAATGCGATGCAATTTCCCTCATTTTATTAGGAAAGGACAGTGGAGTGGCAC
 CTTCCAGGGTCAAGGAAGGCACGGGGAGGGCAACACAGATGGCTGGCAACTAGAGGCACAGTCGAGGCTGATCAG
 CGAGCTCTAGCTAGACTATTATTTACCCGGAGACAGGAGAGGCTCTTCTGCGTGTAGTGGTTGTGCAGAGCCTCATGC
 ATCAGGAGCATGAGAAAGACGTTCCCTGCTGCCACCTGCTTGTCCACGCTGAGCTTGTGTAGAGGAAAGAGGCC
 GTCGGAGTCCAGCACGGGAGGCGTGTCTTGTAGTTGTCTCCGGCTGCCATTTGCTCTCCACTCCACGGCGATGTGCG
 TGGGATAGAAAGCCTTTGACCAGGCGAGGCTGACCTGGTCTTGTGCTCAGCTCATCCCGGATGGGGCAGGGTGTAC
 ACCGTGGTCTCCGGGCTGCCCTTTGGCTTTGGAGATGGTTTCTCGATGGGGCTGGGAGGCTTTGTGTGGAGACCTT
 GCACTTGTACTCTCTGCCATTTCAGCCAGTCTGTGTGACGAGCGCTGACACACAGGTACGTCGTGTGTACT
 GCTCTCCCGCGCTTTGTCTTGGCATTAATGCACCTCCACCGCTCCAGTACCAGTTGAACTTGACCTCAGGGTCTTCG
 TGGCTCAGCTCCACACCGCATGTGACCTCAGGGTCCGGGAGATCATGAGGTGTCTTGGTCTTGGGGGAAGAG
 GAAGACTGACGGTCCCCCAGGAGTTCAAGTGCCTGAGTGTGAGTTTGTGTCACAAGATTGGGCTCAACTTTCT
 TGTCCACCTTGGTGTGTGGCTTGTGATTACGTTGCAGATGAGTCTGGGTGCCAAGCTGTGGAGGGCACGGTC
 ACCACGCTGCTAGGGATAGTCTCTGAGGACTGTAGGACAGCCGGGAAGGTGTGACCGCCGCTGTGAGGGCGCCCTGA
 GTTCCACGACACCGTCAACGGTTCCGGGAAGTAGTCTTGTGACAGGACCCAGGCGCTGTGCCCCCAGAGGTGCTCT
 TGGAGGAGGGTCCAGGGGAAGACCGATGGGCTTGGTGGAGGCTGAGGAGACGGTGTGACCGGTTCCCTGGCCCCCAG
 GAGTCAAGTAGTAGTGGGCCAGCCACTGTTTCCCGCTTTCGCACAGTAATAACGGCCGTGTCTCGCTCTCAGGCT
 GTTCAAGTGCAGATATAGCGTGTTCATGGAAATTGTCTCTGGAGATGGTCAATCGGCCCTCAGGAGTCTGCATAATATG
 TGGTAGTTCTCTAGCACTAATAGCCGCGACCCACTCCAGCCCATCCCTGGAGCTGGCGGACCCAGCTCATGGCATAG
 CTGCTAAAGCTGAATCCAGAGGCTGCACAGGAGTCTCACGGACCCCGGCTGTACCAAGCTCCCCCAGACTGCAC
 CAGCTGCACCTCGTCCGCTAGATGTAGAAATGTACAGCACTAATAAATAAGTGTGCAACGTTGACTAAGAAATTCATGC
 GCGCGGTACGATTGTAAATAAATGTAAATTTACAGTATAGTATTTAAATAATACAAATGATTTGATAATAATCTT
 ATTTAACTATAATATTTGTGTGGTTGAAATTAAGTCCCGCATCTCTCAATGCATAATATCATAGTCCCCCTTGT
 GTAAGTGTGCGTATTTCTGAATCTTTGTAAATAGCACACAGGACTCCACCGCTTGGCGTTTATTTCTTCTGCTCGA
 GGATATCATGGAGATAATTAATGATAACCATCTCGCAATAAATAAGATTTTACTGTCTTCTGTAACAGTTTGTAAAT
 AAAAAACCTATAAATATCCGGATTATTCATACCTCCACCATCGGGCTGTAGCGGATCCATGGTGGGACCCCTGCA
 TGCTGCTGCTGCTGTAGGCTAGGCTACAGTCTCCCTGGGCATCGACATCCAGATCCAGCTCCTCCATCC
 TCCCTGCTGCTGCTGTAGGACAGAGTCACTCATCTTGGCGGCAAGTCAGAGTATTAGCACCTATTAAATTTGGTA
 TCAGCAGAAACCCAGGAAAGCCCTAAACTCTGTATCTATTATGCAACCAATTTGCAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTC
 GTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGGCATTTATTTGTCAA
 CAGAGTTCCAAACACCGTCACTTTGGGCCCCGAGCCAAAGTGGATATGAAGACTGTGGCTGCACCAAGTGTCTTCATCTT
 CCGCCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCCTGTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATATCCAGAGAGGCCA

Figure 4 (cont.)

Figura 4 (cont.)

TTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGGGAACCCCTATTGTGTTATTTTCTAAATACATTCAAATA
 TGTATCCGCTCATGAGACAAATAACCCCTGATAAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTTC
 CGTGTGCGCCCTTATTCCCTTTTTCGGGCATTTTGCCCTTCTGCTTTTGTCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAAGA
 TGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCC
 CCGAAGAACGTTTCCAAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGCGCGGTATATCCCGTATTGACGCCGGGCAA
 GAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAAGTCAAGAAAGCATCTTACGGA
 TGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCACTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAAACGA
 TCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTCACAAACATGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAG
 CTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCAAGATGCCCTGTAGCAATGGCAACAAACGTTGCGCAACTATTAACT
 TGCGGACCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTCGTGATAAATCTGAGCGCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTTGCAGCA
 CTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCCGTATCTACACGACGGGGAGTCAAGGCAACTATGGATGAACGAAATAG
 ACAGATCGCTGAGATAGGTGCCCTCACTGATTAAAGCATTTGGTAACCTGTACAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTG
 ATTTAAAACTTCAATTTTAAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTGTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTTAACGT
 GAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTCTGCGCGTAAT
 CTGCTGCTTGCAAAACAAAAACCAACCGCTACCAAGCGGTGGTTTGTTCGGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTCCGA
 AGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAAC
 TCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTCTTAC
 CGGGTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGTGAACGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAAGCT
 TGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCATTGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAG
 GCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGAGGTCGGAACAGGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAACGCTTGTATCT
 TTATAGTCCGTGCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGA
 AAAACGCCAGCAACCGGCCCTTTTACGGTTCTTGCCCTTTTGTGCGCTTTTGTCTACATGTTCTTTCTGCGTTATCC
 CCTGATCTGTGGATAACCGTATTACCGCTTTGAGTGAAGTATACCGCTCGCCGAGCGCAACGACCGAGCGCAGCGA
 GTCAGTGAGCGGAGGAAAGCGGCCCAATACGCAACCGCCCTCTCCCGCGGCTTGGCCGATTTCATTAATGACAGGT
 TAACCTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCGGCAGATCGATCTGTCTGGA

