



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 304 235**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/09** (2006.01)

**C12N 15/62** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**C07K 16/24** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01978851 .2**

86 Fecha de presentación : **22.10.2001**

87 Número de publicación de la solicitud: **1327680**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **16.07.2003**

54 Título: **Anticuerpo agonista de TPO modificado.**

30 Prioridad: **20.10.2000 JP 2000-321821**  
**17.04.2001 WO PCT/JP01/03288**  
**12.09.2001 JP 2001-277314**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.10.2008**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.10.2008**

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

72 Inventor/es: **Tsuchiya, Masayuki;**  
**Ohtomo, Toshihiko;**  
**Yabuta, Naohiro;**  
**Tsunoda, Hiroyuki y**  
**Orita, Tetsuro**

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 304 235 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

Anticuerpo agonista de TPO modificado.

5 **Campo técnico**

Esta invención se refiere a anticuerpos modificados que contienen dos o más regiones V de la cadena H y dos o más regiones V de la cadena L de un anticuerpo que muestra actividad agonista de TPO por reactividad cruzada del receptor de la TPO. Los anticuerpos modificados tienen actividad agonista de TPO de transducción de una señal dentro de las células por reactividad cruzada del receptor de TPO y son útiles como medicamento para diferentes propósitos.

**Antecedentes de la invención**

La trombopoyetina (TPO) es un factor de regulación de la producción de plaquetas encontrado en 1994 y se sabe que está compuesto de una glicoproteína que tiene un peso molecular de 70-80.000 producida principalmente en el hígado. La trombopoyetina es una citoquina que en la médula ósea promueve la supervivencia, proliferación, diferenciación y maduración de las células precursoras de plaquetas, es decir promueve la diferenciación y proliferación de megacariocitos. El receptor de trombopoyetina (TPO) se identificó antes que la TPO como c-Mpl, un receptor de un factor específico para regular la producción de plaquetas (M. Souyri y col., *Cell* 63: 1137 (1990)). Se ha publicado que c-Mpl está distribuido principalmente en las células precursoras de plaquetas, megacariocitos y células plaquetarias y que la supresión de la expresión de c-Mpl inhibe selectivamente la formación de megacariocitos (M. Methia y col., *Blood* 82: 1395 (1993)). Se ha publicado que el ligando de c-Mpl es la TPO, basándose en los resultados del ensayo de proliferación de células específicas para el ligando de c-Mpl y purificación del ligando usando c-Mpl (F. de Sauvage y col., *Nature* 369: 533 (1994); TD. Bartley y col., *Cell* 77: 1117 (1994)). Actualmente Mpl se denomina receptor de la TPO. Por lo tanto, se esperaba que la TPO y los agonistas del receptor de la TPO funcionaran como un agente terapéutico para la trombocitopenia, por ejemplo, como un medicamento para aliviar la trombocitopenia causada por la inhibición de la médula ósea o la terapia de resección de la médula ósea para pacientes de cáncer.

Por otra parte, se desarrollaron anticuerpos modificados, en especial anticuerpos con tamaño molecular reducido, por ejemplo, Fv de cadena sencilla, para mejorar la permeabilidad hacia el interior de tejido y tumores reduciendo el tamaño molecular, y a producir por un procedimiento recombinante. Recientemente, se han usado los dímeros de Fv de cadena sencilla, en especial dímeros biespecíficos, para la reactividad cruzada de células. Los ejemplos típicos de dichos dímeros son heterodímeros de Fv de cadena sencilla que reconocen antígenos de células de cáncer y antígenos de células huésped tales como células NK y neutrófilos (Kipriyanov y col., *Int. J. Cancer*, 77, 9763-9772, 1998). Se produjeron por la técnica de construcción de Fv de cadena sencilla en forma de anticuerpos modificados, que son más eficaces para tratar cánceres por inducción de reactividad cruzada intercelular. Se ha pensado que la reactividad cruzada intercelular es inducida por anticuerpos y sus fragmentos (p. ej., fragmento Fab), anticuerpos modificados biespecíficos e incluso dímeros de Fv de cadena sencilla, que son mono-específicos.

Como anticuerpos capaces de transducir una señal por reactividad cruzada con una molécula o moléculas de superficie celular, se conocen un anticuerpo contra el receptor de EPO implicado en la diferenciación y proliferación celular (documento JP-A 2000-95800), un anticuerpo contra el receptor MuSK (Xie y col., *Nature Biotech.* 15, 768-771, 1997) y otros. También se conocen un anticuerpo agonista del receptor de TPO, sus fragmentos y Fv de cadena sencilla (documento WO99/10494). Sin embargo, no se han descrito dímeros de Fv de cadena sencilla ni anticuerpos modificados tales como los anticuerpos bivalentes de cadena sencilla que tengan actividad agonista.

Al observar que los monómeros de Fv de cadena sencilla derivados de anticuerpos monoclonales (anticuerpo MABL-1 y anticuerpo MABL-2 producidos por los autores de la invención) que inducen apoptosis de las células que contienen IAP, no inducían la apoptosis de células y que los dímeros inducían apoptosis, los autores de la invención descubrieron que los dímeros reaccionan cruzadamente (dimerizan) con el receptor de IAP sobre la superficie celular, de modo que se transduce una señal al interior de las células y, como resultado, se induce la apoptosis. Esto sugiere que los dímeros de Fv de cadena sencilla mono-específicos reaccionan cruzadamente con una molécula(s) de superficie celular (p. ej., receptor) y transducen una señal como un ligando, sirviendo así como un agonista.

Centrándose en la reactividad cruzada intercelular, se descubrió que los dímeros de Fv de cadena sencilla mencionados antes no producen hemaglutinación, mientras que los anticuerpos monoclonales mencionados antes sí lo hacen. Se observó el mismo resultado con los anticuerpos bivalentes de cadena sencilla (polipéptidos de cadena sencilla que contienen dos regiones V de la cadena H y dos regiones V de la cadena L). Esto sugiere que los anticuerpos monoclonales pueden formar enlaces intercelulares mientras que los anticuerpos modificados como los dímeros de Fv de cadena sencilla y los anticuerpos bivalentes de cadena sencilla reaccionan cruzadamente con una molécula(s) de superficie celular pero no forman enlaces cruzados intercelulares.

Basándose en estas observaciones, los autores de la invención acaban de descubrir que los anticuerpos modificados tales como los dímeros de Fv de cadena sencilla y los anticuerpos bivalentes de cadena sencilla reaccionan cruzadamente con una molécula(s) de superficie celular o molécula(s) intracelular(es) de la misma célula, además de la reactividad cruzada intercelular conocida, y son adecuados como un ligando para la o las moléculas (en especial como un ligando que imita la acción del ligando natural).

Con el descubrimiento adicional de que una molécula de anticuerpo (IgG entera) se puede modificar en dímeros de Fv de cadena sencilla, anticuerpos bivalentes de cadena sencilla y similares, que reaccionan cruzadamente con una molécula(s) de superficie celular, reduciendo así los efectos secundarios producidos por la reactividad cruzada intercelular, y proporcionando así medicamentos nuevos que inducen sólo el efecto deseado en la célula, los autores de la invención completaron la invención. Los anticuerpos modificados de la invención tienen una actividad notablemente alta comparado con los anticuerpos enteros (IgG) que tienen la misma región V que los anticuerpos modificados. Tienen una permeabilidad mejorada en los tejidos debido al tamaño molecular reducido comparado con las moléculas de anticuerpo y a la falta de regiones constantes.

## 10 Descripción de la invención

Un objeto de esta invención es proporcionar anticuerpos modificados de forma agonista de tamaño molecular pequeño que contengan dos o más regiones V de la cadena H y dos o más regiones V de la cadena L de un anticuerpo monoclonal y tengan acción agonista de TPO por reactividad cruzada con el receptor de TPO.

Por lo tanto, esta invención se refiere a los anticuerpos modificados que contienen dos o más regiones V de la cadena H y dos o más regiones V de la cadena L, preferiblemente de 2 a 6 cada una, en especial preferiblemente de 2 a 4 cada una, lo más preferiblemente dos cada una, y muestran actividad agonista de TPO por reactividad cruzada con el receptor de TPO.

Los “anticuerpos modificados” en esta memoria descriptiva quieren definir cualquier sustancia que contenga dos o más regiones V de la cadena H y dos o más regiones V de la cadena L, en la que dichas regiones V se combinan directamente o por un conector por enlace covalente o enlace no covalente. Por ejemplo, polipéptidos y compuestos producidos combinando cada región V del anticuerpo por un conector peptídico o un agente químico de reactividad cruzada, y similares. Las dos o más regiones V de la cadena H y dos o más regiones V de la cadena L usadas en la invención pueden derivar del mismo anticuerpo o de diferentes anticuerpos.

Los anticuerpos modificados de la invención pueden ser de cualquier forma siempre que reconozcan específicamente y reaccionen cruzadamente con el receptor de TPO y de esta forma puedan transducir una señal al interior de las células. Incluyen anticuerpos modificados producidos por modificación adicional de una parte de la secuencia de aminoácidos de la región V de los anticuerpos modificados.

Los ejemplos preferidos de los anticuerpos modificados de la invención son multímeros tales como dímeros, trímeros o tetrámeros de Fv de cadena sencilla que contienen una región V de la cadena H y una región V de la cadena L, o polipéptidos de cadena sencilla que contienen dos o más regiones V de la cadena H y dos o más regiones V de la cadena L. Cuando los anticuerpos modificados de la invención son multímeros de Fv de cadena sencilla tal como dímeros, trímeros, tetrámeros y similares, que contienen una región V de la cadena H y una región V de la cadena L, se prefiere que la región V de la cadena H y la región V de la cadena L que existen en la misma cadena no estén asociadas para formar un sitio de unión al antígeno.

Más preferiblemente, los ejemplos son dímeros de Fv de cadena sencilla que contienen una región V de la cadena H y una región V de la cadena L, o un polipéptido de cadena sencilla que contiene dos regiones V de la cadena H y dos regiones V de la cadena L. La región V de la cadena H y la región V de la cadena L preferiblemente están conectadas por un conector en los anticuerpos modificados.

El multímero de Fv de cadena sencilla mencionado antes incluye un multímero por enlace no covalente, un multímero por un enlace covalente a través de un radical de reactividad cruzada y un multímero a través de un reactivo de reactividad cruzada (un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o anticuerpo modificado bivalente). Los radicales de reactividad convencionales cruzada usados para hacer reaccionar cruzadamente péptidos se pueden usar como los radicales de reactividad cruzada para formar los multímeros. Son ejemplos la reactividad cruzada disulfuro por restos de cisteína, otros radicales de reactividad cruzada tales como alquilenos C<sub>4</sub>-C<sub>10</sub> (p. ej., tetrametileno, pentametileno, hexametileno, heptametileno y octametileno, etc.) o alquilenos C<sub>4</sub>-C<sub>10</sub> (cis/trans-3-butileno, cis/trans-2-pentenileno, cis/trans-3-pentenileno, cis/trans-3-hexenileno, etc.).

Además, el reactivo de reactividad cruzada que se puede combinar con un Fv de cadena sencilla es, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos que opcionalmente se puede introducir en Fv, por ejemplo, un anticuerpo contra la secuencia FLAG y similar o un fragmento del mismo, o un anticuerpo modificado originado a partir del anticuerpo, por ejemplo, Fv de cadena sencilla.

La “acción agonista de TPO” en la memoria descriptiva significa una acción biológica que se produzca en la(s) célula(s) al interior de la cual una señal es transducida por reactividad cruzada con el receptor de TPO, por ejemplo, la proliferación, diferenciación o estimulación de crecimiento de megacariocitos, o producción de plaquetas.

La DE50 de la acción agonista de TPO en la invención se determina por procedimientos conocidos para medir la acción agonista. Los ejemplos de la medición son el ensayo de proliferación celular usando líneas celulares sensibles a TPO tales como BaF/mpl o UT7/TPO, medición de la fosforilación de la proteína MPL, ensayo de colonia de megacariocitos por diferenciación a partir de células de la médula ósea, ensayo de síntesis de recuperación de plaquetas de ratón *in vivo*, medición de la inducción de la expresión del antígeno de plaquetas GPIIb/IIIa (anti-GPIIb/IIIa) usando

## ES 2 304 235 T3

una línea celular megacarioblástica de leucemia humana (CMK) o medición de la inducción poliploide de una línea celular megacarioblástica (DAMI). DE50 es una dosis necesaria para alcanzar el 50% de reacción de la actividad máxima fijada como 100% en la curva de dosis-reacción.

5 Los anticuerpos modificados preferidos de la invención tienen actividad agonista de TPO (DE50) equivalente a o mejor que la de un anticuerpo que tiene la misma región de unión al antígeno que el anticuerpo modificado, es decir el anticuerpo entero (en lo sucesivo “anticuerpo original”) como la IgG que tiene la misma pareja de región V de la cadena H y región V de la cadena L que la pareja de región V de la cadena H y región V de la cadena L que forma la región de unión al antígeno del anticuerpo modificado. Más preferibles son los que tienen una acción agonista de TPO  
10 (DE50) que es más de dos veces mayor que la del anticuerpo original, preferiblemente además de más de 5 veces, lo más preferiblemente de más de 10 veces. La invención incluye anticuerpos modificados, con acción agonista de TPO que contienen región V de la cadena H y región V de la cadena L que forma la misma región de unión al antígeno que el anticuerpo original que se une al receptor de TPO, pero que no tiene la acción agonista de TPO frente a la molécula.

15 Los compuestos que contienen dos o más regiones V de la cadena H y dos o más regiones V de la cadena L de la invención pueden ser cualesquiera compuestos que contengan dos o más regiones V de cadena la H y dos o más regiones V de la cadena L del anticuerpo y muestren acción agonista de TPO (DE50) equivalente o mejor que la de la trombopoyetina (TPO). Se prefieren los que tienen acción un agonista de TPO (DE50) más de dos veces mayor que la de la TPO, más preferiblemente de más de 5 veces, lo más preferiblemente de más de 10 veces.

20 Los “compuestos” mencionados en este documento incluyen no sólo los anticuerpos modificados de la invención, sino también cualquier compuesto que contenga dos o más, preferiblemente de 2 a 6, más preferiblemente de 2 a 4, lo más preferiblemente 2 regiones de unión al antígeno tal como los anticuerpos enteros o F(ab')<sub>2</sub>.

25 Los anticuerpos modificados o compuestos preferidos de la invención que contienen dos o más regiones V de la cadena H y dos o más regiones V de la cadena L del anticuerpo tienen una acción de adhesión intercelular (DE50) no mayor que 1/10 comparado con el anticuerpo original, más preferiblemente no tiene acción sustancial de adhesión intercelular.

30 La DE50 de la acción de adhesión intercelular mencionada antes se determina por procedimientos conocidos para medir la acción de adhesión intercelular, por ejemplo, por medición de la aglomeración de células que expresan el receptor de TPO.

35 La invención se refiere a ADN que codifican los anticuerpos modificados.

La invención se refiere a células animales o microorganismos que producen los anticuerpos modificados.

La invención se refiere al uso del anticuerpo modificado como agonista de TPO.

40 La invención se refiere a un procedimiento de transducción de una señal al interior de células por reactividad cruzada con el receptor de TPO usando el anticuerpo modificado e induciendo de esta forma la acción agonista de TPO, tal como la proliferación, inducción-diferenciación o estimulación de crecimiento de megacariocitos, producción de plaquetas, fosforilación de la proteína receptora de TPO y similares.

45 La invención se refiere a un medicamento para tratar la trombocitopenia etc. que contiene el anticuerpo modificado como componente activo.

La invención se refiere al uso del anticuerpo modificado como un medicamento.

50 La invención se refiere a un procedimiento de selección o medición del anticuerpo modificado, que contiene dos o más regiones V de la cadena H y dos o más regiones V de la cadena L del anticuerpo y muestra acción agonista de TPO por reactividad cruzada con el receptor de TPO, que comprende 1) preparar un anticuerpo modificado que contiene dos o más regiones V de la cadena H y dos o más regiones de la cadena L del anticuerpo y se une específicamente al receptor de TPO, 2) poner en contacto el anticuerpo modificado con células que expresan el receptor de TPO,  
55 y 3) medir la acción agonista de TPO que ocurre en las células por reactividad cruzada con el receptor de TPO. El procedimiento de medición es útil para el control de calidad en la producción de anticuerpos modificados de la invención como medicamento y para *otros propósitos*.

60 Los anticuerpos modificados pueden ser anticuerpos modificados monoespecíficos o anticuerpos modificados multiespecíficos como anticuerpos modificados biespecíficos. Se prefieren los anticuerpos modificados monoespecíficos.

65 La presente invención también se refiere a anticuerpos modificados cuya región V de la cadena H y/o región V de la cadena L es la región V de la cadena H derivada del anticuerpo humano y/o la región V de la cadena L derivada del anticuerpo humano. La región V de la cadena H y/o la región V de la cadena L derivadas del anticuerpo humano se pueden obtener por selección de bibliotecas de anticuerpos monoclonales humanos como se describe en el documento WO99/10494. También están incluidas la región V de la cadena H y la región V de la cadena L derivadas de los anticuerpos monoclonales humanos producidos por ratones transgénicos y similares.

## ES 2 304 235 T3

La presente invención se refiere además a anticuerpos modificados cuyas regiones V de la cadena H y/o regiones V de la cadena L son regiones V de la cadena H humanizadas y/o regiones V de la cadena L humanizadas. Específicamente, los anticuerpos modificados humanizados consisten en la región V de la cadena L humanizada que comprende regiones marco (FR) derivadas de una región V de la cadena L del anticuerpo monoclonal humano y regiones determinantes de la complementariedad (en lo sucesivo "CDR") derivadas de una región V de la cadena L de anticuerpo monoclonal de mamífero no humano (p. ej., ratón, rata, animal bovino, oveja, mono) y/o la región V de la cadena H humanizada que comprende la FR derivada de una región V de la cadena H de anticuerpo monoclonal humano y la CDR derivada de una región V de la cadena H de anticuerpo monoclonal de mamífero no humano (p. ej., ratón, rata, animal bovino, oveja, mono). En este caso, las secuencias de aminoácidos de la CDR y FR pueden estar parcialmente alteradas, p. ej., eliminadas, sustituidas o añadidas.