FIGURA 5A

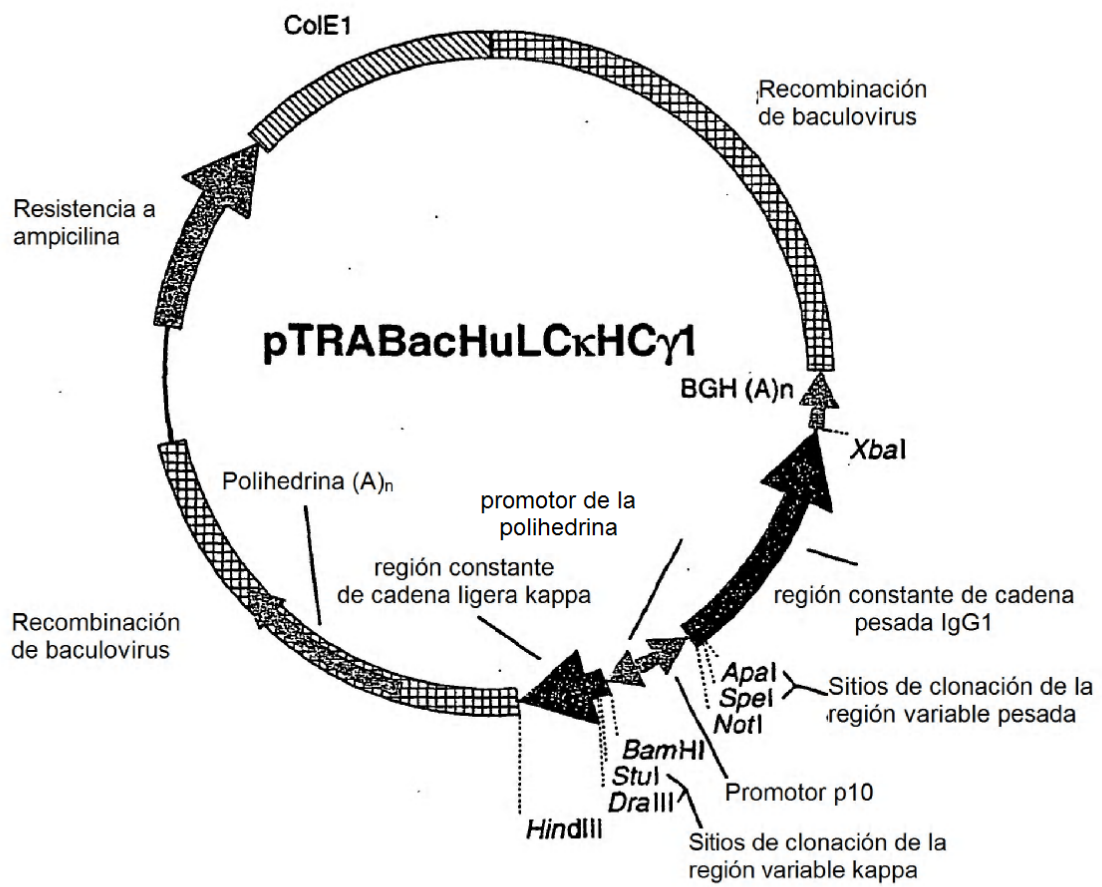


FIGURA 5B

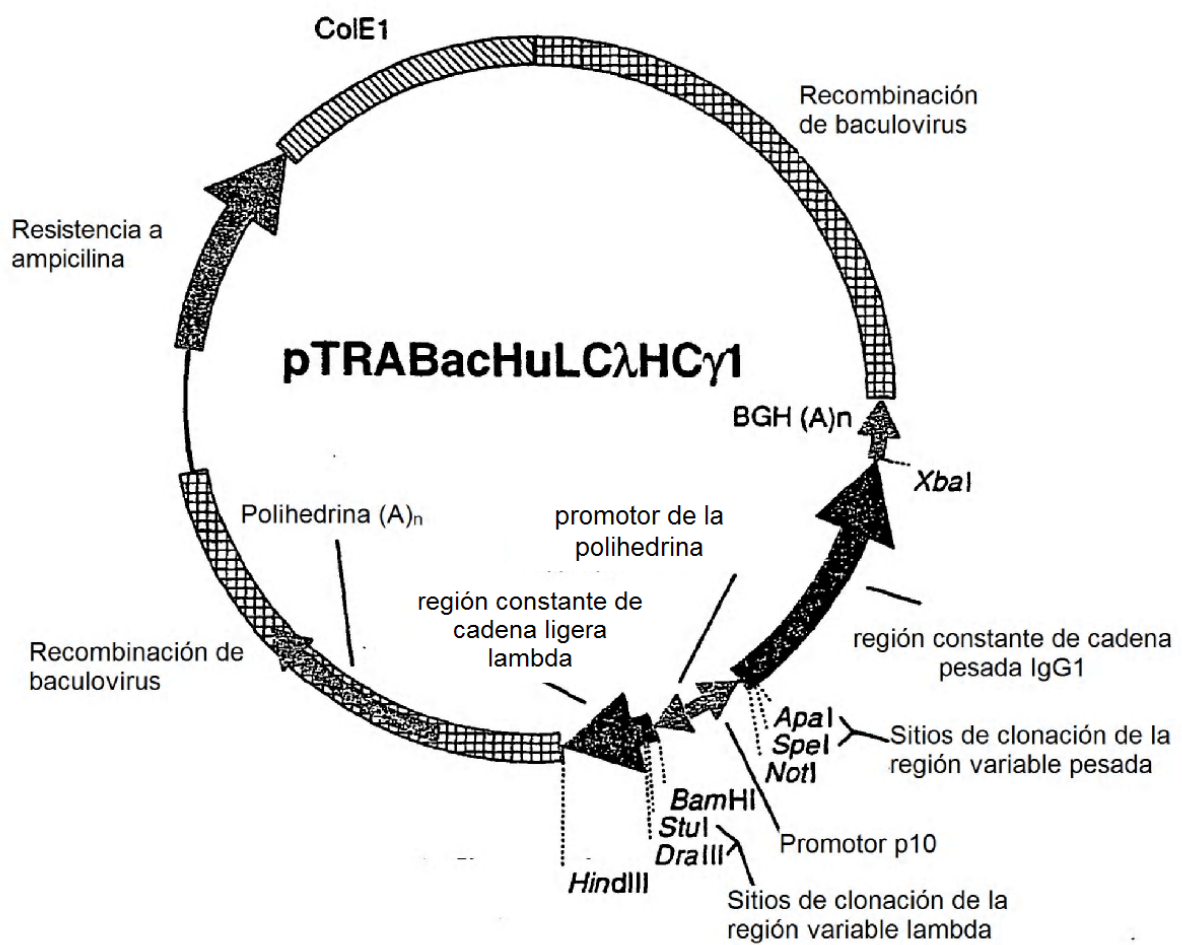


FIGURA 6A

Secuencia de ADN de pTRABacHuLCkHC λ 1

GCAGTTGTTGACGCCCTTCCCTCCGTGTGGCCGAACACGTCGAGCGGGTGGTCGATGACCAGCGGCGTGCACGCGACGCACCAAGTAT
 CTGTACACCGAATGATCGTCGGGCGAAGGCACGTCGGCCTCCAAGTGGCAATATTTGGCAAAATTCGAAAAATATATACAGTTGGGTTGTTT
 GCGCATATCTATCGTGGCGTTGGGCATGTACGTCCGAACGTTGATTTGCATGCAAGCCGAAATTAATCATTTGCCGATTAGTGGGATTA
 AACGTTGTACATCCCTCGCTTTTAATCATGCGGTGATTAATCGGCAATCGAGTCAAGTCAAGTGTGGAAATAATGTTTTCTTTG
 TATTTCCCGAGTCAAGCGCAGCGGTATTTAAACAAACTAGCCATCTTTGTAGTTAGTTTCAATTAATGCAACTTTATCCAAATAATATAT
 TATGTATCGCACGTCGAAGAATTAACAATGCGCCGTTGTGCACTCTCAACACGACTATGTATAGATCAAAATAAAGCGGGAATTAATA
 GCTTGGACCGCAACGTCACGATCTGTGCACGCTTCCGGCACGAGCTTTGATTTGTAATAAGTTTTTACGAAGCGATGACATGACCCCC
 GTAGTACAACGATCACGCCCAAAGAACTGCCGACTACAAAATTACCGAGTATGTCGGTGACGTTAAACCTATTAAGCCATCCAAATCG
 ACCGTTAGTCGAATCAGGACCGCTGGTGGGAGAGCCGCGAAGTATGGCGAATGCAATCGTATAACGTTGGAGTCCGCTCATTTAGAGCG
 TCATGTTTAGACAAGAAAGCTACATATTTAATTGATCCCGATGATTTTATTTGATAAAATTTGACCCCTAACTCCATACACGTTATCTACAA
 TGGCGGGGTTTGGTCAAAATTTCCGGACTGCGATTTGTACATGCTGTGTTAAACGGCTCCGCCCACTATTAAATGAAAATTAATAATTTCCAAAT
 TTAAAAAACGCAGCAAGAGAAACATTTGTATGAAGAATGCGTAGAAGAAAGAAAATGTCTGTCGACATGCTGAACAAACAAGATTAAT
 ATGCTCCGTGTATAAAAAAATATTGAACGATTTGAAGAAACAAATGTACCGCGCGGCGGTATGTACAGGAAGAGGTTTATATACTAAA
 CTGTTACATTTGCAACCGTGGTTTCGTGTGCCAAAGTGTGAAACCCGATGTTTAATCAAGGCTCTGACGCAATTTCTACAACCCAGACTCCA
 AGTGTGTGGGTGAAGTCATGCACTCTTTTAATCAAAATCCCAAGATGTGTATAAACCAACCAAACTGCCAAAAAATGAAAACTGTCCGACAAG
 CTCGTCCGTTTGTGCAACTGCAAGGCTCTCAATCCCTATTGTAATTAATTGAATAATAAAACAATTAATAAATGCTAAAATTTGTTTTT
 TATTAAAGATACAAACCAACGCAACAAGAACATTTGTAGTATTATCTATAATTGAACGCGTAGTTATAATATCGCTGAGGTAATAATTT
 AAAATCATTTTCAAAATGATTCACAGTTAATTTGCGACAATATAATTTTATTTTACATATAAAGCTAGACGCTTGTGCTCTTCTTCTCGT
 ATTCTCTCTCTTTTTCATTTTCTCCTCATAAAAATTACATAGTTATTATCGTATCCATATATGTATCTATCGTATAGAGTAAATTTT
 TTGTTGTCATAAATATATATGCTTTTTTTTAAATGGGTGTATAGTACCGCTGGCGATAGTTTCTGTAAATTTACAACAGTGTCTATTTT
 TGGTAGTTCTTCCGAGTGTGTTGCTTTAAATTAATAATAATCAATGAAATTTGGGATCGTCCGTTTGTACAAATAATGTTGTCGCGG
 CATAGTACGCAGCTTCTTCTAGTTCAATTAACCATTTTTTTAGCAGCACCGGATTAACATAAACTTTCCAAAAATGTTGTACGAACCCGTTA
 AACAAAAACAGTTCACTCCCTTTTCTATACATATTGCTCGAGCAGTTGTTTGTGTTTAAATAAAGCCATTTGTAATGAGACGCAC
 AAATAATAATCACAAACTGGAAATGTCTATCAATATATAGTTGCTGATATCTCCCCAGCATGCTTCCCTGCTATTTCTTCCCAATCTTCCCC
 CTTGCTGCTCTGCCCAACCCCAAGAAATAGAAATGACACCTACTCAGACAAATGCGGATGCAATTTTCTCTCATTTTATTAGGAAAGGA

.Figura 6A (cont.)

CAGTGGAGTGGCACCTTCCAGGGTCAAGGAAGGACCGGGGAGGGGCAACAACAGATGGCTGGCAACTAGAAAGGCACAGTCGAGGCT
 GATCAGCGAGCTCTAGTCTAGACTATTATTACCCGGAGACAGGGAGAGGCTCTTCTGCGTGTAGTGGTTGTGACAGAGCCTCATGCATC
 ACGGAGCATGAGAAGACGTTCCCTGCTGCTGCCACCTGCTCTTGTCCACGGTGAAGCTTGTCTGTAGAGGAAGAGGAGCCGTCGGAGTCCAG
 CACGGGAGGCGGGTCTTGTAAGTTGTTCTCCGGCTGCCCATTTCTCTCCACTCCACGGCGGATGTCCGTGGGATAGAAAGCCTTTGACCA
 GGCAGTCAAGCTGACCTGGTTCTTGGTCAGCTCATCCCGGATGGGGCAGGGTGATACACCTGTGGTTCTCGGGCTGCCCTTTGGCT
 TTGGAGATGGTTTCTCGATGGGGCTGGAGGGCTTTGTTGGAGACCTTGACATTGTACTCCTTGCCATTTCAGCCAGTCCCTGGTGCAG
 GACGGTGAAGACGCTGACCAACAGGTACGTGCTGTTGTACTGCTCCTCCCGGGCTTTGTCTTGGCATTTATGCACCTCCACGCCGTCCA
 CGTACCAGTTGAACTTGACCTCAGGGTCTTCGTGGCTCAGTCCACCAACCGCATGTGACCTCAGGGGTCCGGGAGATCATGAGGGTG
 TCCTTGGGTTTGGGGGGAAGAGACGTGACGGTCCCGCCAGGAGTTTCAGGTGCTGGGCAACGGTGGGCATGTGTGAGTTTGTGCACA
 AGATTGGGCTCAACTTCTTGTCCACCTTGGTGTGCTGGCTTGTGATTCACGTTGCAGATGTAGGTCTGGGTGCCCAAGCTGCTGG
 AGGGACGGTCAACCACTGCTGAGGGAGTAGAGTCTTGAGGACTGTAGGACAGCCGGGAAGGTGTGCACGCCGCTGGTCAGGGCGCCT
 GAGTTCCACGACACCGTCAACGGTTCGGGGAGTAGTCTTGACCGGACGCCAGGGCCGCTGTGCCCCAGAGGTGCTCTTGGAGGA
 GGGTGCCAGGGGAAGACCGATGGGCCCACTAGTGCAACGTTGACTAAGAAATTTCAATGCGGCCGCTACGATTGTAAATAAAATGTAAT
 TTACAGTATAGTATTTTAAATTAATATACAAATGATTTGATAATAATTTCTTATTTAACTATAATATATGTGTGGTTGAAATTAAGGT
 CCGGCATCCTCAAATGCATAATATCATAGTCCCGCTTGTGTAAAGTATGCGTATTTCTGAATCTTTGTAAATAAGCACACAGGACTC
 CAACCGCTTTGGCGTTTATTTCTTGTCTCGAGGATATCATGGAGATAATTAATAATGATAACCATCTCGCAAAATAAATAAGTATTTTAC
 TGTTCGTAAACAGTTTGTAAATAAAACCTATAAATATTCGGGATTTATCATACCGTCCCAACCATCGGGCGTGTAGCGGATCCAT
 GGTGGACCCGTGCTGCTGCTGCTGCTAGGCCCTCACCAAGTGTCTTCACTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTT
 GGAACTGCCCTCTGTGTGCTGCTGAAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAAACGCCCTCCCAATCGGG
 TAACTCCAGGAGTGTCAAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAAGCAGACTACG
 AGAAACACAAAGTCTACGCCCTGGGAAGTCAACCCATCAGGGCTGAGCTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAAATAG
 AAGCTTGTGTTGGATGGAAAGGAAAGAGTTCTACAGGGAAACTTGGACCCGCTTCATGGGAAGACAGCTTCCCATTTGTTAACGACCA
 AGAAGTATGATGTTTCTTGTGTTGTTCAACATGCGTCCCACTAGACCCAAACCGTTGTTACAAATTCCTGGCCCCAACACGCTCTGCCGT
 GCGACCCGACTATGTACCTCATGACGTGATTAGGATCGTCGAGCCTTCATGGGTGGGAGCAACAAACGAGTACCGCATCAGCCTGGCT
 AAGAAAGGGCGGCGCTGCCCAATAATGAACCTTCACCTGAGTACACCACTCGTTCGAAACAGTTTCATCGATCGTGTCTCATCTGGGAGAA
 CTTCTACAAGCCCATCGTTTACATCGGTACCGACTCTGCTGAAGAGGAGGAAATTCCTCTTGAAGTTTCCCTGGGTTCCTCAAGTAAAGG
 AGTTTGACCAAGCAGCCTCTGTTCTGTTCACTGGTCCGGCGTATTAAACACGATACATTTGTTATTAGTACATTTATTAAGCGCTAGATTCT
 GTGCGTTGTTGATTACAGACAAATTGTTGTACGTATTTTAAATAATTCATTAATACTTTTAGGGTGGTATGTTAGAGCGGAAAAAT

Figura 6A (cont.)

CAAATGATTTTCAGCGTCTTATATCTGAATTTAAATATTAATCTCAATAGATTTGTAAATATAGGTTTCGATTAGTTTCAAACAAGG
 GTTGTTTTCCGAACCGATGGCTGGACTATCTAATGGATTTTCGCTCAACGCCACAATACTTGCCAAATCTTGTAGCAGCAATCTAGCT
 TTGTGATATATCGTTTGTGTTTGTGTTTGTAAATAAGGTTTCGACGTCTTCAAAATATTAATGCGCTTTTGTATTTCTTCAATCAGCTGTC
 GTTAGGTACAAATTGACTCGACGTAAACACGTTAAATAAGCTAGCTTGGACATATTTAAACATCGGGCGTGTAGCTTTATAGGCCGA
 TTATCGTCGTCCCAACCCCTCGTCGTTAGAAGTTGCTTCCGAAGACGATTTTGCCATAGCCACACGACGCCATTAATTTGTGTGCGG
 TAACACGTCGCGGATCAAAATTTGTAGTTGAGCTTTTGTGAATTAATTTCTGATTTGCGGGCTTTTGTGGCGGTTTCAATCTAACTGTGC
 CCGATTTAATTCAGACAACACGTTAGAAAGCGATGGTGCAGGCGGTGTTAAACATTTTCAGACGGCAATCTACTAATGGCGGCGGTGGT
 GGAGCTGATATAAATCTACCATCGTGGAGGCGCAGGCGGGCTGGCGGAGGCGGAGGAGGTTGGCGGTGATGCAGACGG
 CGGTTTAGGCTCAAAATGTCTCTTTAGGCAACACAGTCGGCACTCAACTATTGTACTGGTTTCGGGCGCCGTTTGTGGTTTGAACCGGTC
 TGAGACGAGTGCATTTTTCGTTCTAATAGCTTCCAAACAAATTTGTGTCTGTCTAAAGGTGACGCGGTTGAGGTTCCGTCCGTCCGC
 ATTGTGGAGCGGCGCAATTCAGACATCGATGGTGGTGGTGGAGCGCTGGAATGTTAGGCACGGGAGAAAGGTTGGTGGCGG
 CGGTGCCCGCGTATAATTTGTCTGTTTGTCTGCGCACGATTTGTGGCACCGGCGCAGGCGCGCTGGCTGCACAACGGAAAG
 GTGCTGTCTTCGAGGCGAGCTTTGGGGTGGTGGCAATTCAATATTATAATTGGAATACAAATCGTAAATACTGTCTAAGCATTTGTA
 ATTTCGCTATCGTTTACCGTGCCGATATTAAACAACCGCTCAATGTAAAGCAATTGTATTGTAAAGAGATTGTCTCAAGCTCCGACGCCC
 GATAACAAGCCTTTTCAATTTTACTACAGCATTTAGTGGCGAGACACTTCGCTGTCTGTCGACTCGAGTTCTATAAGTGTCACTAAATC
 GTATGTGATGATACATAAGGTTATGTATTAAATTTAGCCGCGTTCTAAACGACAAATATGTCCATATGGTGCACCTCTCAGTACAAATCTGTC
 TCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCGACACCCGCCCAACACCCGCTGACCGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGCATCCGCTTA
 CAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGAGCTGCATGTGTCAAGAGGTTTTCACCGTCAACCGAAACCGCGCAGAGAGAAAGGCGCTCGTGA
 TACGCCCTATTTTATAGGTTAATGTCTATGATAATAATGGTTTCTTAGACCTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCT
 AATTGTTTATTTTCTAAATAACATTCATAATGATATCCGCTCATGAGACAAATACCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAA
 GAGTATGAGTATTCACATTTCCGTTGTCGCCCTTATTCCTTTTTCGCGCATTTTTCGCTTCTGTTTTCCTGCTACCCAGAAACGCTGG
 TGAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCAGAGTGGTTACATCGAATCGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTT
 CGCCCGAAGAACGTTTTCATATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTAATCCCGTATTGACCGCGGCAAGAGCA
 ACTCGGTCCCGCATACACTATTCTCAGAAATGACTTGGTTGAGTACTCACAGTCAAGAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAA
 GAGAAATTATGAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTCTGACAAACGATCGGAGGACCGAAGAGCTAACCC
 GCTTTTTTGACAAACATGGGGATCATGTAACTCGCCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGA
 CACCACGATGCCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGGCGAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAG
 ACTGGATGGAGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATGCTGATAAATCTGGAGCCGGT

Figura 6A (cont.)

GAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAAGG
 AACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCCTCACTGATTAAGCATTTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATA
 TACTTTAGATGATTTAAACCTTCAATTTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCCTTTTGTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAAC
 GTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAAGACCCCGTAGAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCCTTTTTCGCGGTAATCTGCTGC
 TTGCAAAACAAAAAACCCGCTACCCAGCGGTGTTTGTTCGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAG
 CAGAGCGCAGATACCAATACTGTCCCTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCTACATACCTCG
 CTCTGCTAATCCTGTTACCAAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGCTTACCGGGTTGGA CTCAAGACGATAGTTACCGGATAAG
 GCGCAGCGGTCCGGCTGAACGGGGGGTTCTGTGCA CACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGA
 GCATTGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGCGGACAGGTATCCGGTAAAGCGGACAGGGTCGGAACAGGAGCGCACGAGGG
 AGCTTCCAGGGGAAACGCTGGTATCTTTATAGTCCCTGTGCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTGTGATGCTCGTCA
 GGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACCGGCCCTTTTACGGTTCCCTGGCCCTTTTGTGCTGCCCTTTTGTCTCATGTTCTTTCC
 TGCCTTATCCCCGTGATCTGTGGATAACCGTATTACCGCCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCCGAAACCGAGCGCAGCG
 AGTCAGTGAGCGGAGGAAGCGGAGAGCGCCCAATACGCAACCGCCCTCTCCCGCGGTTGGCCGATTTCATTAAATGCAGGTTAAACCTGG
 CTTATCGAAATTAAACGACTCACTATAGGGAGACCGGCAGATCGATCTGTCCGA

Figura 6B
Secuencia de ADN de pTRABacHuL λ HCy1

GCAGTTGTTGACGCCTTCCTCCGTGTGGCCGAACACGTCGAGCGGTGGTCGATGACCAAGCGCGGTGCCGACGCGACACAAG
TATCTGTACACCGAATGATCGTGGGCGAAGGCAAGTCGGCTCCAAAGTGGCAATATTGGCAAAATTCGAAAAATATACAGTTGGG
TTGTTTGGGCATATCTATCGTGGCGTTGGGCATGTACGTCCGAACGTTGATTTGCATGCAAGCCGAAATTAAATCATTTGGGATTAG
TGCGATTAAAACGTTGTACATCCTCGCTTTTAATCATGCCGTGATTAATCGCGCAATCGAGTCAAGTATCAAAAGTGTGGAATA
ATGTTTTCTTTGTATTCCCGAGTCAAGCGCAGCGGTATTTAAACAACTAGCCATCTTGTAAAGTTAGTTTCATTTTAATGCAACTT
TATCCAATAATATATTATGTATCGCACGTCAGAAATTAAATGCGCCGTTGTGCGCATCTCAACACGACTATGATAGAGATCAAA
TAAAGCGCGAATTAAATAGCTTGGACGCAACGTGCACGATCTGTGCAACGCTTCCGGCACGAGCTTTGATTTGTAATAAGTTTAA
CGAAGCGATGACATGACATGACCCCGTAGTGACAAACGATCACGCCCAAAAGAACTGCCGACTACAAAATTACCGAGTATGTCGGTGACGT
TAAACATATTAAAGCCATCCAAATCGACCGTTAGTCGAATCAGGACCGCTGGTGGAGAACCGCGAAAGTATGGCGAATGCATCGTAT
AACGTGTGGAGTCGGCTCATTTAGAGCGTCAATGTTTAGACAAGAAAGCTACATATTTAAATTGATCCCGATGATTTTATTTGATAAATT
GACCCCTAACTCCATACACGGTATTCTACAAATGGCGGGGTTTGGTCAAAATTTCCGGACTGCGGATGTCATGTCATGCTGTTAACGGCTC
CGCCCACTATTAAATGAAATTAAAAATTTTAAAAAACGACGCAAGAGAAACATTTGATGAAAGAAATGCGTAGAAGGAAAG
AAAAATGTCGTCGACATGCTGAACAACAAGATTAAATATGCCCTCCGTGTATAAAAAATAATTGAACGATTTGAAAGAAAAACAATGT
ACCGCGCGGGTATGTACAGGAAGAGGTTTATACTAAACTGTTACATTGCAAAACGTGGTTTCGTGTGCCAAGTGTGAAAAACCGAT
GTTTAATCAAGGCTCTGACGCAATTTACAAACCAAGCTCCAAAGTGTGGGTGAAGTCATGCATCTTTTAAATCAAAATCCCAAGAT
GTGTATAAACCAACTGCCAAAAATGAAAACTGTGACAAAGCTCTGTCCGTTGGTGGCAACTGCAAGGGTCTCAATCCCTAT
TTGTAATTATTGAATAATAAAACAATTATAATGCTAAATTTGTTTTTAAACGATACAAACCAACGCAACGAAACATTTGT
AGTATTATCTATAAATTGAAAAACGCGTAGTTATAATCGCTGAGGTAATAATTAAAAATCATTTTCAAAATGATTCACAGTTAAATTTGCG
ACAAATAAATTTTATTTTACATAAACTAGACGCCCTTGTGCTCTTCTCTCGTATTCCTTCTCTTTTTCATTTTTCCTCCTCATAA
AAATTAACATAGTTATTATCGTATCCCATATATGATCTATCGTATAGAGTAAATTTTGTGTCATAAAATATATATGTCCTTTTT
AATGGGGGTATAGTACCGCTGCGCATAGTTTTTCTGTAAATTACAACAGTGTATTTTCTGGTAGTTCTTCGGAGTGTGTGCTT
TAATTTATAAATTATATAATCAATGAATTTGGGATCGTCGGTTTGTGTAATAATGTTGCCGGCATAGTACGAGCTTCTTCTAGT
TCAATTACACCACTTTTGTAGCAGCACCGGATTAAACATACTTCCAAAAATGTTGTACGAACCGTTAAACAAAAACAGTTCACCTCC
CTTTTCTATACTATTGTCGCGAGCAGTTGTTTGTGTTTAAATAATAACAGCCATTGTAATGAGACGCAACAACTAATATCAACAAC
TGGAAATGTCTATCAATATATAGTTGCTGTATATCTCCCGAGCATGCCCTGCTATTTGCTTCCCAATCCTCCCCCTTGTCTGCTGCCC

Figura 6B (cont.)

[illegible]

Figura 6B (cont.)