Las regiones V de la cadena H y/o regiones V de la cadena L de los anticuerpos modificados de la invención pueden ser regiones V de la cadena H y/o regiones V de la cadena L derivadas de anticuerpos monoclonales de animales distintos del ser humano (tal como ratón, rata, animal bovino, oveja, mono, pollo y similares). En este caso, las secuencias de aminoácidos de la CDR y FR pueden estar parcialmente alteradas, p. ej., eliminadas, sustituidas o añadidas.

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

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

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

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

La presente invención también se refiere al uso de anticuerpos modificados como agonistas de TPO. Es decir, se refiere a un agonista de transducción de señales que comprende como un principio activo el anticuerpo modificado obtenido como se ha mencionado antes.

Por lo tanto, las preparaciones farmacéuticas que contienen los anticuerpos modificados agonistas de TPO de la invención como un principio activo son útiles como agentes de prevención y/o remedios para las enfermedades sanguíneas relacionadas con la reducción de plaquetas, trombocitopenia producida por quimioterapia de cáncer o leucemia y similares.

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

### Región V de la cadena H

En la presente invención, la región V de la cadena H derivada de un anticuerpo reconoce el receptor de TPO y oligomeriza, por ejemplo, dimeriza por reactividad cruzada con dicha molécula, y de esta forma transduce una señal al interior de las células. La región V de la cadena H de la invención incluye regiones V de la cadena H derivadas de un mamífero (p. ej., ser humano, ratón, rata, animal bovino, oveja, mono etc.) y regiones V de la cadena H que tienen secuencias de aminoácidos parcialmente modificadas de las regiones V de la cadena H. Es más preferida una región V de la cadena H humanizada que contienen la FR de la región V de la cadena H de un anticuerpo monoclonal humano y la CDR de la región V de la cadena H de un anticuerpo monoclonal de ratón. También se prefiere una región V de la cadena H que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de un ser humano, que se puede producir por una técnica de recombinación. La región V de la cadena H de la invención puede ser un fragmento de la región V de la cadena H mencionada, cuyo fragmento conserva la capacidad de unión al antígeno.

### Región V de la cadena L

En la presente invención, la región V de la cadena L reconoce el receptor de TPO y oligomeriza, por ejemplo, dimeriza por reactividad cruzada con dicha molécula, y de esta forma transduce una señal al interior de las células. La región V de la cadena L de la invención incluye regiones V de la cadena L derivadas de un mamífero (p. ej.,

## ES 2 304 235 T3

ser humano, ratón, rata, animal bovino, oveja, mono etc.) y regiones V de la cadena L que tienen secuencias de aminoácidos parcialmente modificadas de las regiones V de la cadena L. Es más preferida una región V de la cadena L humanizada que contienen la FR de la región V de la cadena L de un anticuerpo monoclonal humano y la CDR de la región V de la cadena L de anticuerpos monoclonales de ratón. También se prefiere una región V de la cadena L que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de un ser humano, que se puede producir por una técnica de recombinación. Las regiones V de la cadena L de la invención pueden ser fragmentos de la región V de la cadena L, cuyos fragmentos conservan la capacidad de unión al antígeno.

### 10 *Región determinante de la complementaridad (CDR)*

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

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

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

25

### *Fv de cadena sencilla*

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

40

### *Anticuerpo modificado de cadena sencilla*

Los anticuerpos modificados de cadena sencilla de la presente invención comprenden dos o más regiones V de la cadena H y dos o más regiones V de la cadena L, preferiblemente de dos a cuatro de cada, en especial se prefiere que cada una comprenda dos o más regiones V de la cadena H y regiones V de la cadena L, como se ha mencionado antes. Cada región del péptido debe estar dispuesta de modo que el anticuerpo de cadena sencilla modificado forme una estructura estérica específica, en concreto que mimetice una estructura estérica formada por el dímero de Fv de cadena sencilla. Por ejemplo, las regiones V están dispuestas ordenadas de la siguiente forma:

50

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

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

55

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

### *Conector*

60

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

65

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

5

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

10

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

15

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

20

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

25

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

30

**(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)<sub>n</sub> y****(Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>n</sub>**

en los que n es un número entero no menor de 1. La longitud preferida del conector peptídico varía dependiendo del receptor que va a ser el antígeno, en el caso de Fv de cadena sencilla normalmente se prefiere el intervalo de 1 a 20 aminoácidos. En el caso de anticuerpos modificados de cadena sencilla que comprenden dos o más regiones V de la cadena H y dos o más regiones V de la cadena L, los conectores peptídicos que conectan las que van a formar el mismo sitio de unión al antígeno que comprenden [región V de la cadena H]-[región V de la cadena L] (o [región V de la cadena L]-[región V de la cadena H]) tienen longitudes de 1-30 aminoácidos, preferiblemente 1-20 aminoácidos, más preferiblemente 3-18 aminoácidos. Los conectores peptídicos que conectan las que no forman el mismo sitio de unión al antígeno que comprenden [región V de la cadena H]-[región V de la cadena L] (o [región V de la cadena L]-[región V de la cadena H]) tienen longitudes de 1-40 aminoácidos, preferiblemente 3-30 aminoácidos, más preferiblemente 5-20 aminoácidos. El procedimiento para introducir estos conectores se describirá en la explicación para la construcción del ADN que codifica los anticuerpos modificados de la invención.

Los conectores sintetizados químicamente, es decir, los agentes químicos de reactividad cruzada, de acuerdo con la invención pueden ser cualesquiera conectores usados de forma convencional para la unión de péptidos. Los ejemplos de conectores pueden incluir N-hidroxisuccinimida (NHS), suberato de disuccinimidilo (DSS), bis(suberato de sulfosuccinimidilo) (BS<sup>3</sup>), ditiobis(propionato de succinimidilo) (DSP), ditiobis(propionato de sulfosuccinimidilo) (DTSSP), etilenglicol-bis(succinato de succinimidilo) (EGS), etilenglicol-bis(succinato de sulfosuccinimidilo) (sulfo-EGS), tartrato de disuccinimidilo (DST), tartrato de disulfosuccinimidilo (sulfo-DST), bis[2-(succinimido-oxicarbonilo)etil]sulfona (BSOCOES), bis[2-(sulfosuccinimido-oxicarbonilo)etil]sulfona (sulfo-BSOCOES) o similares. Estos están disponibles en el comercio. Se prefiere que los conectores sintetizados químicamente tengan la longitud equivalente a la de los conectores peptídicos.

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

#### *Preparación de anticuerpos modificados*

Los anticuerpos modificados se pueden producir por conexión, a través del conector mencionado, de una región V de la cadena H y una región V de la cadena L derivadas de anticuerpos conocidos o nuevos que se unen específicamente al receptor de TPO. Como ejemplos de Fv de cadena sencilla se citan los que tienen la región V de la cadena H y la región V de la cadena L del anticuerpo 12B5 y el anticuerpo 12E10 descritos en el documento WO99/10494. Como ejemplos de los anticuerpos modificados de la invención que tienen dos o más regiones V de la cadena H y dos o más

## ES 2 304 235 T3

regiones V de la cadena L se citan el *dímero* de sc12B5 (conector: 15 aminoácidos), *dímero* de sc12E10 (conector: 15 aminoácidos), *dímero* de db12B5 (conector: 5 aminoácidos), *dímero* de db12E10 (conector: 5 aminoácidos), *sc12B5sc* (Fv)<sub>2</sub> y *sc12E10sc*(Fv)<sub>2</sub> que contienen las regiones V de la cadena H y regiones V de la cadena L derivadas de los anticuerpos monoclonales mencionados antes.

Para preparar los *anticuerpos* modificados, se puede unir un péptido señal a su extremo N-terminal si se desea que el polipéptido sea un péptido secretorio. Se puede unir una secuencia de aminoácidos conocida útil para la purificación del polipéptido tal como la secuencia FLAG, para la purificación eficaz del polipéptido. En este caso se puede formar un dímero usando un anticuerpo anti-FLAG.

Para preparar el anticuerpo modificado de la invención hay que obtener un ADN, es decir un ADN que codifica el Fv de cadena sencilla o un ADN que codifica el polipéptido de cadena sencilla reconstruido. Estos ADN, en especial para sc12B5, db12B5, sc12E10 y/o db12E10 se pueden obtener a partir de los ADN que codifican las regiones V de la cadena H y las regiones V de la cadena L derivadas de dichos Fv. También se pueden obtener por el procedimiento de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando esos ADN como un molde y amplificando la parte del ADN contenida en el mismo que codifica la secuencia de aminoácidos deseada con ayuda de una pareja de cebadores correspondiente a ambos extremos de la misma.

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

Para determinar los cebadores para la amplificación por PCR, se determinan los tipos de cadena H y cadena L por un procedimiento de tipificación conocido en el campo técnico si se usa un anticuerpo monoclonal como material de partida.

Para amplificar las regiones V de la cadena L del anticuerpo 12B5 y el anticuerpo 12E10 por PCR, los cebadores oligonucleótidos del extremo 5' y extremo 3' se deciden como se ha mencionado antes. De la misma forma, se deciden los cebadores oligonucleótidos del extremo 5' y extremo 3' para la amplificación de las regiones V de la cadena H del anticuerpo 12B5 y anticuerpo 12E10.

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

Se usan cebadores específicamente diseñados para la PCR para que proporcionen las secuencias de nucleótidos adecuadas en el extremo 5' y el extremo 3' de los ADNc que codifican las regiones V de los anticuerpos 12B5 y 12E10, de modo que los ADNc se insertan fácilmente en el vector de expresión y funcionan adecuadamente en el vector de expresión (p. ej., esta invención planea aumentar la eficacia de la transcripción insertando la secuencia Kozak). Las regiones V de los anticuerpos 12B5 y 12E10 obtenidas por amplificación por PCR usando estos cebadores se insertan en el vector de expresión HEF que contiene la región C humana deseada (véase el documento WO 92/19759). Los ADN clonados se pueden secuenciar usando cualquier procedimiento convencional, por ejemplo, mediante un secuenciador de ADN automático (Applied Biosystems).

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

Cada región V del anticuerpo modificado de la presente invención se puede humanizar usando técnicas convencionales (p. ej., Sato, K. y col., *Cancer Res.*, 53, 1-6 (1993)). Una vez que se ha preparado un ADN que codifica cada uno de los Fv humanizados, se puede producir fácilmente un Fv de cadena sencilla humanizado, un fragmento del Fv de cadena sencilla humanizado, un anticuerpo monoclonal humanizado y un fragmento del anticuerpo monoclonal humanizado, de acuerdo con procedimientos convencionales. Preferiblemente las secuencias de aminoácidos de sus regiones V se pueden modificar parcialmente, si es necesario.



## ES 2 304 235 T3

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

Cuando los anticuerpos modificados de la invención son anticuerpos modificados biespecíficos, se pueden producir por procedimientos conocidos (por ejemplo, el procedimiento descrito en el documento (WO9413804).

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

Cuando el Fv de cadena sencilla reconstruido de la presente invención se produce por cultivo de una célula animal tal como células COS7 o células CHO, preferiblemente células CHO, en un medio sin suero, el dímero de dicho Fv de cadena sencilla formado en el medio se puede recuperar establemente y purificar con un rendimiento alto. Así, el dímero purificado se puede conservar de forma estable durante un periodo largo. El medio sin suero usado en la invención puede ser cualquier medio usado de forma convencional para la producción de una proteína recombinante, sin limitación.

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

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

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

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

La actividad de unión al antígeno del anticuerpo modificado preparado antes, se puede evaluar por un procedimiento convencional tal como radioinmunoensayo (RIA), ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISA) o resonancia de plasmón superficial. También se puede evaluar usando la capacidad inhibidora de unión del anticuerpo original como un índice, por ejemplo, en términos de la ausencia o presencia de inhibición de la unión de dicho anticuerpo monoclonal al antígeno dependiente de la concentración.

Más en detalle, se cultivan células animales transformadas con un vector de expresión que contiene un ADN que codifica el anticuerpo modificado de la invención, p. ej., células COS7 o células CHO. Las células cultivadas y/o el líquido sobrenadante del medio o el anticuerpo modificado purificado de los mismos, se usan para determinar la unión al antígeno. Como control se usa un líquido sobrenadante del medio de cultivo en el que se han cultivado células transformadas sólo con el vector de expresión. En el caso de un antígeno, por ejemplo, el anticuerpo 12B5 y el anticuerpo 12E10, se añade una muestra de ensayo del anticuerpo modificado de la invención o un líquido sobrenadante del control a células Ba/F3 que expresan MPL humana y después se lleva a cabo un ensayo, tal como citometría de flujo, para evaluar la actividad de unión al antígeno.

La evaluación *in vitro* del efecto de transducción de señal (por ejemplo, proliferación, inducción-diferenciación o estimulación de crecimiento de megacariocitos, producción de plaquetas o fosforilación de la proteína del receptor de

TPO) se lleva a cabo de la siguiente forma. Se añade una muestra de ensayo del anticuerpo modificado mencionado antes a las células que expresan el anticuerpo o células en las que se ha introducido el gen para el anticuerpo, y se evalúa por el cambio producido por la transducción de señal (por ejemplo, proliferación específica de antígeno de MPL humana, medición de la fosforilación de proteínas o expresión del antígeno específico de plaquetas) usando procedimientos convencionales.

La evaluación *in vivo* se lleva a cabo por administración a ratones de un anticuerpo monoclonal que reconoce la MPL, un anticuerpo modificado de la invención y PBS como control, y evaluación de la fuerza de la actividad por el cambio de la cantidad de plaquetas en el suero de ratón.

Como se ha mencionado antes, los anticuerpos modificados de la invención se pueden obtener preparando anticuerpos modificados que contienen dos o más regiones V de la cadena H y dos o más regiones V de la cadena L y que se unen específicamente al receptor de TPO, y seleccionando los anticuerpos modificados por evaluación *in vivo* o *in vitro* como se ha mencionado antes.

Los anticuerpos modificados de la invención, que comprenden dos o más regiones V de la cadena H y dos o más regiones V de la cadena L, preferiblemente dos a cuatro cada una, más preferiblemente dos cada una, pueden ser un dímero del Fv de cadena sencilla que comprende una región V de la cadena H y una región V de la cadena L, o un polipéptido de cadena sencilla en el que dos o más regiones V de la cadena H y dos o más regiones V de la cadena L están conectadas. Se considera que debido a esta construcción, el péptido imita la estructura tridimensional de la TPO y por lo tanto retiene una excelente propiedad de unión al antígeno y *actividad agonista de TPO*.

Los anticuerpos modificados de la invención tienen un tamaño molecular notablemente reducido comparado con la molécula de anticuerpo original (p. ej., IgG), y por lo tanto, tienen una permeabilidad superior en tejidos y tumores y una actividad mayor que la molécula de anticuerpo monoclonal original. Por lo tanto, los anticuerpos modificados de la invención pueden transducir eficazmente la señal de TPO al interior de las células. Las preparaciones farmacéuticas que los contienen son útiles para tratar las enfermedades sanguíneas relacionadas con la reducción de plaquetas y la trombocitopenia causada por quimioterapia para cánceres o leucemia. Se espera además que el anticuerpo de la invención se pueda usar como un agente de contraste por marcaje RI. El efecto se puede potenciar por unión de un compuesto RI o una toxina.

### **Mejor modo para llevar a cabo la invención**

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

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

### **Ejemplos**

#### Ejemplo comparativo 1

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

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

#### 1.1 Preparación del ARN mensajero (ARNm)

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

#### 1.2 Síntesis de ADNc bicatenario

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

## ES 2 304 235 T3

1.3 *Amplificación por PCR de genes que codifican regiones variables de un anticuerpo por PCR, se llevó a cabo usando un ciclador térmico (PERKIN ELMER)*

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

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

10 50  $\mu$ l de solución para la PCR contienen 5  $\mu$ l de 10 x tampón para la PCR II,  $MgCl_2$  2 mM, dNTP 0,16 mM (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), 2,5 unidades de una ADN polimerasa, AmpliTaq Gold (PERKIN ELMER), 0,2  $\mu$ M del cebador adaptador del ID SEC N° 1, 0,2  $\mu$ M del cebador MKC del ID SEC N° 2 y 0,1  $\mu$ g del ADNc bicatenario derivado de MABL-1. La solución se precalentó a 94°C de temperatura inicial durante 9 minutos y después se calentó a 94°C durante 1 minuto, a 60°C durante 1 minuto y a 72°C durante 1 minuto 20 segundos, en este orden. Este ciclo de temperatura se repitió 35 veces y después la mezcla de reacción se calentó más a 72°C durante 10 minutos.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

45 1.4 *Purificación de los productos de la PCR*

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

50 1.5. *Ligado y transformación*

55 Se ligaron aproximadamente 140 ng del fragmento de ADN que comprendía el gen que codifica la región V de la cadena L de tipo kappa de ratón derivada de MABL-1 como se ha preparado antes, con 50 ng del vector pGEM-T Easy (Promega) en el tampón de reacción que comprendía Tris-HCl 30 mM (pH 7,8),  $MgCl_2$  10 mM, ditiotritol 10 mM, ATP 1 mM y 3 unidades de ADN ligasa T4 (Promega) a 15°C durante 3 horas.

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

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

## ES 2 304 235 T3

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

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

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

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

### 15 Ejemplo comparativo 2

#### *Secuenciación del ADN*

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

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

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

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

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

### 35 Ejemplo comparativo 3

#### *Determinación de la CDR*

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

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

50

TABLA 1

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

65

## ES 2 304 235 T3

### Ejemplo comparativo 4

#### *Identificación de la expresión del ADNc clonado*

#### 5 *Preparación del anticuerpo MABL-1 quimérico y el anticuerpo MABL-2 quimérico*

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

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

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

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

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

##### 4.2 *Preparación de vectores que expresan anticuerpos MABL-2 quiméricos*

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

##### 4.3 *Transfección a células COS7*

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

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

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

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

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

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

##### 4.4. *Citometría de flujo*

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

## ES 2 304 235 T3

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

### 5 Ejemplo comparativo 5

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

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

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

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

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

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

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

50 50  $\mu$ l de solución en la primera etapa de la PCR comprenden 5  $\mu$ l de 10 x tampón para la PCR II,  $MgCl_2$  2 mM, dNTP 0,16 mM, 2,5 unidades de una ADN polimerasa, AmpliTaq Gold (PERKIN ELMER), 0,4  $\mu$ M de cada uno de los cebadores y 5 ng de cada ADN molde. La solución de la PCR se precalentó a 94°C de temperatura inicial durante 9 minutos y después se calentó a 94°C durante 1 minuto, a 65°C durante 1 minuto y a 72°C durante 1 minuto 20 segundos, en este orden. Este ciclo de temperatura se repitió 35 veces y después la mezcla de reacción se calentó más a 72°C durante 7 minutos.