GATGGCTGGACTATCTAATGGATTTTCGCTCAACGCCACAAAACCTTGCCAAATCTTGTAGCAGCAATCTAGCTTTGTGATATTTCG
 TTTGTGTTTTGTTTGTAAATAAGGTTTCGACGTCGTTCAAAATATATATGCGCTTTTGTATTTCTTTCATCACTGTGCTAGTGTAC
 AATTGACTCGACGTAAACACGTTAAATAAGCTAGCTTGGACATATTTAAACATCGGGCGTGTAGCTTTATTTAGGCCGATATCGT
 CGTCGTCCCAACCTTCGTGTTAGAAAGTTGCTTCGGAAGACGATTTTGCCATAGCCACACGACGCTATTAATTTGTGCGCTAAC
 ACGTCCGCGATCAAAATTGTAGTTGAGCTTTTGTGAATTAATTTCTGATTGGGGCGTTTTGGGGCGGTTTCAATCTAACTGTGCCC
 CGATTTTAATTACAGACAACACGTTAGAAAGCGATGGTGACGGGTGGTAACATTTACAGCGGCAAACTCTACTAATGGCGCGGTG
 GTGGAGCTGATGATAAATCTACCATCGGTGGAGCGGCGGGCTGGCGGCGGAGCGGAGGTGGTGGCGGTGATGCA
 GACGGCGGTTTAGGCTCAAAATGTCCTTTTAGGCAACACAGTCGGCACTCAACTATTGTACTGGTTTCGGGGCGGTTTGTGGTTT
 GACCGGCTCTGAGACGAGTGCATTTTTCGTTTCTAATAGCTTCCAAACAATTGTTGTCGTCTGCTCTAAAGGTGACGGGTTGAG
 GTTCCGTCGGCATTTGGTGGAGCGGGCGGCAATTCAGACATCGATGGTGGTGGTGGAGCGCTGGAATGTTAGGCACGGGA
 GAAGGTGGTGGCGGGTCCGCGGTATAATTTGTTCTGTTTAGTTTGTTCGCGCACGATTGTGGGCACCGCGCGAGCGCCGC
 TGGCTGCACAACGGAAGTCTGCTGCTTCGAGCGCAGCGCTGGGGTGGTGGCAATCAATATTAATTTGGAATACAAATCGTAAA
 AATCTGCTATAAGCATTTGTAATTTTCGCTATCGTTTACCGTCCGATATTTAAACACCGCTCAATGTAAGCAATTGTATTGTAAGA
 GATTGCTCAAGCTCCGACCGCCGATAACAAGCCTTTTCACTTTTACTACAGCATTTCTAGTGGCGAGACACTTCGCTGCTCGTGCAC
 TCGAGTTCTATAGTGTCACTTAATCGTATGTGTATGATACATAAGTTATGTAATTTAGTCCGCTTCTAACGACAAATATGT
 CCATATGGTGCACCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACCGCCCC
 TGACGGGCTTGTCTGCTCCCGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGAGCTGATGTGTCAGAGGTTTTCACCGTCTC
 ATCACCGAAACCGCGGAGAGAAAGGCTCTGCTGATACCGCTATTTTATAGTTAAATGTCATGATAATAATGTTTCTTAGACGT
 CAGGTGGCACTTTTCGGGGAATGTGCGGGAAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAAATATGATCCGCTCATGAGA
 CAATAACCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAATAAGGAAGATATGAGTATTCAACATTTCCGCTGTCGCCCTTATTCCTTTTTT
 TGCGGCATTTTGCTTCTGCTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGG
 GTTACATCGAATCTGATCTCAACAGCGGTAAATCTTTGAGAGTTTTCGCCCGGAGAACGTTTCCAAATGATGAGCACTTTTAA
 GTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTTATCCCGTATTGACCGCGGCAAGAACACTCGGTCCCGCATACACTATTCTCAGAAATGACTT
 GGTGAGTACTCACCAAGTACAGAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAAATATGACGTGCTGCCATAACCATGAGTG
 ATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTGTGACAAACATGGGGGATCATGTA
 ACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAACGACGAGCGTGACACACGATGCTGTAGCAATGGCAAC
 AACGTTGCGCAACTATTAACTGGCGAACCTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATAATAGACTGGATGGAGCGGATATAAGTTG
 CAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCGGCTGGCTGGTTTATGCTGATAAATCTGGAGCCGCTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATC
 ATTTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAA
 TAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCTCTCACTGATTAAGCATTTGTAACCTGTGACACCAAGTTTACTCATATATATCTTTAGATTGATT
 TAAAACCTTCATTTTTAAATTAAAGGATCTAGTGAAGATCCTTTTGTATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAAACGTGAGTTTTCG

Figura 6B (cont.)

TTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAAC
 AAAAAACCAACCGCTACAGCGGTGTTTGTGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAG
 CGCAGATACCAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCAACCGCCTACATACCTCGCT
 CTGCTAATCCTGTACCAAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAA
 GCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGTTTCGTGCACACAGCCCCAGCTTGAGCGAAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGC
 GTGAGCATTGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGAGAAAGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGACGGGTCCGGAACAGGAGAGCGC
 ACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAACGCCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTGTG
 ATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCCTTTTACGGTTCTTGCCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTC
 ACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCCGA
 ACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGGAGGAGCGGAAAGCGCCCAATACGCAAAACCGCCTCTCCC CGCGTTGGCCGATTCA
 TTAATGCAGGTTAACCTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCGGCAGATCGATCTGTCTGA

Figura 6C

GCAGTTTCGTTGACGCCCTTCCTCCGTGTGGCCGAACACGTCGAGCGGGTGGTTCGATGACCAGCGGGCTGCCGACCGCGACGCAACAAC
TATCTGTACACCGAATGATCGTCGGCGAAGGCACGTCGGCCTCCAAAGTGGCAATATTGGCAAAATTGGAAATATATACAGTTGGG
TTGTTTGGGCATATCTATCGTGGCGTTGGGCATGTACGTCGGAACGTTGATTGTCATGCAAGCCGAAATTAAATCATTTGCGATTAG
TGCGATTAAACGTTGTACATCCTCGCTTTTAAATCATGCCGTGATTAAATCGCGCAATCGAGTCAAGTGATCAAAAGTGTGGAATA
ATGTTTTCCTTTGTATTCCCGAGTCAAGCGCAGCGGTATTTTAACAAACTAGCCATCTTGTAAAGTTAGTTTCATTTAATGCAACTT
TATCCAATAATATATATGATTCGCACGTCGAAGATTAACAATGCGCCGTTGTCGCATCTCAACACGACTATGATAGAGATCAAA
TAAAGCGCGAATTAAATAGCTTGGCAGCGAACGTGACGATCTGTGCAACGGTTCGGCACGAGCTTTGATTGTAAATAAGTTTTTTA
CGAAGCGATGACATGACCCCGTAGTGACACGATCACGCCCAAAAGAACTGCCGACTACAAAAATTACCGAGTATGTCGGTGACGT
TAAAACTATTAAGCCATCCAAATCGACCGTTAGTTCGAATCAGGACCGCTGGTGCAGAAAGCCGGAAGTATGGCGAATGCATCGTAT
AACGTGTGGAGTCCGCTCATTTAGAGCGTCAATGTTTAGACAAGAAAGCTACATATTTAAATTGATCCCGATGATTTTATTGATAAATT
GACCTTAACCTCATAACCGGTATCTACAATGGCGGGTTTTTGGTCAAAATTTCCGGACTGCGATTGTACATGCTGTTAAACGGCTC
CGCCCACTATTAAATGAAATTAAAAATTTTAAAAAACGCAAGAGAAACATTTGTATGAAAGAAATGCGTAGAAGGAAAG
AAAAATGTCGTCGACATGCTGAACAAACAAGATTAAATATGCCCTCCGTGTATAAAAAATAATTGAAACGATTTGAAAGAAAAACAATGT
ACCGCGCGCGGTATGTACAGGAAGAGGTTTATACATAACTGTTACATTGCAAAACGTGGTTTTCGTGTGCCAAGTGTGAAAAACCGAT
GTTTAAATCAAGGCTCTGACGCATTCTACAACCCAGACTCCAAGTGTGTGGTGAAGTCATGCATCTTTTAAATCAAATCCC AAGAT
GTGTATAAACCAACCAACTGCCAAAAAATGAAAACTGTGCACAAGCTCTGTCCGTTTGTCTGGCAA CTGCAAGGGTCTCAATCCCTAT
TTGTAAATTATTGAATAATAAACAAATTATAATGCTAAATTTGTTTTTTTATTAAACGATACAAACCAACGCAACAAGACATTTGT
AGTATTATCTATAATTGAAAAACGCGTAGTTATAATCGCTGAGGTAATAATTAAAAATCATTTTCAAATGATTACAGTTAAATTTGCG
ACAAATAAATTTTATTTTACATAAACTAGACGCCCTTGTGCTCTCTCTTCGTATTTCCTTTTTCATTTTTCCTCCCTCATAA
AAATTAACATAGTTATTATCGTATCCATATATGATCTATCGTATAGAGTAAATTTTTTGTGTCAATAAATATATATGCTTTTTTT
AAATGGGGTGTATAGTACCGCTGCGCATAGTTTTTCTGTAATTTACAACAGTGTATTTTTCTGGTAGTTCTTCCGAGTGTGTTGCTT
TAAATTATAAATTATATAATCAATGAATTTGGGATCGTCGGTTTTTGTACAAATATGTTGCCGGCATAGTACGAGCTTCTTCTTAGT
TCAATTACACCAATTTTGTAGCAGCACCGGATTAAACATAACTTTCCAAAAATGTTGTACGAAACCGTTAAACAAAAACAGTTTCACTCC
CTTTTCTATACATATTGTCTGCGAGCAGTTGTTGTTGTTTAAAAATAAACAGCCATTGTAATGAGACGCACAAAACTAATATCACAAAAC
TGGAATGTCTATCAATATATATAGTTGCTGATATCTCCCGCATGCTGCTATTTGCTTCTCCCAATCCTCCCTTGTCTGCTGCTGCC

Figura 6C (cont.)