Los productos de la PCR A-B (371 pb), C-D (63 pb) y E-F (384 pb) se purificaron usando el kit de purificación de la PCR QIAquick (QIAGEN) y se ensamblaron en la segunda PCR. En la segunda PCR, 98  $\mu$ l de una solución de PCR que comprendía 120 ng del producto A-B de la primera PCR, 20 ng del producto C-D de la PCR y 120 ng del producto E-F de la PCR, 10  $\mu$ l de 10 x tampón de la PCR II,  $MgCl_2$  2 mM, dNTP 0,16 mM, 5 unidades de ADN polimerasa AmpliTaq Gold (PERKIN ELMER), se precalentaron a 94°C de temperatura inicial durante 8 minutos y después se calentaron a 94°C durante 2 minutos, a 65°C durante 2 minutos y a 72°C durante 2 minutos, en este orden.  
60 Este ciclo de temperatura se repitió dos veces y después se añadieron a la reacción respectivamente 0,4  $\mu$ M de cada uno de los cebadores A-F. La mezcla se precalentó a 94°C de temperatura inicial durante 1 minuto y después se calentó a 94°C durante 1 minuto, a 65°C durante 1 minuto y a 72°C durante 1 minuto 20 segundos, en este orden. Este ciclo de temperatura se repitió 35 veces y después la mezcla de reacción se calentó más a 72°C durante 7 minutos.

65 Un fragmento de ADN de 843 pb producido por la segunda PCR se purificó y se digirió con NcoI y EcoRI. El fragmento de ADN resultante se clonó en el vector pSCFVT7. El vector de expresión pSCFVT7 contiene una secuencia señal pelB adecuada para el sistema de expresión periplásmico de *E. coli* (Lei, S.P. y col., *J. Bacteriology*, 169, 4379-4383, 1987). Después de la secuenciación del ADN, el plásmido que contiene el fragmento de ADN que codifica

## ES 2 304 235 T3

la secuencia de aminoácidos correcta del Fv de cadena sencilla reconstruido del anticuerpo MABL-1 se denomina "pscM1" (véase la Figura 5). La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos del Fv de cadena sencilla reconstruido del anticuerpo MABL-1 contenida en el plásmido pscM1 se muestran en el ID SEC N° 20.

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

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

15 100 ml de solución para la PCR que comprendía 10 ml de 10 x tampón para la PCR II, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, dNTP 0,16 mM, 5 unidades de una ADN polimerasa, AmpliTaq Gold, 0,4 mM de cada uno de los cebadores y 8 ng del ADN molde (pscM1) se precalentaron a 95°C de temperatura inicial durante 9 minutos y después se calentaron a 95°C durante 1 minuto, a 60°C durante 1 minuto y a 72°C durante 1 minuto 20 segundos, en este orden. Este ciclo de temperatura se repitió 35 veces y después la mezcla de reacción se calentó más a 72°C durante 7 minutos.

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

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

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

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

### 5.3 Transfección a células COS7

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

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

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

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

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

El líquido sobrenadante del cultivo de células COS7 transfectadas con el vector pCHOM2 y el líquido sobrenadante del cultivo de células COS7 transfectadas con el vector pCHO1 como control, se sometieron a electroforesis en SDS

## ES 2 304 235 T3

y se transfirieron a una membrana REINFORCED NC (Schlecher & Schuell). La membrana se bloqueó con leche desnatada al 5% (Morinaga Nyu-gyo), se lavó con Tween 20-PBS al 0,05% y se mezcló con un anticuerpo anti-FLAG (SIGMA). La membrana se incubó a temperatura ambiente, se lavó y se mezcló con anticuerpo IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (Zymed). Después de incubar y lavar a temperatura ambiente, se añadió la solución de sustrato (Kirkegaard Perry Laboratories) para el revelado de color (Figura 7).

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

### 5.5 Citometría de flujo

La citometría de flujo se llevó a cabo usando el líquido sobrenadante del cultivo de células COS7 antes mencionadas para medir la unión al antígeno. Se añadió el líquido sobrenadante del cultivo de células COS7 que expresan el Fv de cadena sencilla reconstruido del anticuerpo MABL-2 o el líquido sobrenadante del cultivo de células COS7 transformadas con el vector pCHO1 como control a  $2 \times 10^5$  células de la línea celular de leucemia de ratón L1210 que expresa la proteína asociada a integrina (IAP) humana o de la línea celular L1210 transformada con pCOS1 como control. Después de incubar sobre hielo y lavar, se añadió el anticuerpo anti-FLAG de ratón (SIGMA). Después las células se incubaron y se lavaron. Después se le añadió el anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con FITC (BECTON DICKINSON) y las células se incubaron y lavaron otra vez. Posteriormente, se midió la intensidad de la fluorescencia usando el aparato FACScan (BECTON DICKINSON).

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

### 5.6 ELISA competitivo

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

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

Los resultados pusieron de manifiesto que el Fv de cadena sencilla reconstruido del anticuerpo MABL-2 (MABL2-scFv) inhibía de forma evidente de forma dependiente de la concentración la unión del anticuerpo MABL-2 de ratón al antígeno IAP humano en comparación con el líquido sobrenadante del cultivo de células COS7 a las que se había introducido pCHO1 como control (Figura 12). Por consiguiente, se sugiere que el Fv de cadena sencilla reconstruido del anticuerpo MABL-2 tiene la estructura correcta de cada una de las regiones V del anticuerpo monoclonal de ratón MABL-2.

### 5.7 Efecto de inducción de apoptosis *in vitro*

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

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

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



## ES 2 304 235 T3

### 5.8 Expresión de Fv de cadena sencilla derivado de MABL\_2 en células CHO

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

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

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

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

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

#### (1) Cromatografía en columna en Sefarosa azul

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

#### (2) Hidroxapatito

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

#### (3) Filtración en gel

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

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

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

Como cebador directo para la PCR se diseñó el cebador Nde-VHSm02 mostrado en el ID SEC N° 27 para que hibridara con un ADN que codifica el extremo N-terminal de la región V de la cadena H y para que contuviera un

## ES 2 304 235 T3

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

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

El producto de la PCR se purificó usando el kit de purificación de PCR QIAquick (QIAGEN) y se digirió con NdeI y EcoRI, y después el fragmento de ADN resultante se clonó en el vector pSCFVT7, del cual se había eliminado la secuencia señal pelB por digestión con NdeI y EcoRI. Después de secuenciar el ADN, el plásmido resultante que comprende un fragmento de ADN con la secuencia de ADN deseada se denomina “pscM2DEm02” (véase la Figura 23). La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos del Fv de cadena sencilla derivado del anticuerpo MABL-2 contenida en el plásmido pscM2DEm02 se muestran en el ID SEC N° 29.

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

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

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

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

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

El cuerpo de inclusión que comprendía la proteína deseada se lisó en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) que contenía urea 6 M, EDTA 5 mM y NaCl 0,1 M y se aplicó en columna de filtración en gel Sephacryl S-300 (5 x 90 cm, Amersham Pharmacia) equilibrada con tampón de Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) que contenía urea 4 M, EDTA 5 mM, NaCl 0,1 M y mercaptoetanol 10 mM con un caudal de 5 ml/minuto para separar los Fv de cadena sencilla con peso molecular alto asociados. Las fracciones obtenidas se analizaron con SDS-PAGE y las fracciones con pureza alta de la proteína se diluyeron con el tampón usado en la filtración en gel hasta DO<sub>280</sub>=0,25. Después, las fracciones se dializaron tres veces frente a tampón de Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) que contenía EDTA 5 mM, NaCl 0,1 M, Arg 0,5 M, glutatión 2 mM en la forma reducida y glutatión 0,2 mM en la forma oxidada con el fin de volver a plegar la proteína. Además, la fracción se dializó tres veces frente a tampón de acetato 20 mM (pH 6,0) que contenía NaCl 0,15 M para intercambiar el tampón.

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

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

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

## ES 2 304 235 T3

En el primer protocolo, se añadieron los anticuerpos de las muestras con una concentración final de 3  $\mu\text{g/ml}$  a  $5 \times 10^4$  células de hIAP/L1210 y se cultivaron durante 24 horas. Se analizaron los anticuerpos de las muestras, es decir, el monómero y el dímero de Fv de cadena sencilla de MABL-2 de las células CHO obtenidas en el Ejemplo 5.9, el monómero y el dímero del Fv de cadena sencilla de MABL-2 de *E. coli* obtenido en el ejemplo 5.12, y el anticuerpo IgG de ratón como control. Después del cultivo, se llevó a cabo la tinción con Anexina-V y se midió la intensidad de fluorescencia usando el aparato FACScan (BECTON DICKINSON).

En el segundo protocolo, los anticuerpos de las muestras con una concentración final de 3  $\mu\text{g/ml}$  se añadieron a  $5 \times 10^4$  células de la línea celular hIAP/L1210, se cultivaron durante 2 horas y se mezclaron con anticuerpo anti-FLAG (SIGMA) con una concentración final de 15  $\mu\text{g/ml}$  y después se cultivaron durante 22 horas. Se analizaron los anticuerpos de las muestras del monómero del Fv de cadena sencilla de MABL-2 de células CHO obtenidos en el Ejemplo 5.9 y el anticuerpo IgG de ratón como control. Después del cultivo, se llevó a cabo la tinción con Anexina-V y se midió la intensidad de fluorescencia usando el aparato FACScan.

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

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

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

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

#### (2) Preparación de anticuerpos para la administración

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

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

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

#### (4) Administración de anticuerpos

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

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

El efecto antitumoral del monómero y el dímero del polipéptido scFv/CHO con el ratón modelo de mieloma humano se evaluó en términos de cambio de la concentración de IgG humana (proteína M) en el suero de ratón y el tiempo de supervivencia del ratón. El cambio de concentración de IgG humana se determinó midiéndola en el suero de ratón recogido 24 días después del trasplante de células KPMM2, por el ELISA descrito antes en (1). La

cantidad de IgG humana (proteína M) en el suero del grupo al que se le había administrado PBS(-) (control) aumentó a aproximadamente 8500  $\mu\text{g/ml}$ , mientras que la cantidad de IgG humana del grupo al que se le había administrado el dímero de scFv/CHO era notablemente baja, es decir, tan baja como una décima parte o menos que la del grupo de control. Por lo tanto, los resultados muestran que el dímero de scFv/CHO inhibe fuertemente el crecimiento de las células KPMM2 (Figura 32). Como se muestra en la Figura 33, se observó una prolongación notable del tiempo de supervivencia en el grupo al que se le había administrado el dímero de scFv/CHO comparado con el grupo al que se le había administrado PBS(-).

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

#### 5.15 Ensayo de hemaglutinación

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

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

TABLA 2

#### Ensayo de hemaglutinación

	Control	0,01	0,1	1	10	100	$\mu\text{g/ml}$	
mIgG	-	-	-	-	-	-		
MABL-2 (intacto)	-	-	+	+++	+++	++		
	Control	0,004	0,04	0,4	4	40	80	$\mu\text{g/ml}$
monómero de scFv/CHO	-	-	-	-	-	-	-	
dímero de scFv/CHO	-	-	-	-	-	-	-	
	Control	0,004	0,04	0,4	4	40	80	160
monómero de scFv/E.co li	-	-	-	-	-	-	-	$\mu\text{g/ml}$
dímero de scFv/E.co li	-	-	-	-	-	-	-	-

## ES 2 304 235 T3

### Ejemplo comparativo 6

*Anticuerpo modificado  $sc(Fv)_2$  que comprende dos regiones V de la cadena H y dos regiones V de la cadena L y scFv de anticuerpo MABL-2 que tiene conectores de diferente longitud*

5

#### 6.1 Construcción del plásmido que expresa $sc(Fv)_2$ del anticuerpo MABL-2

10 Para preparar un plásmido que expresa el anticuerpo modificado [ $sc(Fv)_2$ ] que comprende dos regiones V de la cadena H y dos regiones v de la cadena L derivadas del anticuerpo MABL-2, el pCHOM2 mencionado antes, que comprende el ADN que codifica el scFv derivado de MABL-2 descrito antes, se modificó por el procedimiento de la PCR como se menciona a continuación y el fragmento de ADN resultante se introdujo en pCHOM2.

15 Los cebadores usados para la PCR son el cebador EF1 (ID SEC N°: 30) como cebador homodirigido, que se diseñó para que hibridara con un ADN que codifica EF1 $\alpha$  y un cebador antisentido (ID SEC N°: 19) que se diseñó para que hibridara con el ADN que codifica el extremo C-terminal de la región V de la cadena L y para que contuviera una secuencia de ADN para una región conectora, y el cebador VLLAS que contiene el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción Sall (ID SEC N° 31).

20 100  $\mu$ l de solución para la PCR comprenden 10  $\mu$ l de 10 x tampón de PCR n° 1, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, dNTP 0,2 mM (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), 5 unidades de ADN polimerasa KOD (Toyobo, Inc.), 1  $\mu$ M de cada uno de los cebadores y 100 ng del ADN molde (pCHOM2). La solución de la PCR se calentó a 94°C durante 30 segundos, a 50°C durante 30 segundos y a 74°C durante 1 minuto, en este orden. Este ciclo de temperatura se repitió 30 veces.

25 El producto de la PCR se purificó usando el kit de purificación QIAquick (QIAGEN) y se digirió con Sall. El fragmento de ADN resultante se clonó en el vector pBluescript KS<sup>+</sup> (Toyobo, Inc.). Después de secuenciación del ADN, se digirió un plásmido que comprendía la secuencia de ADN deseada con Sall y el fragmento de ADN obtenido se conectó usando el kit Rapid DNA Ligation (BOEHRINGER MANNHEIM) a pCHOM2 hecho digerir con Sall. Después de secuenciación del ADN, el plásmido que comprende la secuencia de ADN deseada se denomina “pCHOM2(Fv)<sub>2</sub>” (véase la Figura 34). La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos de la región  $sc(Fv)_2$  del anticuerpo MABL-2 contenida en el plásmido pCHOM2(Fv)<sub>2</sub> se muestran en el ID SEC N° 32.

30

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

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

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

50

55 Para construir el scFv de tipo LH, la reacción PCR se llevó a cabo usando, como molde pGEM-M2L y pGEM-M2H que contienen los ADNc que codifican la región V de la cadena L y la región V de la cadena H del anticuerpo MABL-2, respectivamente (véase el documento JP-Apl. 11-63557). Se usaron una pareja del cebador T7 (ID SEC N°: 37) y el cebador CFLH-R2 (ID SEC N°: 38) o una pareja del cebador CFLH-F2 (ID SEC N°: 39) y CFLH-R1 (ID SEC N°: 40) y la polimerasa KOD (Toyobo Inc.). La reacción PCR se llevó a cabo repitiendo 30 veces el ciclo de temperatura que consistía en 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto en un orden secuencial para producir un ADNc de una cadena L que contiene una secuencia líder en el extremo 5' o un ADNc de una cadena H que contiene la secuencia FLAG en su extremo 3'. Los ADNc resultantes de la cadena L y la cadena H se mezclaron y se llevó a cabo la PCR usando esta mezcla como moldes y la polimerasa KOD, repitiendo 60 5 veces el ciclo de temperatura que consistía en 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto, en este orden. A la mezcla de reacción se añadieron los cebadores T7 y CFLH-R1 y la reacción se llevó a cabo repitiendo 30 veces el ciclo de temperatura mencionado antes. El producto de reacción se usó como molde y la PCR se llevó a cabo usando una pareja del cebador CFLH-F4 (ID SEC N°: 41) y el cebador CFLH-R1 repitiendo 30 veces el ciclo de temperatura que consistía en 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto, en este orden, para producir un ADNc de tipo LH-0 sin conector.

65

Los ADNc resultantes de los tipos LH-0 y HL-0 se digirieron con las enzimas de restricción EcoRI y BamHI (Takara Shuzo) y los ADNc digeridos se introdujeron en un plásmido de expresión INPEP4 para células de mamífero

## ES 2 304 235 T3

usando Ligation High (Toyobo Inc.), respectivamente. Se transformó JM109 de *E. coli* competente (Nippon Gene) con cada uno de los plásmidos, y los plásmidos deseados se aislaron de *E. coli* transformada usando el kit QIAGEN Plasmid Maxi (QUIAGEN). De esta forma se prepararon los plásmidos pCF2LH-0 y pCF2HL-0.

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

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

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

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

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

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

### 6.3 Expresión de los scFv y sc(Fv)<sub>2</sub> en células COS7

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

Los scFv y sc(Fv)<sub>2</sub> de tipo HL y tipo LH se expresaron transitoriamente en células COS7 (JCRB9127, Japan Health Sciences Foundation). Las células COS7 se subcultivaron en medio DMEM (GIBCO BRL) que contenía suero bovino fetal al 10% serum (HyClone) a 37°C en un incubador en atmósfera de dióxido de carbono. Las células COS7 se transfectaron con los vectores CF2HL-0, 3~7/pCOS1, o CF2LH-0/ 3~7/pCOS1 preparados en el Ejemplo 6.2 o los vectores pCHOM2(Fv)<sub>2</sub> por electroporación usando el aparato Gene Pulser (BioRad). Se añadieron a la cubeta el ADN (10  $\mu$ g) y 0,25 ml de 2 x 10<sup>7</sup> células/ml en medio de cultivo DMEM que contenía FBS al 10% y BES 5 mM (SIGMA). Después de reposar durante 10 minutos las mezclas se trataron con pulsos a 0,17 kV, 950  $\mu$ F de capacidad eléctrica. Después de restauración durante 10 minutos a temperatura ambiente, las células electroporadas se transfirieron al medio de cultivo DMEM (FBS al 10%) en un matraz de 75 cm<sup>3</sup>. Después de cultivar durante 72 horas, se recogió

## ES 2 304 235 T3

el líquido sobrenadante del cultivo y se centrifugó para separar los fragmentos celulares. El líquido sobrenadante del cultivo se sometió a filtración usando un filtro superior de botella de 0,22  $\mu\text{m}$  (FALCON) para obtener el líquido sobrenadante del cultivo (en lo sucesivo "CM").

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

Las células transfectadas de la misma forma que en (1) se transfirieron al medio DMEM (FBS al 10%) en un matraz de 75  $\text{cm}^3$  y se cultivaron toda la noche. Después del cultivo, se descartó el líquido sobrenadante y las células se lavaron con PBS y después se añadieron al medio CHO-S-SFM II (GIBCO BRL). Después de cultivar durante 72  
10 horas, se recogió el líquido sobrenadante del cultivo, se centrifugó para separar los fragmentos celulares y se filtró usando un filtro superior de botella de 0,22  $\mu\text{m}$  (FALCON) para obtener el CM.

### 6.4 Detección de los scFv y sc(Fv)<sub>2</sub> en los CM de COS7

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

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

### 25 6.5 Citometría de flujo

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

### 6.6 Efecto de inducción de apoptosis *in vitro*

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

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

50

### 6.7 Construcción de vectores para la expresión de scFv y sc(Fv)<sub>2</sub> en células CHO

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

55

Los fragmentos EcoRI-BamHI de pCF2HL-0, 3~7, y PCF2LH-0, 3~7 preparados en el Ejemplo 6.2 se introdujeron entre los sitios EcoRI y BamHI en un vector de expresión pCHO1 para células CHO usando el Ligation High. Se transformaron DH5 $\alpha$  de *E. coli* competentes con los mismos. Los plásmidos se aislaron de *E. coli* transformada usando el kit QIAGEN Plasmid Midi (QIAGEN) para preparar los plásmidos de expresión pCHOM2HL-0, 3~7, y  
60 pCHOM2LH-0, 3~7.

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

65 Las células CHO se transformaron con cada uno de los plásmidos de expresión pCHOM2HL-0, 3~7, y pCHOM2LH-0, 3~7, construidos en el Ejemplo 6.7 y el vector pCHOM2(Fv)<sub>2</sub> para preparar las células CHO que expresan de forma constante cada anticuerpo modificado. Como un ejemplo típico de las mismas, se ilustra a continuación la producción de células CHO que expresan de forma constante MABL2-scFv <HL-5> o sc(Fv)<sub>2</sub>.

## ES 2 304 235 T3

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

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

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

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

#### *Procedimiento de purificación 1*

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

#### *Procedimiento de purificación 2*

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

#### *Primera etapa para HL-5*

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

#### *Primera etapa para sc(Fv)<sub>2</sub>*

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

#### *Segunda etapa: Cromatografía en hidroxipatito de HL-5 y sc(Fv)<sub>2</sub>*

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



## ES 2 304 235 T3

Tercera etapa: *Filtración en gel de HL-5 y sc(Fv)<sub>2</sub>*

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

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

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

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

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

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

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

Se añadieron diferentes concentraciones del dímero purificado de MABL2-scFv <HL-5>, el MABL2-sc(Fv)<sub>2</sub> purificado, el anticuerpo MABL-2 como control positivo o una IgG de ratón como control negativo, a  $5 \times 10^4$  células de la línea celular hIAP/L1210 o  $1 \times 10^5$  células de la línea celular CCRF-CEM. Después de cultivar durante 24 horas, se llevó a cabo la tinción con Anexina-V y se midió su intensidad de fluorescencia usando el aparato FACScan (BECTON DICKINSON). Como resultado, el dímero de MABL2-scFv <HL-5> y el MABL2-sc(Fv)<sub>2</sub> inducían notablemente la muerte celular de hIAP/L1210 y CCRF-CEM de una forma dependiente de la concentración (véase la Fig. 43). Como resultado se ha mostrado que el dímero de MABL2-scFv <HL-5> y MABL2-sc(Fv)<sub>2</sub>, tenían una eficacia mejorada de inducción de la apoptosis comparado con el anticuerpo original MABL-2.

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

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

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

**Ensayo de hemaglutinación**

**TABLA 3**

**Diluyente: PBS (µg/ml)**

cont	28,9	14,45	7,225	3,6125	1,8063	0,9031	0,4516	0,2258	0,1129	0,0564	0,0282	0,0141	0,0071	0,0035	0,0018
MABL2-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SC (FV) <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
cont	28,0	14,0	7,0	3,5	1,75	0,875	0,4375	0,2188	0,1094	0,0547	0,0273	0,0137	0,0068	0,0034	0,0017
MABL2-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SC (FV)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<HL5>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
cont	80	40	20	10	5	2,5	1,25	0,625	0,3125	0,1563	0,0781	0,0391	0,0195	0,0098	0,0049
MABL2	-	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-	-	-	-	-
(intacto)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
mIgG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Diluyente: Tampón de acetato (µg/ml)**

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

## ES 2 304 235 T3

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

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

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

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

### Ejemplo 7

*Fv de cadena sencilla que comprende la región V de la cadena H y la región V de la cadena L del anticuerpo humano 12B5 frente a MPL humana*

Se construyó un ADN que codificaba las regiones V del anticuerpo monoclonal humano 12B5 frente a MPL, como sigue:

#### 7.1 Construcción de un gen que codifica la región V de la cadena H de 12B5

El gen que codifica la región V de la cadena H del anticuerpo humano 12B5 que se une a la MPL humana se diseñó para que conectara la secuencia de nucleótidos del gen del mismo (ID SEC N°: 55) en el extremo 5' a la secuencia líder (ID SEC N°: 56) originada del gen del anticuerpo humano (*Eur. J. Immunol.* 1996; 26: 63-69). La secuencia de nucleótidos diseñada se dividió en cuatro oligonucleótidos que tenían secuencias que se superponían de 15 pb cada una (12B5VH-1, 12B5VH-2, 12B5VH-3, 12B5VH-4). 12B5VH-1 (ID SEC N°: 57) y 12B5VH-3 (ID SEC N°: 59) se sintetizaron en la dirección homosenidido, y 12B5VH-2 (ID SEC N°: 58) y 12B5VH-4 (ID SEC N°: 60) en la dirección antisentido, respectivamente. Después de ensamblar cada oligonucleótido sintetizado por la respectiva complementaridad, se añadieron los cebadores exteriores (12B5VH-S y 12B5VH-A) para amplificar la longitud entera del gen. Se diseñó 12B5VH-S (ID SEC N°: 61) para que hibridara con el extremo 5' de la secuencia líder por el cebador directo y para que tuviera el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción HindIII y la secuencia Kozak, y se diseñó 12B5VH-A (ID SEC N°: 62) para que hibridara con la secuencia de nucleótidos que codifica el extremo C-terminal de la región V de la cadena H por el cebador inverso y para que tuviera una secuencia donadora de empalme y el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción BamHI, respectivamente.

100 µl de una solución para la PCR que contenía 10 µl de 10 x tampón para la PCR II, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, dNTP 0,08 mM (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), 5 unidades de una ADN polimerasa AmpliTaq Gold (todos de PERKIN ELMER) y 2,5 pmoles de cada uno de los oligonucleótidos sintetizados (12B5VH-1 a 4) se calentaron a 94°C de temperatura inicial durante 9 minutos, a 94°C durante 2 minutos, a 55 durante 2 minutos y a 72°C durante 2 minutos. Después de repetir este ciclo dos veces se añadieron 100 pmoles de los cebadores externos 12B5VH-S y 12B5VH-A. La mezcla se sometió al ciclo que consistía en 94°C durante 30 segundos, a 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto, 35 veces y se calentó a 72°C durante 5 minutos más.

El producto de la PCR se purificó por gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1,5% (Sigma), se digirió con las enzimas de restricción BamHI y Hind III y se clonó en el vector de expresión HEF-gy1 para la cadena H humana. Después de determinar la secuencia de ADN, el plásmido que contiene la secuencia de ADN correcta se llamó HEF-12B5H-gy1.

Se digirió HEF-12B5H-gy1 con las enzimas de restricción EcoRI y BamHI para producir el gen que codifica 12B5VH que después se clonó en un vector de expresión pCOS-Fd para la cadena H de Fab humana para producir pFd-12B5H. El vector de expresión para la cadena H de Fab humana se construyó por amplificación del ADN (ID SEC N°: 63) que contenía la región intrón que existe entre los genes que codifican la región V de la cadena H del anticuerpo humano y la región constante, y el gen que codifica una parte de la región constante de la cadena H humana por PCR, e inserción del producto de la PCR en un vector de expresión pCOS1 de célula animal. La región constante de la cadena H humana se amplificó para el gen en las mismas condiciones mencionadas antes usando como molde HEF-gy1, como cebador directo G1CH1-S (ID SEC N°: 64) que se diseñó para que hibridara con la secuencia del

## ES 2 304 235 T3

extremo 5' del intrón 1 y que tuviera los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción EcoRI y BamHI y como cebador inverso G1CH1-A (ID SEC N°: 65) que se diseñó para que hibridara con el extremo 3' del ADN del dominio CH1 de la región constante de la cadena H humana y para que tuviera una secuencia que codificara una parte de la región bisagra, dos codones de parada y el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción Bg1 II.

La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena 12B5H reconstruida que estaba incluida en los plásmidos HEF-12B5H-gy1 y pFd-12B5H se muestran en el ID SEC N°: 66.

### 7.2 Construcción del gen que codifica la región V de la cadena L de 12B5

El gen que codifica la región V de la cadena L del anticuerpo humano 12B5 que se une a la MPL humana se diseñó conectando la secuencia de nucleótidos del gen (ID SEC N°: 67) en el extremo 5' con la secuencia líder (ID SEC N°: 68) originada del gen del anticuerpo humano 3D6 (*Nuc. Acid Res.* 1990; 18; 4927). De la misma forma mencionada antes, la secuencia de nucleótidos diseñada se dividió en cuatro oligonucleótidos que tenían secuencias que se superponían de 15 pb cada una (12B5VL-1, 12B5VL-2, 12B5VL-3, 12B5VL-4) y se sintetizaron respectivamente. 12B5VL-1 (ID SEC N°: 69) y 12B5VL-3 (ID SEC N°: 71) tenían secuencias homoseno, y 12B5VL-2 (ID SEC N°: 70) y 12B5VL-4 (ID SEC N°: 72) tenían secuencias antiseno, respectivamente. Cada uno de los nucleótidos sintetizados se ensambló por complementaridad respectiva y se mezclaron con el cebador externo (12B5VL-S y 12B5VL-A) para amplificar la longitud completa del gen. Se diseñó 12B5VL-S (ID SEC N°: 73) para que hibridara con el extremo 5' de la secuencia líder por el cebador directo y para que tuviera el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción HindIII y la secuencia Kozak. Se diseñó 12B5VL-A (ID SEC N°: 74) para que hibridara con la secuencia de nucleótidos que codifica el extremo C-terminal de la región V de la cadena L por el cebador inverso y para que tuviera la secuencia donadora de empalme y el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción BamHI.

Llevando a cabo la PCR como se ha mencionado antes, el producto de la PCR se purificó en gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1,5% (Sigma), se digirió con las enzimas de restricción BamHI y HindIII y se clonó en un vector de expresión HEF-gk para la cadena L humana. Después de determinar la secuencia de ADN, el plásmido que contenía la secuencia de ADN correcta se llamó HEF-12B5L-gk. La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos de la región V de la cadena L de 12B5 reconstruida que se había incluido en el plásmido HEF-12B5L-gk se muestran en el ID SEC N°: 75.

### 7.3 Producción de Fv de cadena sencilla (scFv) de 12B5 reconstruido

El Fv de cadena sencilla del anticuerpo 12B5 reconstruido se diseñó para que estuviera en el orden de 12B5VH-conector-12B5VL y que tuviera la secuencia FLAG (ID SEC N°: 76) en el extremo C-terminal para facilitar la detección y purificación. El Fv de cadena sencilla de 12B5 reconstruido (sc12B5) se construyó usando una secuencia conectora que consistía en 15 aminoácidos representados por (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>.

(1) Producción de Fv de cadena sencilla de 12B5 reconstruido usando la secuencia conectora que consiste en 15 aminoácidos

El gen que codifica el Fv de cadena sencilla del anticuerpo 12B5 reconstruido, que contiene la secuencia conectora que consiste en 15 aminoácidos, se construyó conectando la región V de la cadena H de 12B5, la región conectora y la región V de la cadena L de 12B5, que se amplificaron por PCR respectivamente. Este procedimiento se muestra esquemáticamente en la Figura 47. Se usaron 6 cebadores (A-F) en la PCR para la producción del Fv de cadena sencilla de 12B5 reconstruido. Los cebadores A, C y E tienen secuencias homoseno, y los cebadores B, D y F tienen secuencias antiseno.

El cebador directo 12B5-S (cebador A, ID SEC N°: 77) para la región V de la cadena H se diseñó para que hibridara con el extremo 5' de la secuencia líder de la cadena H y para que tuviera el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción EcoRI. El cebador inverso HuVHJ3 (cebador B, ID SEC N°: 78) para la región V de la cadena H se diseñó para que hibridara con el ADN que codifica el extremo C-terminal de la región V de la cadena H.

El cebador directo RHuJH3 (cebador C, ID SEC N°: 79) para el conector se diseñó para que hibridara con el ADN que codifica el extremo N-terminal del conector y para que se superpusiera con el ADN que codifica el extremo C-terminal de la región V de la cadena H. El cebador inverso RHuVK1 (cebador D, ID SEC N°: 80) para el conector se diseñó para que hibridara con el ADN que codifica el extremo C-terminal del conector y para que se superpusiera con el ADN que codifica el extremo N-terminal de la región V de la cadena L.

El cebador directo HuVK1.2 (cebador E, ID SEC N°: 81) para la región V de la cadena L se diseñó para que hibridara con el ADN que codifica el extremo N-terminal de la región V de la cadena L. El cebador inverso 12B5F-A para la región V de la cadena L (cebador F, ID SEC N°: 82) se diseñó para que hibridara con el ADN que codifica el extremo C-terminal de la región V de la cadena L y para que tuviera la secuencia que codifica el péptido FLAG (Hopp, T. P. y col., *Bio/Technology*, 6, 1204-1210, 1988), dos codones de parada de la transcripción y el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción NotI.

## ES 2 304 235 T3

En la etapa de la primera PCR, se llevaron a cabo tres reacciones A-B, C-D y E-F, y los tres productos de la PCR de la primera etapa de la PCR se ensamblaron por complementariedad respectiva. Después de añadir los cebadores A y F, se amplificó el ADN de longitud completa que codifica el Fv de cadena sencilla de 12B5 reconstruido que tiene el conector que consiste en 15 aminoácidos (la segunda PCR). En la PCR de la primera etapa se usaron el plásmido HEF-12B5H-gy1 (véase el Ejemplo 7.1), que codifica la región V de la cadena H de 12B5 reconstruido, pSCFVT7-hM21 (anticuerpo ONS-M21 humanizado) (Ohtomo y col., *Anticancer Res.* 18 (1998), 4311-4316) que contiene el ADN (ID SEC N°: 83) que codifica la región conectora que consiste en Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser (Huston y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 5879-5883, 1988) y el plásmido HEF-12B5L-gk (véase el Ejemplo 7.2) que codifica la región V de la cadena L de 12B5 reconstruido, como moldes, respectivamente.

50  $\mu$ l de solución para la PCR para la primera etapa contenían 5  $\mu$ l de 10 x tampón para la PCR Gold II, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, dNTP 0,08 mM, 5 unidades de ADN polimerasa AmpliTaq Gold (todos de PERKIN ELMER), 100 pmoles de cada uno de los cebadores y 100 ng de cada ADN molde. La solución de la PCR se calentó a 94°C de temperatura inicial durante 9 minutos, a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto. Después de repetir este ciclo 35 veces la mezcla de reacción se calentó más a 72°C durante 5 minutos.

Los productos de la PCR A-B, C-D y E-F se ensamblaron por la segunda PCR. La solución de la mezcla de la PCR para la segunda etapa de 98  $\mu$ l que contenía como molde 1  $\mu$ l del producto A-B de la primera PCR, 0,5  $\mu$ l del producto C-D de la PCR y 1  $\mu$ l del producto E-F de la PCR, 10  $\mu$ l de 10 x Tampón de la PCR Gold II, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, dNTP 0,08 mM, 5 unidades de ADN polimerasa AmpliTaq Gold (todos de PERKIN ELMER), se calentó a 94°C de temperatura inicial durante 9 minutos, a 94°C durante 2 minutos, a 65°C durante 2 minutos y 72°C durante 2 minutos. Después de repetir el ciclo dos veces, se añadieron 100 pmoles de cada uno de los cebadores A y F. Después de repetir el ciclo que consistía en a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto, 35 veces, la mezcla de reacción se calentó a 72°C durante 5 minutos.

Los fragmentos de ADN producidos por la segunda PCR se purificaron usando gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1,5%, se digirieron con EcoRI y NotI, y se clonaron en el vector pCHO1 y el vector pCOS1 (solicitud de patente japonesa n° 8-255196). El vector de expresión pCHO1 era un vector construido eliminado el gen de anticuerpo de DHFR- $\Delta$ E-rvH-PM1-f (véase el documento WO92/19759) por digestión con EcoRI y SmaI, y conectando al adaptador EcoRI-NotI-BamHI (TAKARA SHUZO). Después de determinar la secuencia de ADN, los plásmidos que contenían el fragmento de ADN que codificaba la secuencia de aminoácidos correcta del Fv de cadena sencilla de 12B5 reconstruido se llamaron pCHO-sc12B5 y pCOS-sc12B5. La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos del Fv de cadena sencilla de 12B5 reconstruido, incluida en los plásmidos pCHO-sc12B5 y pCOS-sc12B5 se muestran en el ID SEC N°: 84.

### 7.4 Expresión del anticuerpo 12B5 (IgG, Fab) y el polipéptido Fv de cadena sencilla por una célula animal

El anticuerpo 12B5 (IgG, Fab) y el Fv de cadena sencilla derivado del anticuerpo 12B5, se expresaron usando células COS-7 o células CHO.