CCACCCACCCCCAGAAATAGAAATGACACCTACTCAGACAAATGCGATGCAATTTCCCTCAATTTATTAGGAAAGGACAGTGGGAGTG
 GCACCTTCCAGGGTCAAGGAAGGACGGGGAGGGGCAAAACAAGATGGCTGGCAACTAGAAGGCACAGTCGAGGCTGATCAGCG
 AGCTCTAGTCTAGACTATTATTACCCGGAGACAGGAGAGGCTCTTCTGCGTGTAGTGGTTGTGCAGAGCCTCATGTCATCACGGA
 GCATGAGAAAGACGTTCCCTGCTGCCACCTGCTCTTGTCCACGGTGAAGCTTGTCTGTAGAGGAAGAAGGAGCCGTCGGAGTCCAGCA
 CCGGAGGCGTGGTCTTGTAGTTGTCTCCGGCTGCCCATTTGCTCTCCCACTCCACGGCGATGTCGCTGGGATAGAAAGCCTTTTGACC
 AGGCAGGTCAGGCTGACCTGGTCTTGGTCAGCTCATCCCGGATGGGGCAGGGGTGACACCTGTGGTTCTCGGGGCTGCCCTTT
 GGCTTTGGAGATGGTTTCTCGATGGGGCTGGGAGGGCTTTGTTGGAGACCTTGCACTTGCACTCTGCTTGCATTTAGCCAGTCTCT
 GGTGCAGGACGGTGAGGACGCTGACCAACACGGTACGTGCTGTGTACTGCTCCTCCCGGGCTTTGTCTTGGCATTTATGCACCTCC
 ACGCGTCCACGTACCGATTGAACCTTGACCTCAGGGTCTTCGTGGCTCAGCTCCACCAACACCGCATGTGACCTCAGGGGTCCGGGA
 GATCATGAGGGTCTCCTTGGGTTTGGGGGGAAGAGGAAGACTGACGGTCCCCCAGGAGTTCAAGTGTGGGACCGTGGGCATG
 TGTGAGTTTGTCACAAGATTGGGCTCAACTTCTTGTCCACCTTGGTGTGTGGCTTGTGATTCAAGTTGCAGATGTAGGTG
 TGGGTGCCCAAGCTGCTGGAGGGCACGGTCAACCGTGTGAGGGAGTAGAGTCTGAGGACTGTAGGACAGCCGGGAAGGTGTG
 CACGCCGTGCTCAGGGCGCTGAGTTCCACGACACCGTCAACCGTTCGGGGAAGTAGTCTTGACCAAGCAGCCAGGGCCGCTG
 TGCCCCCAGAGGTGCTCTTGGAGGAGGGTGCCAGGGGAAGACCGATGGGCCCTTATCAAACTAGTGCACCGTTGACTAAGAAATTT
 CATGGCGCCGCTACGATTGTAAATAAAATGTAAATTACAGTATAGTATTTTAATTAAATATACAAATGATTTTGAATAATTTCTTA
 TTTAACTATAATAATTGTGTGGGTGGAATTAAAGGTCCCGGCACTCTCAATGCAATAATATCATAGTCCCCCTTGTGTGTAAGTG
 ATGCGTATTTCTGAACTTTGTAAATAAGCACACAGGACTCCAAACGGGTTTGGCGTTTATTTTCTTGTCTCGAGGATATCATGGAG
 ATAAATAAATGATAACCATCTCGCAAAATAAATAAGTATTTTACTGTTTTCGTAACAGTTTGTGTAATAAAACCTATAAAATATT
 CCGGATTATTATACCGTCCACCATCGGGCGTGTAGCGGATCCATGGTGGGACCTGTCATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTAGG
 CCTTTGATAACACCAAAGTGTCTTCACTTTCCCGGCTCTGTGTAGCAGCTTGAAATCTGGAACTGCGCTCTGTGTGTGCTGCTGAA
 TAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAAATCGGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGC
 AGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTTGACGCTGAGCAAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCCTGC
 GAAGTCACCCATCAGGGCTGAGCTCGGCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAATAGAAAGCTTGTGCTTGGATGGAA
 AGGAAAGAGTTCTACAGGGAAACTTGGACCCGCTTCAAGGAAGACAGCTTCCCATTTGTTAAACGACCAAGAGTGTGATGTTT
 TCCTTGTGTCAACATGCGTCCCACTAGACCCCAACCGTTGTTACAAATTCCTGGCCCCAACACGCTCTGCGTTCGACCCCGACTAT
 GTACCTCATGACGTGATTAGGATCGTCGAGCCTTCAATGGGTGGGACGCAACACGAGTACCGCATCAGCCTGGCTAAGAGGGCGG
 CGGCTGCCCAATAATGAACCTTCACTCTGTAGTACACCAACTCGTTTCGAAACAGTTTCATCGATCGTGTCTCTGGGAGAACTTCTTACA

Figura 6C (cont.)

AGCCCATCGTTTACATCGGTACCGACTCTGCTGAAGAGGAGGAAATTTCTCCTTGAAGTTTCCCTGGTGTTCAAAGTAAAGGAGTTT
 GCACCAGACGCACCTCTGTTTCACTGGTCCGGCGTATTAAACACGATACATTGTTATTAGTACATTTATTAAAGCGCTAGATTCTGT
 GCGTTGTTGATTTACAGACAAATTGTTGTACGTATTTTAAATAATTCATTAAATCTTTAGGGTGGTATGTTAGAGCGGAAAA
 TCAAAATGATTTTCAGCGCTCTTTATATCTGAATTTAAATATTAAATCCCTCAATAGATTGTAAATAGGTTTCGATTAGTTTCAAAC
 AAGGTTGTTTTTCCGAACCGATGGCTGGACTATCTAATGGAATTTTCGCTCAACGCCACAAACCTTGCCAAATCTTGTAGCAGCAA
 TCTAGCTTTGTGATATTCTGTTTGTGTTTTGTTTGTAAATAAAGGTTTCGACGTCGTTCAAAATATTATGCGCTTTTGTATTCTTT
 CATCACTGCTCGTTAGTGTACAAATTGACTCGACGTAAACACGTTAAATAAAGCTAGCTTGGACATATTAAACATCGGGCGGTGTAGC
 TTTATTAGGCCGATTAATCGTCTGTCGCCAACCCCTCGTCTGTTAGAAAGTTGCTTCCGAAGACGATTTTGCCATAGCCACACGACGCC
 TATTAATTGTGTCGGCTAACACGTCGCGGATCAAAATTTGTAGTTGAGCTTTTGGAAATTATTTCTGATTGCGGGCGTTTGTGGCG
 GGTTTCAA TCTAACTGTGCCCCGATTTTAATTCAGACAAACACGTTAGAAAGCGATGTTGTCAGGCGGTGTTAAACATTTTCAGACGGCAA
 ATCTACTAATGGCGCGGTGGTGGAGCTGATGATAAATCTACCATCGGTGGAGGCGCAGGCGGGGTGGCGGCGGAGCGGAGCGG
 GAGTGGTGGCGGTGATGCAGACGGCGGTTTAGGCTCAAATGTCCTTTTAGGCAACACAGTCGGCACTCAACTATTGTACTGGTT
 TCGGGCGCGTTTTTGGTTTGACCGGCTGAGACGAGTGCATTTTTTTCGTTTCTAATAGCTTCCAAACAATTGTTGTCTGTCTGTC
 TAAAGGTGCAGCGGTTGAGGTTCCGTCGGCATTTGGTGGAGCGGCGCAATTCAGACATCGATGGTGGTGGTGGTGGAGGCGG
 CTGGAATGTTAGGCACGGGAGAGGTGGTGGCGCGGTGCCCGGTATAATTTGTTCTGTTTAGTTTGTTCGCGCACGATTTGTG
 GGCACCGGCGCAGCGCGCTGGCTGCACAAACGGAAGTCTGCTGCTCGAGGCGAGCGCTTGGGGTGGTGGCAATTCAAATATTATA
 ATTGGAATACAAATCGTAAATACTGTCTATAAGCAATTGTAAATTTGCTATCGTTTACCGTGGCGATATTTAAACAACCGCTCAATGT
 AAGCAATTGTATTGTAAAGAGATTGTCTCAAGCTCCGACCGCGGATAACAAGCCTTTTCAATTTTACTACAGCATTTAGTGGCGA
 GACACTTCGCTGCTCGACTCGAGTTCTATAGTGTACCTTAAATCGTATGTTGTATGATACATAAAGGTTATGTATTAAATTGTAGCC
 GCGTTCTAACGACAAATATGTCCATAATGGTGCACCTCTCAGTACAACTCTGCTGATGCCGCAATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCCGC
 CAACACCCGCTGACCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGCTCTCCGGAGCTGCATG
 TGTACAGAGTTTTTACCCGTCAACCGAAACCGCGGAGAGAAAGGGCTCGTGATACGCCCTATTTTATAGGTTAAATGTCTATGAT
 AATAATGGTTTTCTTAGACGTGAGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTTCTAAATACATTCAA
 ATATGATCCGCTCATGAGACAAATAACCTTGATAAATGCTTCAATAATTTGAAAAGGAAAGAGTATGAGTATTCACACATTTCCCGT
 GTCGCCCTTATTCCTTTTTTGCGGCATTTTGGCTTCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGTTGAAAGTAAAGATGCTGAAGA
 TCAGTTGGGTGCACGAGTGGTTACATCGAACTGGAATCTCAACAGCGGTAAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGGAAGACGTTTTTC
 CAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCGCGGCAAGAGCAACTCGGTCGCGCGCAT

Figura 6C (cont.)