La expresión transitoria usando células COS-7 se llevó a cabo como sigue. La transfección se llevó a cabo por el procedimiento de electroporación usando el equipo Gene Pulser (BioRad). Para la expresión del anticuerpo 12B5 (IgG) se añadieron 10  $\mu$ g de cada uno de los vectores de expresión mencionados antes HEF-12B5H-gy1 y HEF-12B5L-gk, para la expresión del fragmento 12B5Fab se añadieron 10  $\mu$ g de cada uno de pFd-12B5H y HEF-12B5L-gk y para la expresión de Fv de cadena sencilla se añadieron 10  $\mu$ g de pCOS-sc12B5 a células COS-7 ( $1 \times 10^7$  células/ml) suspendidas en 0,8 ml de PBS. La mezcla mantenida en una cubeta se trató por pulsos con una capacidad de 1,5 kV, 25  $\mu$ FD. Después de recuperación durante 10 minutos a temperatura ambiente, las células electroporadas se añadieron al medio de cultivo DMEM (GIBCO BRL) que contenía suero bovino fetal al 10% y se cultivaron. Después de cultivo durante toda la noche, las células se lavaron una vez con PBS, se añadieron a medio CHO-S-SFM II sin suero y se cultivaron durante 2 días. El medio de cultivo se centrifugó para separar los restos celulares y se filtró con un filtro de 0,22  $\mu$ m para preparar el líquido sobrenadante del cultivo.

Para establecer una línea celular CHO de expresión estable para el Fv de cadena sencilla (polipéptido) derivado del anticuerpo 12B5, se introdujo el vector de expresión pCHO-sc12B5 en células CHO como sigue.

El vector de expresión se introdujo en células CHO por el procedimiento de electroporación usando el equipo Gene Pulser (BioRad). Se mezclaron el ADN linealizado (100  $\mu$ g) obtenido por digestión con la enzima de restricción PvuI y células CHO ( $1 \times 10^7$  células/ml) suspendidas en 0,8 ml de PBS en una cubeta, se dejaron reposar sobre hielo durante 10 minutos y se trataron con pulsos a una capacidad de 1,5 kV, 25  $\mu$ FD. Después de recuperación durante 10 minutos a temperatura ambiente, las células electroporadas se añadieron a CHO-S-SFM II (GIBCO BRL) que contenía suero bovino fetal al 10% y se cultivaron. Después de cultivo durante 2 días, el cultivo se continuó en medio CHO-S-SFM II (GIBCO BRL) que contenía metotrexato 5 nM (SIGMA) y suero bovino fetal al 10%. De estos clones obtenidos, se seleccionó un clon con una alta tasa de expresión como la línea celular productora para el Fv de cadena sencilla de 12B5. Después de cultivo en medio CHO-S-SFM II sin suero (GIBCO BRL) que contenía metotrexato 5 nM (SIGMA), se obtuvo el líquido sobrenadante del cultivo por separación de los restos celulares por centrifugación.

## ES 2 304 235 T3

### 7.5 Purificación de Fv de cadena sencilla derivado de 12B5 producido por células CHO

El líquido sobrenadante del cultivo de la línea celular CHO que expresa el Fv de cadena sencilla de 12B5 obtenido en 7.4 se purificó por columna de anticuerpo anti-FLAG y columna de filtración en gel.

#### (1) Columna de anticuerpo anti-FLAG

El líquido sobrenadante del cultivo se añadió al gel de afinidad anti-FLAG M2 (SIGMA) equilibrado con PBS. Después de lavar la columna con el mismo tampón, las proteínas adsorbidas en la columna eluyeron con tampón de glicina-HCl 0,1 M (pH 3,5). Las fracciones eluidas se neutralizaron inmediatamente por adición de tampón de Tris-HCl 1 M (pH 8,0). Las fracciones eluidas se analizaron por SDS-PAGE y la fracción que se confirmó que contenía el Fv de cadena sencilla se concentró usando el Centricon-10 (MILLIPORE).

#### (2) Filtración en gel

La solución concentrada obtenida en (1) se añadió a la columna Superdex200 (10x300 mm, AMERSHAM PHARMACIA) equilibrada con PBS que contenía Tween 20 al 0,01%. El producto sc12B5 eluyó en dos picos (A, B) (véase la Figura 48). Las fracciones A y B se analizaron usando el gel de poliacrilamida-SDS al 14%. La muestra se procesó por electroforesis en presencia y ausencia de un agente reductor de acuerdo con el procedimiento de Laemmli, y se tiñó con azul brillante de Coomassie después de la electroforesis. Como se muestra en la Figura 49, las fracciones A y B, independientemente de la presencia del agente de reducción o su ausencia, produjeron una sola banda que tenía un peso molecular aparente de aproximadamente 31 kD. Cuando las fracciones A y B se analizaron por filtración en gel usando Superdex200 PC 3.2/30 (3,2x300 mm, AMERSHAM PHARMACIA), la fracción A produjo un producto de elución con un peso molecular aparente a aproximadamente 44 kD y la fracción B lo produjo a 22 kD (véase la Figura 50a y b). Los resultados muestran que la fracción A es el dímero con enlace no covalente del Fv de cadena sencilla de sc12B5, y B es el monómero.

### 7.6 Medición de la actividad agonista de tipo TPO de diferentes Fv de cadena sencilla

La actividad de tipo TPO del anticuerpo de cadena sencilla anti-MPL se evaluó midiendo la actividad de proliferación para las células BaF3 (BaF/mpl) que expresan el receptor de TPO humano (MPL). Después de lavar las células BaF/Mpl dos veces con medio de cultivo RPMI1640 (GIBCO) que contenía suero bovino fetal al 10% (GIBCO), las células se suspendieron en el medio de cultivo con una densidad celular de  $5 \times 10^5$  células/ml. El anticuerpo de cadena sencilla anti-MPL y la TPO humana (R&D Systems) se diluyeron con el medio de cultivo, respectivamente. Se añadieron 50  $\mu$ l de la suspensión celular y 50  $\mu$ l del anticuerpo o de la TPO humana diluidos en una microplaca de 96 pocillos (fondo plano) (Falcon), y se cultivaron en un incubador con CO<sub>2</sub> (concentración de CO<sub>2</sub>: 5%) durante 24 horas. Después de la incubación, se añadieron 10  $\mu$ l de reactivo WST-8 (reactivo para medir el número de células SF originales: Nacalai Tesque) y se midió inmediatamente la absorbancia a una longitud de onda de medición de 450 nm y una longitud de onda de referencia de 620 nm usando el fotómetro de absorbancia fluorescente SPECTRA Fluor (TECAN). Después de incubar en un incubador con CO<sub>2</sub> (concentración de CO<sub>2</sub>: 5%) durante 2 horas, se volvió a medir la absorbancia a 450 nm de longitud de onda de medición y 620 nm de longitud de onda de referencia usando el SPECTRA Fluor. Puesto que el reactivo WST-8 desarrollaba la reacción de color dependiendo del número de células vivas a la longitud de onda de 450 nm, la actividad de proliferación de BaF/Mpl basado en el cambio de absorbancia en 2 horas se evaluó por la DE50 calculado como sigue. En la curva de la reacción de proliferación en la que se representó gráficamente la absorbancia en el eje de ordenadas frente a la concentración de anticuerpo en el eje de abscisas, la absorbancia de la meseta se estableció como 100% de tasa de reacción. Obteniendo una fórmula de aproximación por un procedimiento de aproximación de variación lineal basado en los valores representados cerca de la tasa de reacción de 50%, se calculó la concentración de anticuerpo de 50% de tasa de reacción y se adoptó como DE50.

Los resultados de la actividad agonista a MPL medida usando los líquidos sobrenadantes del cultivo de las células COS-7 que expresan diferentes moléculas de anticuerpo 12B5 mostraban, como se ilustra en la Figura 51, que 12B5IgG que tiene un sitio de unión al antígeno bivalente aumentó la absorbancia de una forma dependiente de la concentración y tenía actividad agonista de tipo TPO (DE50; 29 nM), mientras que la actividad agonista de 12B5Fab que tenía un sitio de unión al antígeno monovalente era muy débil (DE50, 34,724 nM). Al contrario el Fv de cadena sencilla (sc12B5) que tenía un sitio de unión al antígeno monovalente como Fab mostró una fuerte actividad agonista a un nivel en el que la DE50 era 75 nM. Sin embargo, se sabe que hay regiones variables de la cadena H y la cadena L del Fv de cadena sencilla que están asociadas por enlace no covalente, y por lo tanto, cada región variable se disocia en solución y se puede asociar con la región variable de otra molécula para formar multímeros como dímeros. Cuando se midió el peso molecular de sc12B5 purificado por filtración en gel, se confirmó que había moléculas que se reconocen que eran monómeros y dímeros (véase la Figura 48). Se aislaron el monómero de sc12B5 y el dímero de sc12B5 (véase la Figura 50) y se midió la actividad agonista frente a MPL. Como se muestra en las Figuras 51 y 52, la DE50 del monómero de sc12B5 era 4438,7 nM, lo que confirmaba que la actividad agonista era menor comparada con el resultado usando el líquido sobrenadante del cultivo de células COS-7. Al contrario, el Fv de cadena sencilla (dímero de sc12B5) que tenía el sitio de unión al antígeno bivalente mostró una actividad de aproximadamente 400 veces más fuerte (DE50, 10,1 nM) comparado con sc12B5 monovalente. Además, el Fv de cadena sencilla bivalente mostró una actividad agonista equivalente o mayor que la actividad agonista de TPO humana y 12B5IgG.

## ES 2 304 235 T3

### Ejemplo 8

#### *Construcción de un gen que codifica la región variable del anticuerpo 12E10 humano frente a la MPL humana*

5 Se construyó un ADN que codificaba la región variable del anticuerpo 12E10 monoclonal humano frente a MPL humana, como sigue:

##### 8.1 *Construcción de un gen que codifica la región V de la cadena H de 12E10*

10 La secuencia de nucleótidos del ID SEC N°: 86 se diseñó como un gen que codifica la región V de la cadena H del anticuerpo humano 12E10 que se une a la MPL humana basándose en la secuencia de aminoácidos descrita en el documento WO99/10494 (ID SEC N°:85). La longitud completa de la secuencia de nucleótidos se diseñó conectando a su extremo 5' la secuencia líder (ID SEC N°: 87) derivada del gen del anticuerpo humano (GenBank N° de acceso 15 AF062252). La secuencia de nucleótidos diseñada se dividió en cuatro oligonucleótidos que tenían secuencias que se superponían de 15 pb cada uno (12E10VH1, 12E10VH2, 12E10VH3, 12E10VH4). 12E10VH1 (ID SEC N°: 88) y 12E10VH3 (ID SEC N°: 90) se sintetizaron en la dirección homosen sentido, y 12E10VH2 (ID SEC N°: 89) y 12E10VH4 (ID SEC N°: 91) en la dirección antisentido, respectivamente. Después de ensamblar cada oligonucleótido sintetizado por su respectiva complementaridad, se añadieron los cebadores externos (12E10VHS y 12E10VHA) para amplificar 20 la longitud completa del gen. 12E10VHS (ID SEC N°: 92) se diseñó para que hibridara con el extremo 5' de la secuencia líder por el cebador directo y para que tuviera el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción HindIII y la secuencia Kozak, y 12E10VHA (ID SEC N°: 93) se diseñó para que hibridara con la secuencia de nucleótidos que codifica el extremo C-terminal de la región V de la cadena H por el cebador inverso y para que tuviera una secuencia donadora de empalme y el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción BamHI, respectivamente.

25 100  $\mu$ l de la solución para la PCR que contenía 10  $\mu$ l de 10 x tampón de PCR Gold II,  $MgCl_2$  1,5 mM, dNTP 0,08 mM (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 5 unidades de ADN polimerasa AmpliTaq Gold (todos de PERKIN ELMER) y 2,5 pmoles de cada uno de los oligonucleótidos sintetizados (12E10VH-1 a 4), se calentaron a 94°C de temperatura inicial durante 9 minutos, a 94°C durante 2 minutos, a 55°C durante 2 minutos y a 72°C durante 2 minutos. Después de 30 repetir el ciclo dos veces, se añadieron 100 pmoles de cada uno de los cebadores externos 12E10VHS y 12E10VHA. La mezcla se sometió al ciclo que consistía en 94°C durante 30 segundos, a 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto, 35 veces, y se calentó a 72°C durante 5 minutos adicionales.

35 El producto de la PCR se purificó en gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1,5% (Sigma), se digirió con las enzimas de restricción BamHI y HindIII, y se clonó en un vector de expresión de la cadena H humana HEF-gy1. Después de determinar la secuencia de ADN, el plásmido que contenía la secuencia de ADN correcta se llamó HEF-12E10H-gy1.

40 El HEF-12E10H-gy1 se digirió con las enzimas de restricción EcoRI y BamHI para producir el gen que codifica 12E10VH y después se clonó en el vector de expresión de la cadena H de Fab humana pCOS-Fd. para producir pFd-12E10H. El vector de expresión de la cadena H de Fab humana se construyó por amplificación del ADN (ID SEC N°: 63) que contenía la región intrón que existe entre los genes que codifican la región V de la cadena H y la región constante del anticuerpo humano, y el gen que codifica una parte de la región constante de la cadena H humana por PCR, e inserción del producto de la PCR en el vector de expresión de células animales pCOS1. La región constante 45 de la cadena H humana se amplificó para el gen en las mismas condiciones mencionadas antes usando como molde HEF-gy1, como cebador directo G1CH1-S (ID SEC N°: 64) que se diseñó para que hibridara con la secuencia del extremo 5' del intrón 1 y para que tuviera los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción EcoRI y BamHI, y como cebador inverso G1CH1-A (ID SEC N°: 65) que se diseñó para que hibridara con el ADN del extremo 3' del dominio CH1 de la región constante de la cadena H humana y para que tuviera una secuencia que codifica una parte 50 de la región bisagra, dos codones de parada y el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción Bgl I.

La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena H de 12E10 reconstruido que se incluyó en los plásmidos HEF-12E10H-gy1 y pFd-12E10H se muestran en el ID SEC N°: 94.

55

##### 8.2 *Construcción de un gen que codifica la región V de la cadena L de 12E10*

La secuencia de nucleótidos del ID SEC N°: 96 se diseñó como un gen que codifica la región V de la cadena L del anticuerpo humano 12E10 que se une a la MPL humana, basándose en la secuencia de aminoácidos descrita 60 en el documento WO99/10494 (ID SEC N°: 95). Además se diseñó conectando a su extremo 5' la secuencia líder (ID SEC N°: 97) derivada del gen del anticuerpo humano (*Mol. Immunol.* 1992; 29: 1515-1518). De la misma forma mencionada antes, la secuencia de nucleótidos diseñada se dividió en 4 oligonucleótidos que tenían secuencias que se superponían, de 15 pb cada uno (12E10VL1, 12E10VL2, 12E10VL3, 12E10VL4) y se sintetizaron respectivamente. 12E10VL1 (ID SEC N°: 98) y 12E10VL3 (ID SEC N°: 100) tenían secuencias homosen sentido, y 12E10VL2 (ID SEC N°: 99) y 12E10VL4 (ID SEC N°: 101) tenían secuencias antisentido, respectivamente. Cada uno de los oligonucleótidos sintetizados se ensambló por la respectiva complementaridad y se mezcló con los cebadores externos (12E10VLS y 12E10VLA) para amplificar la longitud entera del gen. 12E10VLS (ID SEC N°: 102) se diseñó para que hibridara con el extremo 5' de la secuencia líder por el cebador directo y para que tuviera el sitio de reconocimiento de la enzima de

## ES 2 304 235 T3

restricción EcoRI y la secuencia Kozak. 12E10VLA (ID SEC N°: 103) se diseñó para que hibridara con la secuencia de nucleótidos que codifica el extremo C-terminal de la región V de la cadena L por el cebador inverso y para que tuviera el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción BlnI.

5 Llevando a cabo la PCR como se ha mencionado antes, el producto de la PCR se purificó en gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1,5% (Sigma), se digirió con las enzimas de restricción EcoRI y BlnI, y se clonó en pUC19 que contenía un gen para la región constante de la cadena lambda humana. Después de determinar la secuencia de ADN, el plásmido que contenía la secuencia de ADN correcta se digirió por EcoRI para producir un gen que codificaba la región V de la cadena L de 12E10 y la región constante de la cadena lambda humana y después se insertó en el vector de expresión pCOS1. El plásmido que tenía el gen de la cadena L de 12E10 (ID SEC N°: 104) se llamó pCOS-12E10L.

### 8.3. Producción del Fv de cadena sencilla de 12E10 reconstruido

15 El Fv de cadena sencilla del anticuerpo 12E10 reconstruido se diseñó para que estuviera en el orden de 12E10VH-conector-12E10VL y que tuviera la secuencia FLAG (ID SEC N°: 105) en el extremo C-terminal para facilitar la detección y purificación. Los Fv de cadena sencilla de 12E10 reconstruidos (sc12E10 y db12E10) se construyeron usando una secuencia conectora que consistía en 15 aminoácidos representados por (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> o 5 aminoácidos representados por (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>1</sub>.

20 (1) Producción de Fv de cadena sencilla de 12E10 reconstruido usando la secuencia conectora que consiste en 5 aminoácidos

25 El gen que codifica el Fv de cadena sencilla de 12E10 reconstruido, que contiene la secuencia conectora que consiste en 5 aminoácidos, se construyó introduciendo la secuencia de nucleótidos para el conector (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>1</sub> en el extremo 3' del gen que codifica la región V de la cadena H de 12E10 y en el extremo 5' del gen que codifica la región V de la cadena L de 12E10, amplificando los respectivos genes así obtenidos por PCR y conectando los genes amplificados. Se usaron 4 cebadores (A-D) en la PCR para producir el Fv de cadena sencilla de 12E10 reconstruido. Los cebadores A y C tenían secuencias homocodificadas, y los cebadores B y D tenían secuencias anticodificadas.

30 El cebador directo para la región V de la cadena H fue 12E10S (cebador A, ID SEC N°: 106). El cebador inverso DB2 (cebador B, ID SEC N°: 107) para la región V de la cadena H se diseñó para que hibridara con el ADN que codifica el extremo C-terminal de la región V de la cadena H y para que tuviera la secuencia de nucleótidos que codifica el conector (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>1</sub> y la secuencia de nucleótidos que codifica el extremo N-terminal de la región V de la cadena L.

35 El cebador directo DB1 (cebador C, ID SEC N°: 108) para la región V de la cadena L se diseñó para que hibridara con el ADN que codifica el extremo N-terminal de la región V de la cadena L y para que tuviera la secuencia de nucleótidos que codifica el conector (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>1</sub> y la secuencia de nucleótidos que codifica el extremo C-terminal de la región V de la cadena H. El cebador inverso 12E10FA (cebador D, ID SEC N°: 109) para la región V de la cadena L se diseñó para que hibridara con el ADN que codifica el extremo C-terminal de la región V de la cadena L y para que tuviera la secuencia de nucleótidos que codifica FLAG y el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción NotI.

45 En la etapa de la primera PCR, se llevaron a cabo dos reacciones A-B y C-D, y los dos productos de la PCR obtenidos de la primera etapa de la PCR se ensamblaron por complementariedad respectiva. Después de añadir los cebadores A y D, se amplificó el ADN de longitud completa que codifica el Fv de cadena sencilla de 12E10 reconstruido que tiene el conector que consiste en 5 aminoácidos (la segunda PCR). En la PCR de la primera etapa se usaron el plásmido HEF-12E10H-gy1 (véase el Ejemplo 8.2), que codifica la región V de la cadena H de 12E10 reconstruido, pCOS-12E10L (véase el Ejemplo 8.1) que codifica la región V de la cadena L de 12E10 reconstruido, como moldes, respectivamente.

50 50 µl de solución para la PCR para la primera etapa contenían 5 µl de 10 x tampón para la PCR Gold II, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, dNTP 0,08 mM, 5 unidades de ADN polimerasa AmpliTaq Gold (todos de PERKIN ELMER), 100 pmoles de cada uno de los cebadores y 100 ng de cada ADN molde. La solución de la PCR se calentó a 94°C de temperatura inicial durante 9 minutos, a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto. Después de repetir este ciclo 35 veces la mezcla de reacción se calentó más a 72°C durante 5 minutos.

60 Los productos de la PCR A-B (429 pb) y C-D (395 pb) se ensamblaron mediante la segunda PCR. La solución de la mezcla para la PCR de la segunda etapa (98 µl) que contenía como moldes 1 µl de cada uno de los productos A-B y C-D de la primera PCR, 100 pmoles de cada uno de los cebadores, 10 µl de 10 x tampón de la PCR Gold II, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, dNTP 0,08 mM, 5 unidades de ADN polimerasa AmpliTaq Gold (todos de PERKIN ELMER), se hizo reaccionar en las mismas condiciones mencionadas antes.

65 El fragmento de ADN de 795 pb producido por la segunda PCR se purificó usando gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1,5%, se digirió con EcoRI y NotI, y se clonó en el vector pCHO1 o el vector pCOS1. El vector de expresión pCHO1 era un vector construido eliminando el gen de anticuerpo de DHFR-ΔE-RVH-PM1-f (véase el documento WO92/19759) por digestión con EcoRI y SmaI, y conectando al adaptador EcoRI-NotI-BamHI (TAKARA SHUZO). Después de determinar la secuencia de ADN, los plásmidos que contenían el fragmento de ADN que codificaba la



## ES 2 304 235 T3

secuencia de aminoácidos correcta del Fv de cadena sencilla de 12E10 reconstruido se llamaron pCHO-db12E10 y pCOS-db12E10. La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos del Fv de cadena sencilla de 12E10 reconstruido, incluida en los plásmidos pCHO-db12E10 y pCOS-db12E10 se muestran en el ID SEC N°: 110.

### 5 (2) Producción de Fv de cadena sencilla de 12E10 reconstruido usando la secuencia conectora que consiste en 15 aminoácidos

El gen que codifica el Fv de cadena sencilla de 12E10 reconstruido, que contiene la secuencia conectora que consiste en 15 aminoácidos, se construyó introduciendo la secuencia de nucleótidos para el conector (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> en el extremo 3' del gen que codifica la región V de la cadena H de 12E10 y en el extremo 5' del gen que codifica la región V de la cadena L de 12E10, amplificando los respectivos genes así obtenidos por PCR y conectando los genes amplificados. Se usaron 4 cebadores (A-D) en la PCR para producir el Fv de cadena sencilla de 12E10 reconstruido. Los cebadores A y C tenían secuencias homoseno, y los cebadores B y D tenían secuencias antiseno.

15 El cebador directo para la región V de la cadena H era 12E10S (cebador A, ID SEC N°: 106). El cebador inverso sc4.3 (cebador B, ID SEC N°: 111) para la región V de la cadena H se diseñó para que hibridara con el ADN que codifica el extremo C-terminal de la región V de la cadena H y para que tuviera la secuencia de nucleótidos que codifica el conector (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> y la secuencia de nucleótidos que codifica el extremo N-terminal de la región V de la cadena L.

20 El cebador directo sc1.3 (cebador C, ID SEC N°: 112) para la región V de la cadena L se diseñó para que hibridara con el ADN que codifica el extremo N-terminal de la región V de la cadena L y para que tuviera la secuencia de nucleótidos que codifica el conector (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> y la secuencia de nucleótidos que codifica el extremo C-terminal de la región V de la cadena H. El cebador inverso 12E10FA (cebador D, ID SEC N°: 109) para la región V de la cadena L se diseñó para que hibridara con el ADN que codifica el extremo C-terminal de la región V de la cadena L y para que tuviera la secuencia de nucleótidos que codifica FLAG y el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción NotI.

30 En la etapa de la primera PCR, se llevaron a cabo dos reacciones A-B y C-D, y los dos productos de la PCR obtenidos de la primera etapa de la PCR se ensamblaron por complementaridad respectiva. Después de añadir los cebadores A y D, se amplificó el ADN de longitud completa que codifica el Fv de cadena sencilla de 12E10 reconstruido que tiene el conector que consiste en 15 aminoácidos (la segunda PCR). En la PCR de la primera etapa se usó el plásmido pCOS-db12E10 (véase el Ejemplo 8.3(1)), que codifica el Fv de cadena sencilla de de 12E10 reconstruido, como molde.

35 50  $\mu$ l de solución para la PCR de la primera etapa contenían 5  $\mu$ l de 10 x tampón ExTaq, dNTP 0,4 mM, 2,5 unidades de ADN polimerasa TaKaRa ExTaq (de TAKARA), 100 pmoles de cada uno de los cebadores y 10 ng de cada ADN molde. La solución de la PCR se calentó a 94°C de temperatura inicial durante 30 segundos, a 94°C durante 15 segundos y a 72°C durante 2 minutos y el ciclo se repitió 5 veces. Después de repetir 28 veces el ciclo de a 94°C durante 15 segundos y a 70°C durante 2 minutos, la mezcla de reacción se calentó más a 72°C durante 5 minutos.

40 Los productos de la PCR A-B (477 pb) y C-D (447 pb) se ensamblaron por la segunda PCR. La solución de la mezcla para la PCR de la segunda etapa (98  $\mu$ l) que contenía como moldes 1  $\mu$ l de cada uno de los productos A-B y C-D de la primera PCR, 100 pmoles de cada uno de los cebadores A y D, 5  $\mu$ l de 10 x Tampón ExTaq, dNTP 0,4 mM, 2,5 unidades de ADN polimerasa TaKaRa ExTaq (de TAKARA), se hizo reaccionar en las mismas condiciones mencionadas antes.

50 El fragmento de ADN de 825 pb producido por la segunda PCR se purificó usando gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1,0%, se digirió con EcoRI y NotI. El fragmento de ADN así obtenido se clonó en el vector pCHO1 o el vector pCOS1. Después de determinar la secuencia de ADN, los plásmidos que contenían el fragmento de ADN que codificaba la secuencia de aminoácidos correcta del Fv de cadena sencilla de 12E10 reconstruido se llamaron pCHO-sc12E10 y pCOS-sc12E10. La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos del Fv de cadena sencilla de 12E10 reconstruido, incluida en los plásmidos pCHO-sc12E10 y pCOS-sc12E10 se muestran en el ID SEC N°: 113.

### 55 8.4 Expresión del anticuerpo 12E10 (IgG, Fab) y el polipéptido Fv de cadena sencilla por una célula animal

El anticuerpo 12E10 (IgG, Fab) y el Fv de cadena sencilla derivado del anticuerpo 12E10 (secuencia conectora de 5 aminoácidos, 15 aminoácidos), se expresaron usando células COS-7 o células CHO.

60 La expresión transitoria usando células COS-7 se llevó a cabo como sigue. La transfección se llevó a cabo por el procedimiento de electroporación usando el equipo Gene Pulser II (BioRad). Para la expresión del anticuerpo 12E10 (IgG) se añadieron 10  $\mu$ g de cada uno de los vectores de expresión mencionados antes HEF-112E10H-gy1 y pCOS-12E10L, para la expresión del fragmento 12E10Fab se añadieron 10  $\mu$ g de cada uno de pFd-112E10H y pCOS-12E10L y para la expresión de Fv de cadena sencilla se añadieron pCOS-sc12E10 (10  $\mu$ g) o pCOS-db12E10 (10  $\mu$ g) a células COS-7 (1 x 10<sup>7</sup> células/ml) suspendidas en 0,8 ml de PBS. La mezcla mantenida en una cubeta se trató con pulsos a una capacidad de 1,5 kV, 25  $\mu$ FD. Después de recuperación durante 10 minutos a temperatura ambiente, las células electroporadas se añadieron al medio DMEM (GIBCO BRL) que contenía suero bovino fetal al 10% y se cultivaron. Después de cultivo durante toda la noche, las células se lavaron una vez con PBS, se añadieron a medio CHO-S-SFM

## ES 2 304 235 T3

II sin suero (GIBCO BRL) y se cultivaron durante 3 días. El líquido sobrenadante del cultivo se centrifugó para separar los restos celulares y se filtró con un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$ .

Para establecer una línea celular CHO de expresión estable para el Fv de cadena sencilla (polipéptido) derivado del anticuerpo 12E10, se introdujo el vector de expresión pCHO-sc12E10 o pCHO-ds12E10 en células CHO, respectivamente.

Cada vector de expresión se introdujo en células CHO por el procedimiento de electroporación usando el equipo Gene Pulser II (BioRad). Se mezclaron el ADN linealizado (100  $\mu\text{g}$ ) obtenido por digestión con la enzima de restricción PvuI y células CHO ( $1 \times 10^7$  células/ml) suspendidas en 0,8 ml de PBS en una cubeta, se dejaron reposar sobre hielo durante 10 minutos y se trataron con pulsos a la capacidad de 1,5 kV, 25  $\mu\text{FD}$ . Después de recuperación durante 10 minutos a temperatura ambiente, las células electroporadas se añadieron a medio CHO-S-SFM II (GIBCO BRL) que contenía suero bovino fetal dializado al 10% y ácido nucleico y se cultivaron. Después de cultivo durante 2 días, el cultivo se continuó en un medio CHO-S-SFM II sin ácido nucleico (GIBCO BRL) que contenía suero bovino fetal dializado al 10%. De estos clones obtenidos, se seleccionó un clon con una alta tasa de expresión como la línea celular productora para el Fv de cadena sencilla de 12E10. Después de cultivar en medio CHO-S-SFM II sin suero (GIBCO BRL), líquido sobrenadante del cultivo se centrifugó para separar los restos celulares y se filtró con un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$ .

### 8.5 Purificación de Fv de cadena sencilla derivado de 12E10 producido por células CHO

Los líquidos sobrenadantes de los cultivos producidos por las líneas celulares CHO que expresan los Fv de cadena sencilla de 12E10 obtenidos en el ejemplo 8.4 se purificaron por columna de anticuerpo anti-FLAG y columna de filtración en gel, respectivamente para producir los Fv de cadena sencilla purificados.

#### (1) Purificación con columna de anticuerpo anti-FLAG

Cada líquido sobrenadante de los cultivos (sc12E10 y db12E10) se añadió a la columna de gel de afinidad anti-FLAG M2 (SIGMA) equilibrada con tampón de Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) que contenía NaCl 150 mM. Después de lavar la columna con el mismo tampón, las proteínas adsorbidas en la columna eluyeron con tampón de glicina 100 mM (pH 3,5). Las fracciones eluidas se neutralizaron inmediatamente por adición de tampón de Tris-HCl 1 M (pH 8,0) y se analizaron por SDS-PAGE. Las fracciones que se confirmó que contenían el Fv de cadena sencilla se juntaron y concentraron aproximadamente 20 veces usando el Centricon-10 (AMICON).

#### (2) Filtración en gel

La solución concentrada obtenida en (1) se añadió a la columna Superdex200 HR (10x300 mm, AMERSHAM PHARMACIA) equilibrada con PBS que contenía Tween 20 al 0,01%. Los cromatogramas se muestran en las Figuras 53 y 54. El producto sc12E10 eluyó en dos picos (A, B) (véase la Figura 53). El producto db12E10 eluyó en dos picos (C, D) (véase la Figura 54). Se recogió la fracción de cada pico, se trató en presencia y ausencia de un agente reductor, se procesó por electroforesis de acuerdo con el procedimiento de Laemmli, y se tiñó con azul brillante de Coomassie después de la electroforesis. Como se muestra en la Figura 55, todas las fracciones A, B, C y D, independientemente de la presencia o ausencia del agente de reducción, produjeron una sola banda que tenía un peso molecular aparente de aproximadamente 31 kD. Cuando se analizaron estas fracciones por filtración en gel usando Superdex200 HR, la fracción A produjo un producto eluido a un peso molecular aparente de aproximadamente 42 kD, la fracción B a 20 kD (véase la Figura 56), la fracción C a 96 kD y la fracción D a 41 kD (véase la Figura 57). Los resultados sugieren que la fracción A derivada de sc12E10 es el dímero con enlace no covalente del Fv de cadena sencilla y la fracción B es el monómero de Fv de cadena sencilla, y la fracción C derivada de db12E10 es el trímero con enlace no covalente de Fv de cadena sencilla y D es el dímero con enlace no covalente de Fv de cadena sencilla.

### 8.6 Medición de la actividad agonista de tipo TPO de diferentes Fv de cadena sencilla

La actividad de tipo TPO del anticuerpo de cadena sencilla anti-mpl se evaluó midiendo la actividad de proliferación para las células BaF/3 (BaF/mpl) que expresan el receptor de TPO humano (MPL).

Después de lavar las células BaF/mpl dos veces con medio RPMI1640 (GIBCO) que contenía suero bovino fetal al 1%, las células se suspendieron en el medio con una densidad celular de  $5 \times 10^5$  células/ml. El anticuerpo de cadena sencilla anti-MPL o la TPO humana (R&D Systems) se diluyeron con el medio, respectivamente. Se añadieron 50  $\mu\text{l}$  de la suspensión celular y 50  $\mu\text{l}$  del anticuerpo o de la TPO humana diluidos en una microplaca de 96 pocillos (fondo plano) (Corning), y se cultivaron en un incubador con  $\text{CO}_2$  (concentración de  $\text{CO}_2$ : 5%) durante 24 horas. Después de la incubación, se añadieron 10  $\mu\text{l}$  de reactivo WST-8 (reactivo para medir el número de células SF originales: Nacalai Tesque) y se midió inmediatamente la absorbancia a una longitud de onda de medición de 450 nm y una longitud de onda de referencia de 655 nm usando el fotómetro de absorbancia Benchmark Plus (BioRad). Después de incubar en un incubador con  $\text{CO}_2$  (concentración de  $\text{CO}_2$ : 5%) durante 2 horas, se volvió a medir la absorbancia a 450 nm de longitud de onda de medición y 655 nm de longitud de onda de referencia usando el Benchmark Plus. Puesto que el reactivo WST-8 desarrollaba la reacción de color dependiendo del número de células vivas a la longitud de onda de 450 nm, la actividad de proliferación de BaF/mpl se evaluó basándose en el cambio de absorbancia en 2 horas.

## ES 2 304 235 T3

La actividad agonista frente a MPL medida usando los líquidos sobrenadantes del cultivo de células COS-7 que expresaban diferentes moléculas de anticuerpo 12E10 se muestra en la Figura 58. Los Fv de cadena sencilla que tenían el conector de 5 aminoácidos (ds12E10) y el conector de 15 aminoácidos (sc12E10) aumentaron la absorbancia de una forma dependiente de la concentración, mostrando la actividad agonista de tipo TPO (DE50, 9 pM y 51 pM respectivamente), mientras que 12E10IgG y 12E10Fab no tenían actividad.

Se ha mostrado que la cadena H y la cadena L del Fv de cadena sencilla se asocian no sólo dentro de una molécula sino también entre moléculas para formar multímeros, tal como dímeros. Los líquidos sobrenadantes del cultivo de células CHO que expresaban los Fv de cadena sencilla de 12E10 se filtraron en gel y se ensayó la actividad agonista en MPL. Los resultados se muestran en la Figura 59. El dímero, que estaba contenido en sc12E10 en una cantidad pequeña, mostró una actividad agonista de tipo TPO aproximadamente 5000 veces más fuerte (dímero de sc12E10, DE50, 1,9 pM) comparado con el monómero (monómero de sc12E10, DE50; >10 nM). La actividad era mayor que la de la TPO (DE50, 27 pM). El dímero de db12E10 (dímero de db12E10, DE50, 2,0 pM) mostró una actividad fuerte comparable a la del dímero de sc12E10. El trímero de db12E10 (DE50, 7,4 pM), que se suponía que era un trímero por el peso molecular obtenido por la filtración en gel, mostró una actividad alta que es menor que la del dímero db12E10. Estos resultados sugieren que para la actividad del anticuerpo 12E10 agonista es importante que el sitio de unión al antígeno sea bivalente (dímero). Teniendo en cuenta el hecho de que IgG de 12E10 no tenía actividad, se supone que son importantes otros factores además de ser bivalente, tal como la situación del sitio de unión al antígeno, la distancia o el ángulo.