CACTATTCTCAGAAATGACTTGTTGAGTACTCACCCAGTCAACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAAATTATGCAG
 TGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTGTGC
 ACAACATGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGAAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAAACGACGAGCGTGACACCCAG
 ATGCC'TGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAATCTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAAATAGACTG
 GATGGAGGGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTG
 AGCGTGGGCTCGCGGTATCATTTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCA
 GCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGTGCCCTCACTGATTAAAGCATTTGGTAACTGTCAAGCAAGTTTACTC
 ATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCAATTTTAAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTGTGATAAATCTCATGACCAAAA
 TCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTCTGCGC
 GATAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAG
 CACCGCCTACATACTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTCTTACCGGTTGGACTCA
 AGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGGGTGAAACGGGGGTTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACAC
 CGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCATTTGAGAAAAGCGCCACGCTTCCGAAGGGAGAAAAGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCA
 GGGTCGGAAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAGCCCTATGGAAAAACGCCAGCAACCGGCCCTTTTACGGTTCCCTGGC
 CTTGAGCGTCGATTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCCTATGGAAAAACGCCAGCAACCGGCCCTTTTACGGTTCCCTGGC
 CTTTGTGCTGGCCTTTTGTCTCATGTCTTCTTCCGTGTTATCCCTGATTTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTTGTAGTGAGCTG
 ATACCGCTCGCCGACCCGAAACGACCGGCGCAGGAGTCAGTAGCGGAGGAAAGCGGAGAGCGCCCAATACGCAAAACCGCCTCTC
 CCGCGCGTTGGCCGATTCAATTAATGCAGGTTAACTGGCTTATCGAAAATTAAATACGACTCACTATAGGGAGACCGGCAGATCGAT
 CTGTCTGA

Figura 6D

Secuencia de ADN de pTRABacHuLC λ HCy1 + rellenos

GCAGTTCGTTGACGCCCTTCCTCGTGTGGCCGAACACGTCGAGCGGGTGGTTCGATGACCAAGCGGGTCCGCGACGCGACGCAC
AAGTATCTGTACACCGAATGATCGTCGGGCGAAGGCAAGTCGGCTCCAAGTGGCAATATATTGGCAAAATTCGAAAAATATATACA
GTTGGGTGTTTGGCGCATATCTATCGTGGCGTTGGGCATGTACGTCCGAACGTTGATTTGCATGCAAGCCGAAATTAATCAT
TGCGATTAGTCCGATTAAAAAGTTGTACATCCTCGCTTTTAATCATGCCGTGATTAAATCGCGCAATCGAGTCAAGTGATCA
AAGTGTGAATAATGTTTCTTTGTATTCCCGAGTCAAGCGCAGCGGTATTAAACAACTAGCCATCTTTGTAAGTTAGTTT
CATTAAATGCAACTTTATCCAAATAATAATTATGTATCGCACGTCAAGAAATTAACAATGCGCCCGTTGTTCGCATCTCAACACG
ACTATGATAGAGATCAATAAAGCGCGAATTAAATAGCTTGGCAGCAACGTCGTACGATCTGTGCAACGCTTCCGGCACGAGC
TTTGATTGTAATAAGTTTTTACGAAGCGATGACATGACCCCGTAGTGACAACGATCACGCCCAAAAGAACTGCCGACTACAA
AATTACCGAGTATGTCGGTGACGTTAAACTATTAAAGCCATCCAATCGACCGTTAGTCGAATCAGGACCCGCTGGTCCGAGAAG
CCGCGAAGTATGGCGAATGCATCGTATAACGTGTGGAGTCCGCTCATTAGAGCGTCATGTTTAGACAAGAAAGCTACATATTT
AATTGATCCCGATGATTTTATTGATAAAATTGACCCCTAATCCATACACGGTATTCTACAATGGCGGGGTTTGGTCAAAAATTT
CCGACTGCGGATTGTACATGCTGTTAACGGCTCCGCCACTATTAAATGAATTAATAATTCCAATTTTAAAAACGCGAGCAAG
AGAAACATTTGTATGAAGAATGCGTAGAAGGAAAGAAAAATGTCTCGACATGCTGAACAACAAGATTAAATATGCCTCCGTG
TATAAAAAAATAATTGAACGATTTGAAAGAAAAACAATGTACCGCGCGGGTATGTACAGGAAGAGGTTTATACATAAACCTGTT
ACATTGCAAAACGTGGTTTCGTGTGCCAAGTGTGAAAAACCGATGTTTAAATCAAGGCTCTGACGCAATTCTACAACCCAGACTCC
AAGTGTGTGGTGAAATCATGTCATCTTTTAAATCAATCCAGATGTGTATAAACCCAAAATGCCCCAAAATGAAAACTGT
CGACAAGCTCTGTCCGTTTGTGGCAACTGCAAGGGTCTCAATCCTATTGTGAATTAATGAATAATAAAAACAATTATAAATGC
TAAATTTGTTTTTTATTAACGATACAAACCAACGCAACAAGAACATTTGTAGTATTATCTATAATTTGAAAAACGCGTAGTTAT
AATCGCTGAGGTAATATTAAAAATCATTTTCAATGATTCACAGTTAATTTGCGACAAATATAATTTTATTTTCACATAAACTA
GACGCCCTGTCTCTCTCTCGTATTCCTTCTCTTTTCAATTTTCTCCTCATAAAAATTAACATAGTTATTATTCGTATCC
ATATATGTATCTATCGTATAGAGTAAAAATTTTTTGTGTGTCATAAATAATAATGTCTTTTTTTTAAATGGGGTGTATAGTACCGCTGC
GCATAGTTTTTCTGTAAATTACAAACAGTGTCTATTTTCTGGTAGTTCTTCCGGAGTGTGTGCTTTTAATTAATTAATAATTTATATAA
TCAATGAATTTGGGATCGTCGGTTTTTGTACAAATATGTTGCCGGCATAGTACGAGCTTCTTCTAGTTTCAATTACACCATTTTT
TAGCAGCACCGGATTAAACATAACTTTCCAAAAATGTTGTACGAACCGTTAAACAAAAACAGTTCACTCCCTTTTCTATATCTAT
TGTCTGCGAGCAGTTGTTTGTGTTTAAAAATAACAGCCATTGTAATGAGACGCACAACTAATATACAAAACTGGAAATGTCT

ATCAATATATAGTTGCTGATATCTCCCCAGCATGCCCTGCTATTGTCTTCCCAATCTCCTCCCTTGTCTGCTCCTCCACCCCA
CCCCCAGAAATAGAAATGACACCTACTCAGACAATGCGATGCAATTTCTCTCAATTTATTAGGAAAAGGACAGTGGAGTGGCACC
TTCCAGGTCAGGAAGGACCGGGGAGGGCAACAACAGATGGCTGGCAACTAGAAAGGACAGTCGAGGCTGATCAGCGAG
CTCTAGTCTAGACTATTATTATCCCGGAGACAGGAGAGGCTCTTCTGCGTGTAGTGTGTGTCAGAGCCTCATGCTATCACGG
AGCATGAGAAAGACGTTCCCTGCTGCCACTGTCTTTGTCCACGGTGAGCTTGTGTAGAGGAAGAGGAGCCGTCGGAGTCC
AGCACGGGAGGCGTGGTCTTGTAGTTGTTCTCCGGCTGCCCATTTGCTCTCCACTCCACGGCGAIGTCGCTGGGATAGAAGCC
TTTGACCAGGCAGGTGAGGCTGACCTGGTCTTGGTCAGCTCATCCCGGATGGGGCAGGGTGTACACCTGTGGTCTCTCGGG
GCTGCCCTTTGGCTTTGGAGATGGTTTTCTCGATGGGGCTGGAGGGCTTTGTGTGGAGACCTTGCACTTGTACTCTCTTGCCCA
TTTACGCCAGTCTGCTGTCAGGAACGGTGAGGACGCTGACACACGGTACGTGCTGTGTACTGCTCCTCCCGGGCTTTTGTCTT
GGCATTATGCACCTCCACGCCGTCACCGTACCAGTTGAACTTGACCTCAGGGTCTTCGTGGCTCACGTCCACCCACCGCATG
TGACCTCAGGGGTCCGGGAGATCATGAGGGTGTCCTTGGGTTTGGGGGAAGAGGAAGACTGACGGTCCCCCAGGAGTTCA
GGTGTGGGCAACGGTGGGATGTGTGAGTTTGTCAAGAATTGGGCTCAACTTTCTTGCTCAACCTTGGTGTGCTGGGCTT
GTGATTCACGTTGCAGATGTAGGTCTGGGTGCCAAGCTGCTGGAGGGCACGGTCACCAACGCTGCTGAGGGAGTAGAGTCCCTG
AGGACTGTAGGACAGCCGGGAAAGGTGTGCACGCCGCTGGTCAGGGCGCTGAGTTCCACGACACCGTCAACCGGTTCCGGGGAAG
TAGTCTTTGACCAGGCAGCCACGGGCCGCTGTGTGCCCCAGAGGTGCTCTTGGAGGAGGTTGCCAGGGGGAAGACCGAATGGGCC
CTATCAAAACTAGTGCAACGTTGACTAAGAATTTTCATGCGGCCCGGTACGATTGTAAATANAATGTAATTTACAGTATAGTAT
TTTAATTAAATATACAAATGATTTGATAATAATTTCTATTAACTATAATATATTGTGTGGTGTAAATTAAGGTCCCGGCAT
CCTCAAATGCATAATATCATAGTCCCCCTTGTGTAGTGTATGTCGATTTCTGAATCTTTGTAAATATAGCACACAGGACTCCA
ACCGGTTTGGCGTTTTATTTTCTTGCTCGAGGATATCATGGAGATAATTAAATATGATAACCATCTCGCAATAATAATAGTATT
TTTACTGTTTTCGTAACAGTTTTGTATAAATAAAACCTATAAATAATCCGGATTATTATACCGTCCACCATCGGGCGTGTCTA
GGCGGATCCATGGTGGGACCCTGCAATGCTGCTGCTGCTGCTAGGCCTTTGATAAACACCCAGTGTCACTCTGTTCCCGC
CCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCCAACAAAGCCACACTGGTGTGCTCTCATAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCC
TGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGGCGGAGTGGAGACCAACCAACCTCCAAACAAAGCAACAAGTACCGCGCCAG
CAGCTACCTGAGCCTGACGCTGAGCAGTGGAAGTCCCAAAAAGCTACAGTGTCCAGGTACCGCATGAAGGGAGCACCGTGG
AGAAGACAGTGGCCCCCTACAGAAATGTTTCATAGTAAAGCTTTGTGTTGGATGGAAAGGAAAAGAGTTCTACAGGGAAAACCTTGG
ACCCGCTTCATGGAAGACAGCTTCCCCATTGTTAACGACCAAGAAGTGAATGGATGTTTTCTTGTGTCAACATGCGTCCCAC
TAGACCCAAACCGTTGTTACAAATTCCTGCGTTCGCAACCCGACTATGTACCTCATGACGTGATTAGGA