### Explicación de los dibujos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## ES 2 304 235 T3

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

## ES 2 304 235 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

55 la fig. 47 es un esquema que muestra el procedimiento para la construcción del fragmento de ADN que codifica el Fv de cadena sencilla de 12B5 reconstruido que contiene la secuencia conectora que consiste en 15 aminoácidos y la estructura del mismo;

60 la fig. 48 muestra el resultado de la purificación de cada uno de los Fv de cadena sencilla de 12B5 por filtración en gel obtenido en el Ejemplo 7.5 (1), que ilustra que sc12B5 se dividió en dos picos (fracciones A y B);

la fig. 49 muestra el resultado analítico de cada una de las fracciones A y B por SDS-PAGE llevado a cabo en el Ejemplo 7.5 (2);

65 la fig. 50 muestra el resultado analítico de cada una de las fracciones A y B por la columna Superdex200 llevada a cabo en el Ejemplo 7.5 (2), que ilustra que el pico mayoritario de la fracción A eluía a un peso molecular aparente de aproximadamente 44 kD mostrado en (a) y que el pico mayoritario de la fracción B eluía a un peso molecular aparente de aproximadamente 22 kD mostrado en (b);

## ES 2 304 235 T3

la fig. 51 muestra el resultado de la medición de la actividad agonista de tipo TPO de sc12B5 y el anticuerpo 12B5 (IgG, Fab), que ilustra que 12B5IgG y el Fv de cadena sencilla monovalente (sc12B5) mostraban actividad agonista de tipo TPO de una forma dependiente de la concentración;

5 la fig. 52 muestra el resultado de la medición de la actividad agonista de tipo TPO del monómero y dímero de sc12B5, que ilustra que el Fv de cadena sencilla (dímero de sc12B5) que tiene el sitio de unión al antígeno bivalente tenía una actividad agonista aproximadamente 400 veces mayor que el sc12B5 monovalente y que la eficacia es equivalente a o mayor que la de la TPO humana;

10 la fig. 53 muestra el resultado de la purificación de la cadena sencilla de sc12E10 obtenida por cromatografía de filtración en gel usando una columna Superdex200HR, que ilustra que sc12E10 se dividía en dos picos (fracciones A y B);

15 la fig. 54 muestra el resultado de la purificación de la cadena sencilla de db12E10 obtenida por cromatografía de filtración en gel usando una columna Superdex200HR, que ilustra que db12E10 se dividía en dos picos (fracciones C y D);

20 la fig. 55 muestra el análisis por SDS-PAGE de las fracciones A y B (sc12E10) y las fracciones C y D (db12E10) en condiciones reductoras y no reductoras;

25 la fig. 56 muestra el resultado analítico de las fracciones A y B por cromatografía de filtración en gel usando la columna Superdex200HR, que ilustra (1) el pico principal de la fracción A que eluía a un peso molecular aparente de aproximadamente 42 kD y (2) el pico principal de la fracción B que eluía a un peso molecular aparente de aproximadamente 20 kD;

30 la fig. 57 muestra el resultado analítico de las fracciones C y D por cromatografía de filtración en gel usando la columna Superdex200HR, que ilustra (1) el pico principal de la fracción C que eluía a un peso molecular aparente de aproximadamente 69 kD y (2) el pico principal de la fracción D que eluía a un peso molecular aparente de aproximadamente 41 kD;

35 la fig. 58 es una gráfica que muestra la actividad agonista de diferentes moléculas de anticuerpo 12E10 en MPL, que ilustra que los Fv de cadena sencilla (sc12E10, db12E10) mostraban actividad agonista de tipo TPO, mientras que 12E10 IgG y 12E10 Fab no;

la fig. 59 es una gráfica que muestra la actividad agonista del monómero y el dímero de sc12E10 y el dímero y el trímero de db12E10 en MPL, que ilustra que el dímero de sc12E10 y el dímero y trímero de db12E10 mostraban mayor actividad agonista de tipo TPO que la TPO.

### Aplicabilidad industrial

40 Los anticuerpos modificados de la invención tienen una actividad agonista capaz de transducir una señal dentro de las células por reactividad cruzada con una molécula(s) de la superficie celular y son ventajosos en cuanto que la permeabilidad en tejidos y tumores es alta debido al tamaño molecular reducido comparado con la molécula de anticuerpo (IgG entera). Esta invención proporciona los anticuerpos modificados con una actividad agonista notablemente mayor que la TPO o los anticuerpos originales (IgG entera). En especial, incluso los anticuerpos originales sin actividad agonista se pueden alterar en los anticuerpos modificados con una actividad agonista mayor que la TPO. Por lo tanto, los anticuerpos modificados se pueden usar como agonistas de transducción de señales. La modificación de la molécula de anticuerpo da como resultado la reducción de los efectos secundarios producidos por la reactividad cruzada intercelular y proporciona nuevos medicamentos que sólo inducen la acción requerida por reactividad cruzada con una molécula(s) de la superficie celular. Las preparaciones médicas que contienen como principio activo los anticuerpos modificados de la invención son útiles como agentes de prevención y/o remedios para enfermedades sanguíneas relacionadas con plaquetas, trombocitopenia producida por quimioterapia para cánceres o leucemia y similares.

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo modificado que comprende dos o más regiones V de la cadena H y dos o más regiones V de la cadena L de un anticuerpo y que muestra acción agonista de TPO por reactividad cruzada con el receptor de TPO, en el que el anticuerpo modificado es:
- (i) un multímero del Fv de cadena sencilla que comprende una región V de la cadena H y una región V de la cadena L; o
- 10 (ii) un polipéptido de cadena sencilla que comprende dos o más regiones V de la cadena H y dos o más regiones de la cadena L.
2. El anticuerpo modificado de la reivindicación 1, en el que la región V de la cadena H y la región V de la cadena L están conectadas por un conector.
- 15 3. El anticuerpo modificado de la reivindicación 2 ó 3, en el que el conector es un conector peptídico que comprende al menos un aminoácido.
- 20 4. El anticuerpo modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo modificado está compuesto del tetrámero, trímero o dímero del Fv de cadena sencilla.
5. El anticuerpo modificado de la reivindicación 4, en el que el anticuerpo modificado está compuesto del dímero del Fv de cadena sencilla.
- 25 6. El anticuerpo modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo modificado es un polipéptido de cadena sencilla que comprende dos regiones V de la cadena H y dos regiones V de la cadena L.
7. El anticuerpo modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el anticuerpo modificado además comprende una secuencia(s) de aminoácidos para la purificación del péptido.
- 30 8. El anticuerpo modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el anticuerpo modificado se ha purificado.
- 35 9. El anticuerpo modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la región V de la cadena H y/o la región V de la cadena L es la región V de la cadena H y/o la región V de la cadena L derivadas de un anticuerpo humano.
- 40 10. El anticuerpo modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la región V de la cadena H y/o la región V de la cadena L es la región V de la cadena H y/o la región V de la cadena L humanizadas.
11. El anticuerpo modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el anticuerpo modificado es un anticuerpo modificado monoespecífico.
- 45 12. El anticuerpo modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el anticuerpo modificado es el anticuerpo modificado multiespecífico.
13. El anticuerpo modificado de la reivindicación 12, en el que el anticuerpo modificado es un anticuerpo modificado biespecífico.
- 50 14. El anticuerpo modificado de la reivindicación 11, en el que la región V de la cadena L y la región V de la cadena H proceden del mismo anticuerpo monoclonal.
15. El anticuerpo modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que deriva de un anticuerpo original que sustancialmente no tiene acción agonista.
- 55 16. Un ADN que codifica el anticuerpo modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.
17. Una célula animal que produce el anticuerpo modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.
- 60 18. Un microorganismo que produce el anticuerpo modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.
19. Un medicamento que comprende como principio activo el anticuerpo modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.
- 65 20. Uso del anticuerpo modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, para preparar un medicamento para tratar la trombocitopenia.

## ES 2 304 235 T3

21. Un procedimiento de selección de un anticuerpo modificado que comprende dos o más regiones V de la cadena H y dos o más regiones V de la cadena L del anticuerpo y que muestra una acción agonista por reactividad cruzada con el receptor de TPO, en el que el anticuerpo modificado es

5 (i) un multímero del Fv de cadena sencilla que comprende una región V de la cadena H y una región V de la cadena L; o

(ii) un polipéptido de cadena sencilla que comprende dos o más regiones V de la cadena H y dos o más regiones de la cadena L,

10

que comprende las etapas de

(1) producir un anticuerpo modificado que comprende dos o más regiones V de la cadena H y dos o más regiones V de la cadena L del anticuerpo y que se une específicamente al receptor de TPO,

15

(2) someter las células que expresan dicho receptor de TPO a reacción con el anticuerpo modificado y

(3) medir la acción agonista de TPO en las células producida por reactividad cruzada con el receptor de TPO.

20

22. Un procedimiento de medición de la acción agonista de un anticuerpo modificado que comprende dos o más regiones V de la cadena H y dos o más regiones V de la cadena L del anticuerpo y que muestra una acción agonista por reactividad cruzada con el receptor de TPO, en el que el anticuerpo modificado es

25 (i) un multímero del Fv de cadena sencilla que comprende una región V de la cadena H y una región V de la cadena L; o

(ii) un polipéptido de cadena sencilla que comprende dos o más regiones V de la cadena H y dos o más regiones de la cadena L,

30

que comprende las etapas de

(1) producir un anticuerpo modificado que comprende dos o más regiones V de la cadena H y dos o más regiones V de la cadena L del anticuerpo y que se une específicamente al receptor de TPO,

35

(2) someter las células que expresan dicho receptor de TPO a reacción con el anticuerpo modificado y

(3) medir la acción agonista de TPO en las células producida por reactividad cruzada con el receptor de TPO.

40

23. El anticuerpo modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para su uso en un método para el tratamiento de la trombocitopenia.