Figura 6D (cont.)

TCGTCGAGCCCTTCATGGGTGGCAGCAACAACGAGTACCAGTACCGCATCAGCCTGGCTAAGAAGGGCGGGCTGCCCAATAATGAAC
 CTTCACTCTGAGTACACCAACTCGTTTGAACAGTTTCATCGATCGTGTCTATCTGGGAGAACTTCTACAAGCCCATCGTTTACAT
 CGGTACCGACTCTGCTGAAGAGAGGAAATTCCTCTTGAAGTTTCCCTGGTGTCAAAGTAAAGGAGTTTGCACACAGACGCAC
 CTCTGTTCACTGGTCCGGCGTATTAAACAACGATACATTGTTATTAGTACATTATTAAAGCGCTAGATTCTGTGCGTTGTTGA
 TTTACAGACAAATGTTGTACGTATTTTAATAAATTCATTAAATTTTATAATCTTTAGGGTGGTATGTTAGAGCGAAAAATCAAATG
 ATTTTCAGCGCTCTTTATATCTGAATTTAAATATTAATCCCTCAATAGATTGTAAAAATAGGTTTCGATTAGTTTCAAACAAGG
 GTTGTTTTCCGAACCGATGGCTGGACTATCTAATGGATTTCGCTCAACGCCACAAAACTTGCCAAATCTTGTAGCAGCAAT
 CTAGCTTTGTGATATTCTGTTTGTGTTTGTGTTTGTAAATAAAGGTTTCGACGTCGTTCAAATAATATATGCGCTTTTGTATTCT
 TTCATCACTGTCGTTAGTGTACAAATTGACTCGACGTAACAACGTTAAATAAAGCTAGCTTGGACATATTTAAACATCGGGCGTG
 TTAGCTTTATTAGGCCGATTATCGTCGTCGTCGCCAACCCCTCGTCTGTTAGAAAGTTGCTTCCGAAGACGATTTTGCCCATAGCCAC
 ACGACGCCATTAAATTGTGTCGGCTAACACGTCGCCGATCAAAATTTGTAGTTGAGCTTTTGTGAAATTAATTTCTGATTGCGGGC
 GTTTTGGGCGGGTTTCAATCTAACTGTGCCCCGATTAAATTCAGACAACACGTTAGAAAGCGATGGTGCAGGCGGTGGTAAC
 ATTTAGACGGCAATCTACTAATGGCGCGGTGGTGGAGCTGATGATAAATCTACCATCGGTGGAGGCGCAGGCGGGCTGG
 CGGCGGAGGCGGAGGTTGGTGGCGGTGATGCAGACGGCGGTTTAGGCTCAAATGTCTCTTTAGGCAACACAGTCGGCA
 CCTCAACTATTGTACTGTTTCGGGCGCCGTTTGTGTTTGACCGGTCTGAGACGAGTGCAGATTTTTTCGTTTCTAATAGCT
 TCCAACAAATTGTGTCGTCCTAAAGGTGCAGCGGTTGAGGTTCCGTCGGCATTTGGTGAGCGGGCGGCAATTCAGACAT
 CGATGGTGGTGGTGGAGCGCTGGAATGTTAGGCACGGGAGAAAGTGGTGGCGGCGGTGCCCGGATAAATTTGTT
 CTGGTTTAGTTTTCGGCACGATTGTGGGCACCGGCGCAGGCGCGCTGGCTGCACAACGGAAGGTCGTCTGCTTCGAGGC
 AGCGCTTGGGTGGTGGCAATTCAATATTAATAATTGGAATACAATCGTAAAAATCTGCTATAAGCATTTGTAATTTGCTATC
 GTTTACCGTGCCGATATTAAACAACCGCTCAATGTAAGCAATTGTAATTGTAAGAGATTGTCTCAAGCTCCGACGCCGATAA
 CAAGCCTTTTCATTTTACTACAGCATTTGTAGTGGCAGACACTTCGCTGTCGTCGACTCGAGTTCTATAGTGTACCTAAAT
 CGTATGTGATGATACATAAGGTTATGTTAATTGTAGCCGCTTCTAACGACAATAATGTCCTATATGTTGTCACCTCTCAGTAC
 AATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCACCCCGACACCCCGCTGACCGGCTTGTCTGCTCC
 CGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTACAGGTTTTCACCGTCAACCGAAACGCGCG
 AGAGGAAAGGCGCTCGTGATACGCCCTATTTTATAGGTTAATGTCAATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTAGGTGGCACTTT
 TCGGGGAAATGTGCGGGAACCCCTATTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAAATATGTAATCCGCTCATGAGACAATAACCCCT
 GATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGATATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCCCCCTATTCCCTTTTTCGCGCA

Figura 6D (cont.)

TTTTGCCTTCCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGATAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTA
 CATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGGAAGAACGTTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAG
 TTCTGCTATGTGGCGGGTATTATCCCGTATTGACCGCCGGCAAGAGCAACTCGGTCCCGCATACACTATTCTCAGAAATGAC
 TTGGTTGAGTACTCACAGTCAAGAAAGCATCTTA CGGATGGCATGACAGTAAGAGAAATTATGCAGTGTCTGCCATAACCAT
 GAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAAACGATCGGAGGACCCGAAGAGCTAAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGG
 ATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAACGACGAGCGTGACACACGATGCTGTGA
 GCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGA
 GCGGATAAAGTTGCAGGACCCTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGC
 GTGGGTCTCGCGGTATCATTTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCGTAATCGTAGTTATCTACAGACGGGGAGTCAG
 GCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCTCTCACTGATTAAGCAATTGGTAACCTGTCAGACCAAGTTTA
 CTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCACTTTTAAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTGATAATCTCATGA
 CCAAAATCCCTTAACTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAGATCAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTT
 TTTCTGCGCGTAACTCTGCTGCTTGCAACAACAAACCAACCGCTACCGGTGGTTTTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAAC
 TCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAACTACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACT
 TCAAGAACTCTGTAGCACCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTGT
 CTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTCTGTGCACACAGCCAG
 CTTGGAGCGGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCATTTGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGG
 CGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAACCGCTGGTATCTTTAT
 AGTCCTGTGCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGTAGCGTCTGATTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCCTATGGAAAAACGC
 CAGCAACGCGGCCCTTTTACGGTTCTTGCCCTTTTGTGCGCTTTTGTCTCACAATGTTCTTTCTGCGTTATCCCTGATTTCTG
 TGGATAACCGGTATTACCGCCTTTGAGTGAAGTGTATACCGCTCGCCGCGAGCCGACCGAGCGCAGGAGTCAGTGAGCGGAG
 GAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAACCGCCTCTCCCCGCGGTGGCCGATTCAATTAATGCAGGTTAAACCTGGCTTATCGA
 AATTAAACGACTCATATAGGGAGACCGGCAGATCTGTCTGA