45

50

55

60

65



Fig. 1

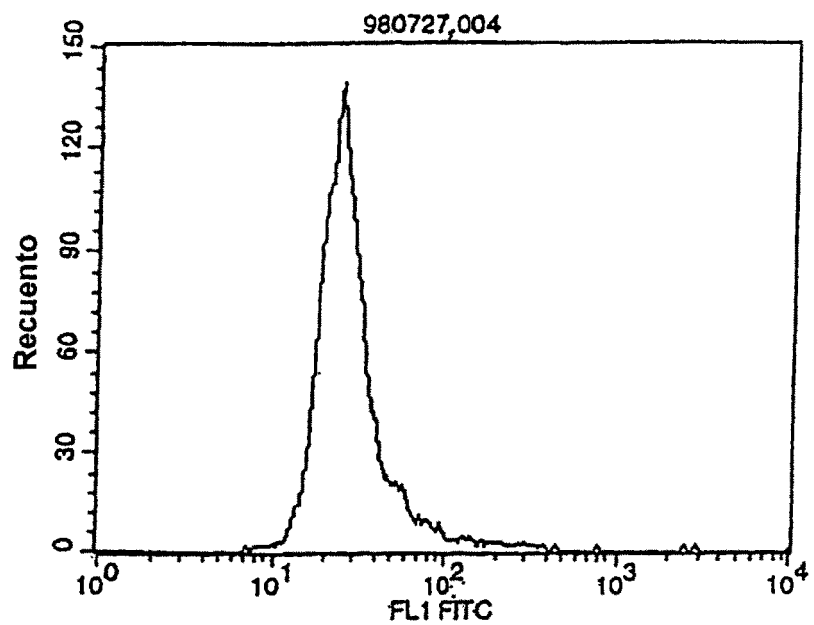


Fig. 2

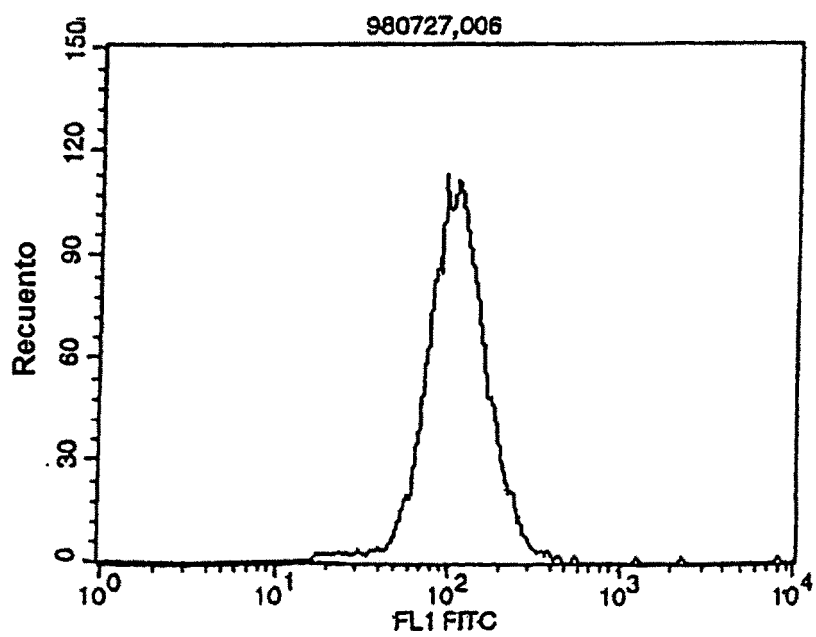


Fig. 3

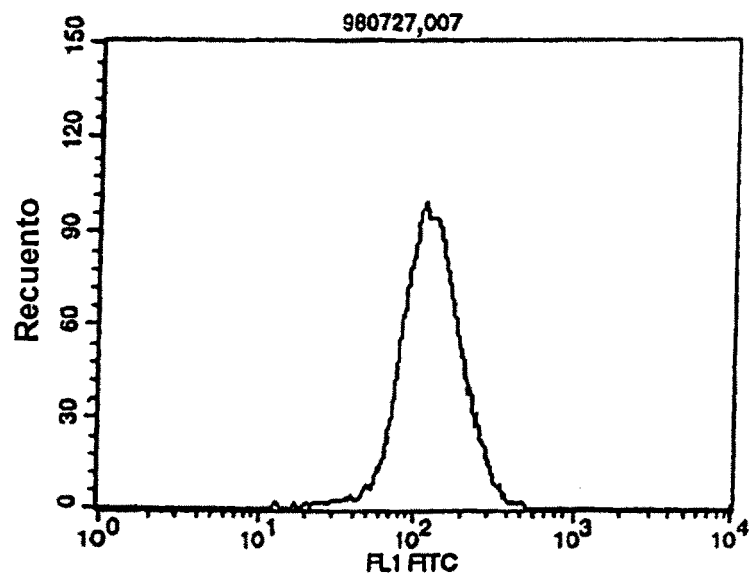


Fig. 4

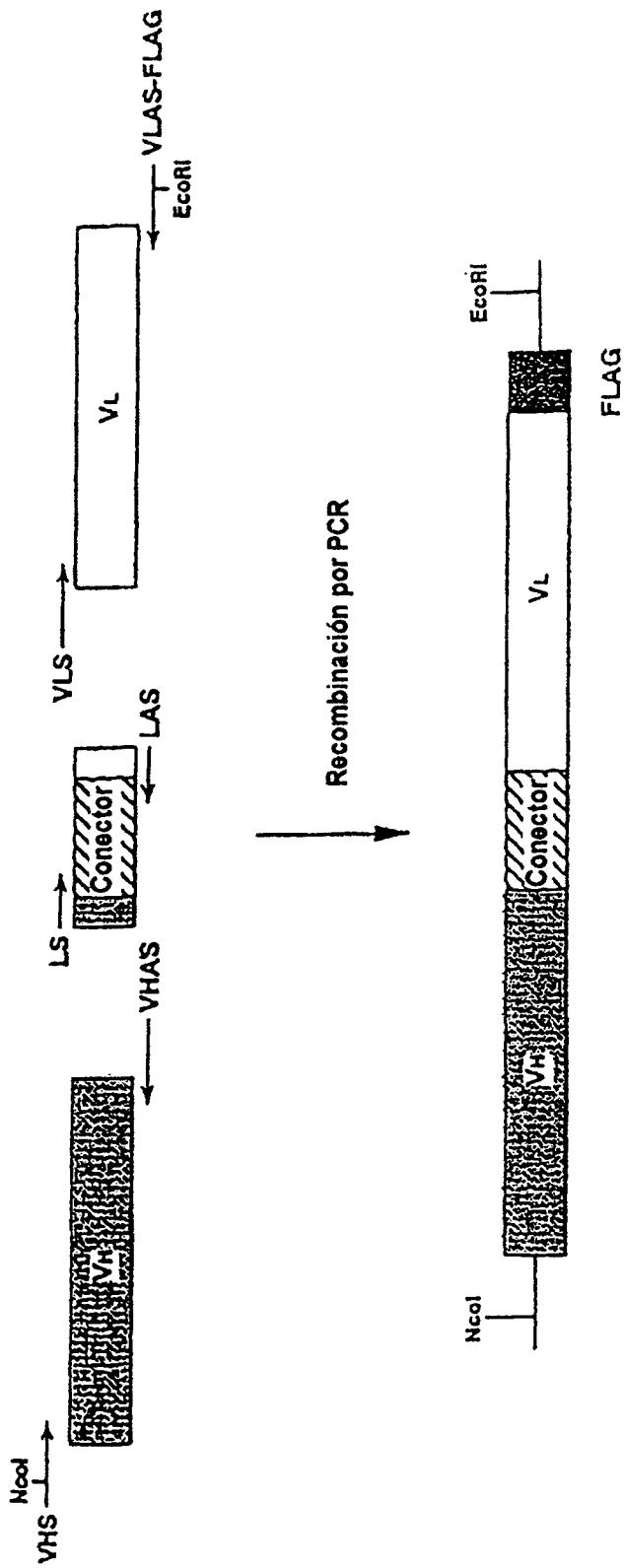


Fig. 5

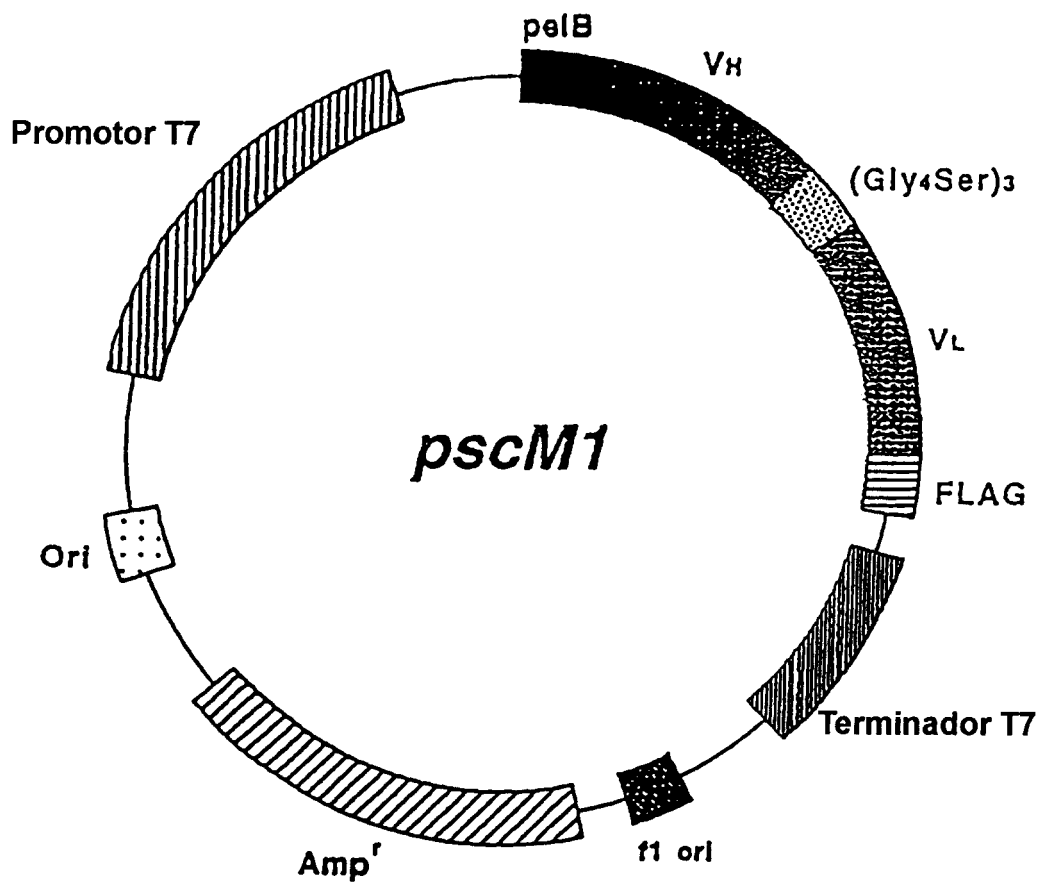


Fig. 6

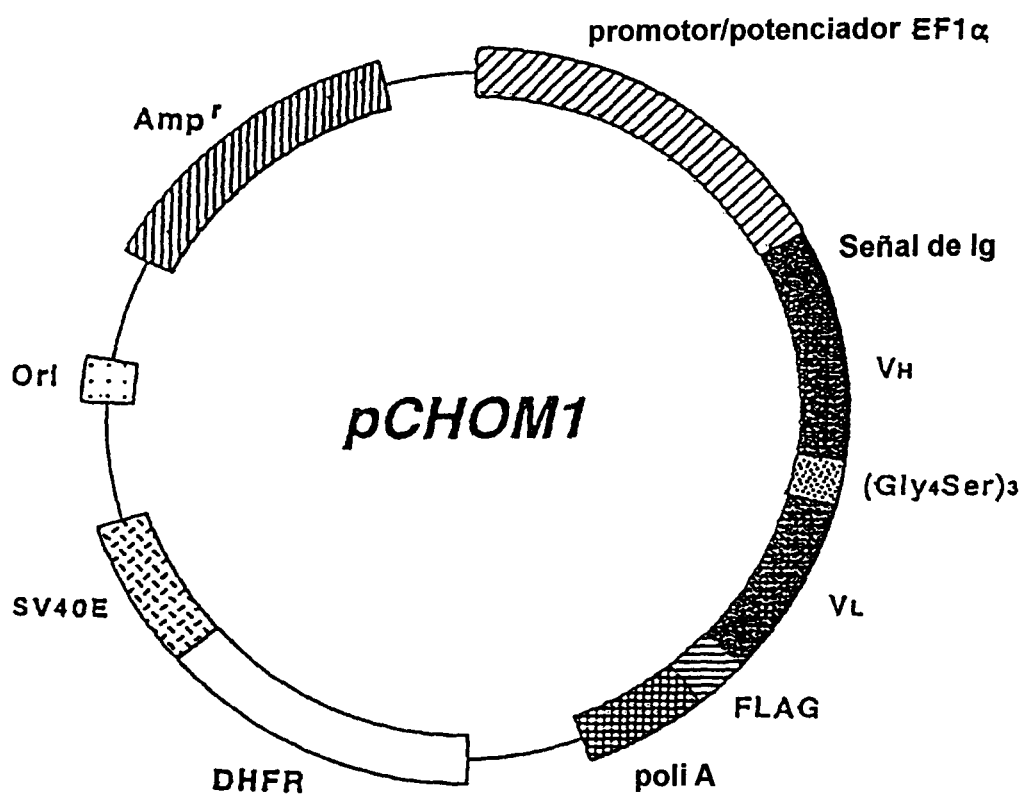


Fig. 7

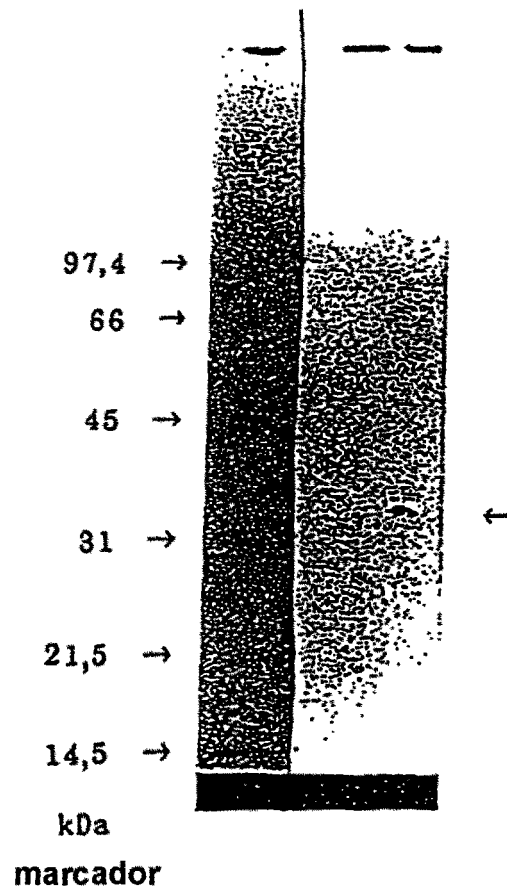


Fig. 8

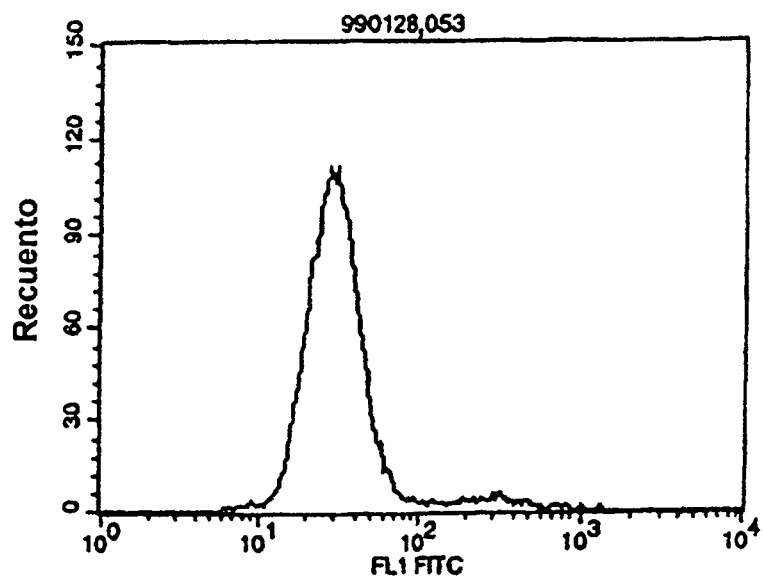


Fig. 9

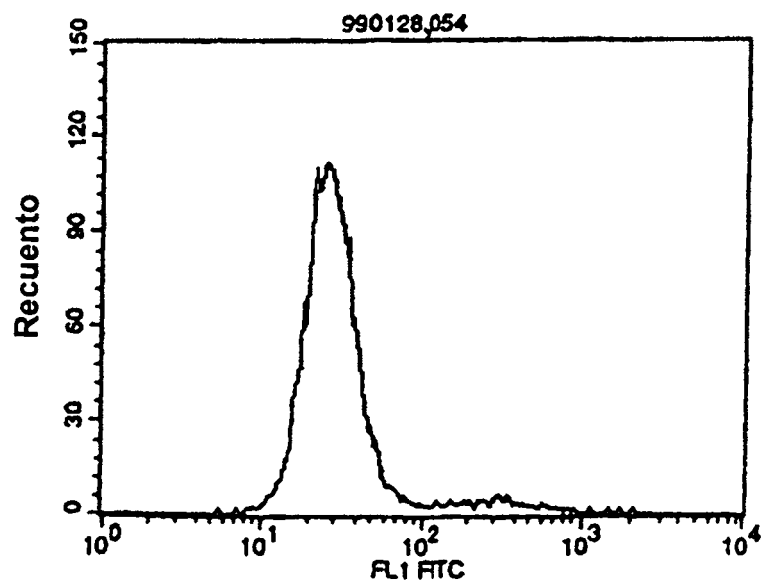


Fig. 10

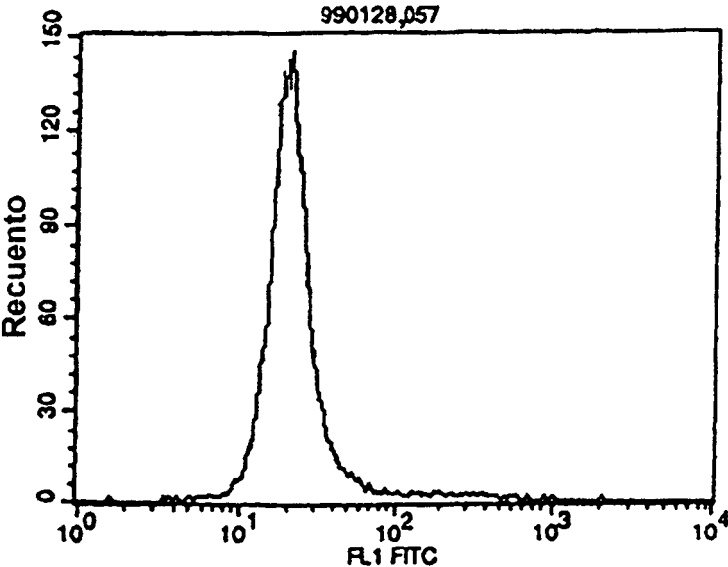


Fig. 11

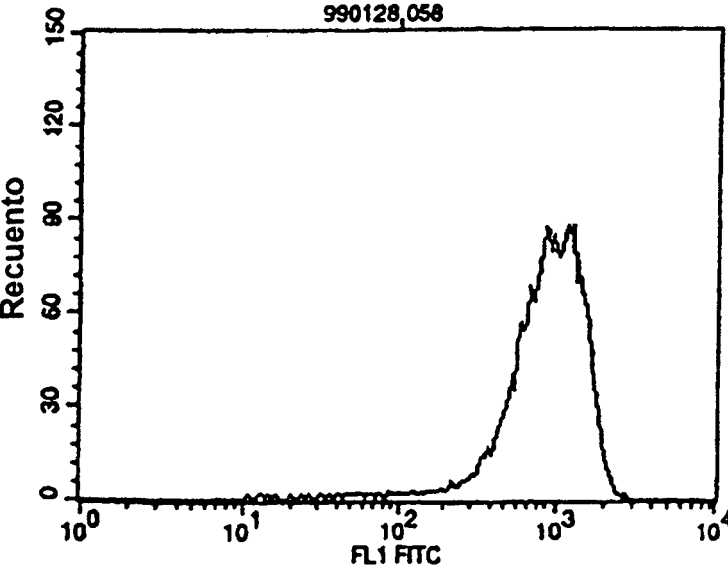




Fig. 12

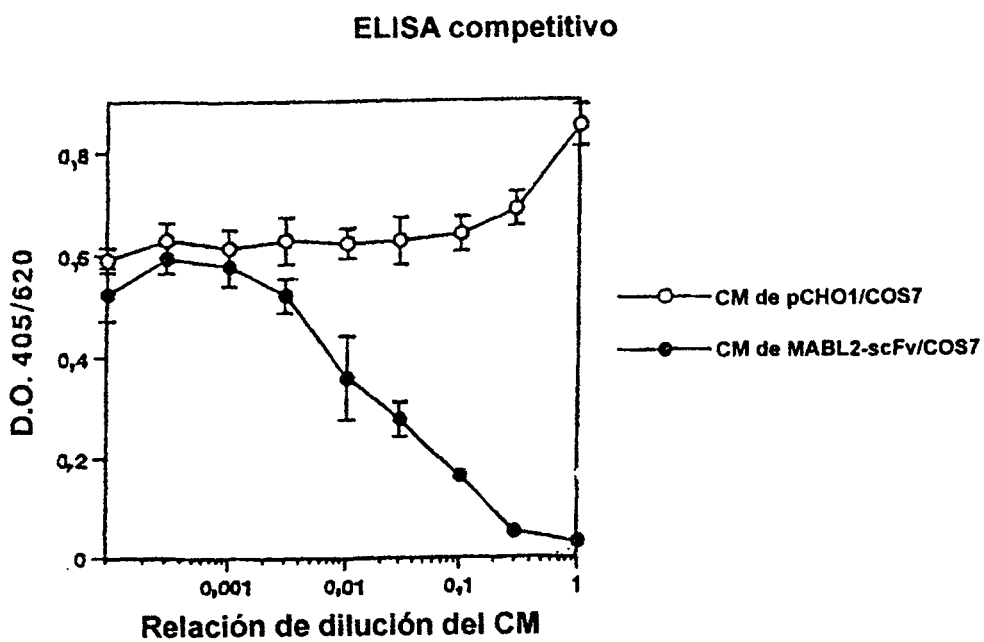


Fig. 13

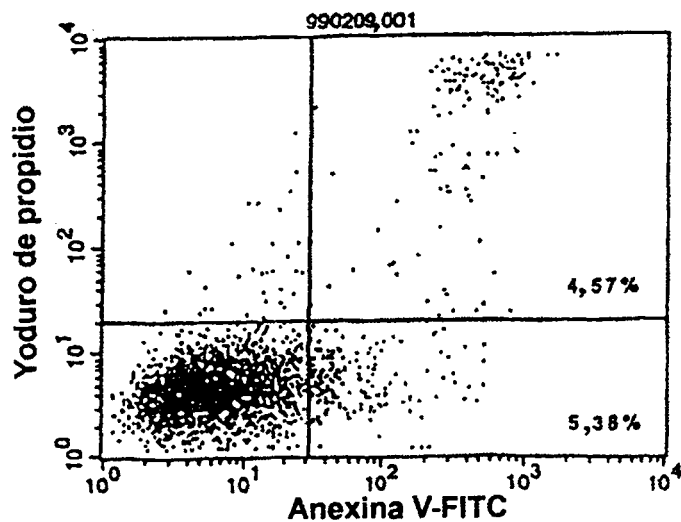


Fig. 14

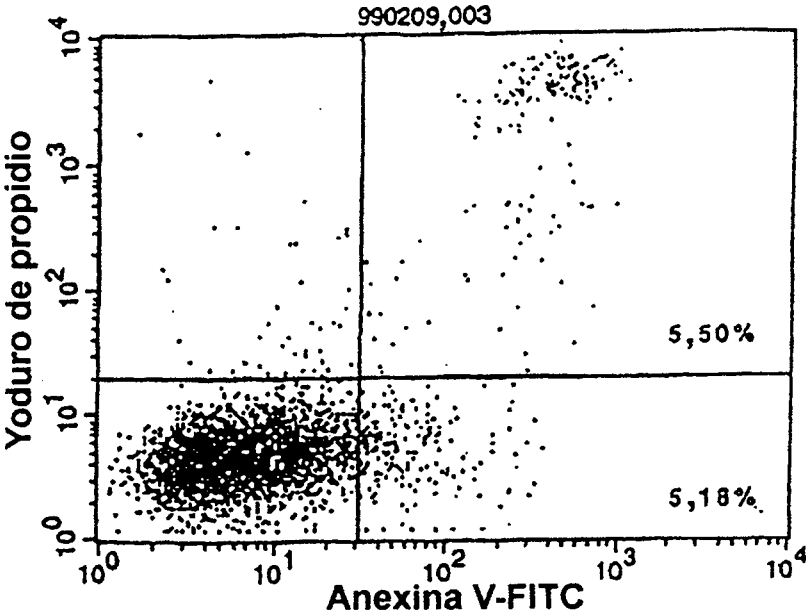


Fig. 15

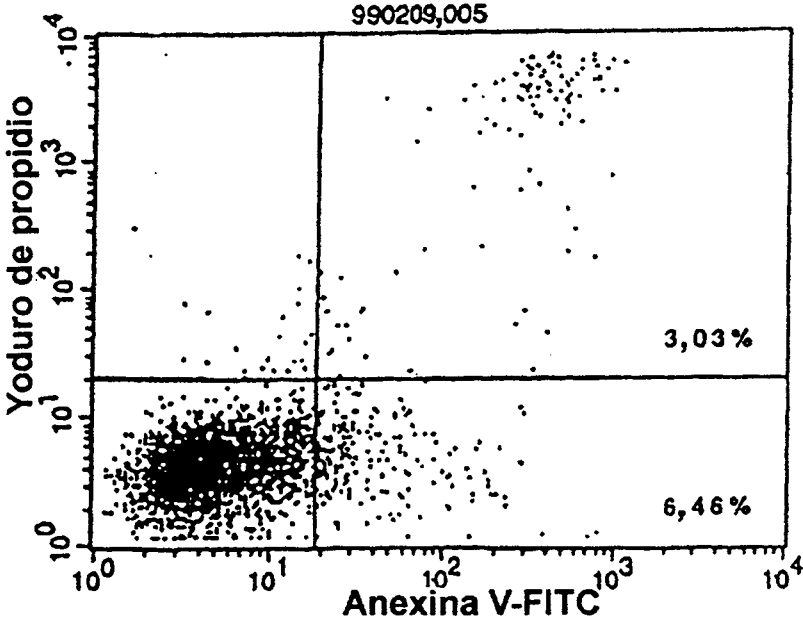


Fig. 16

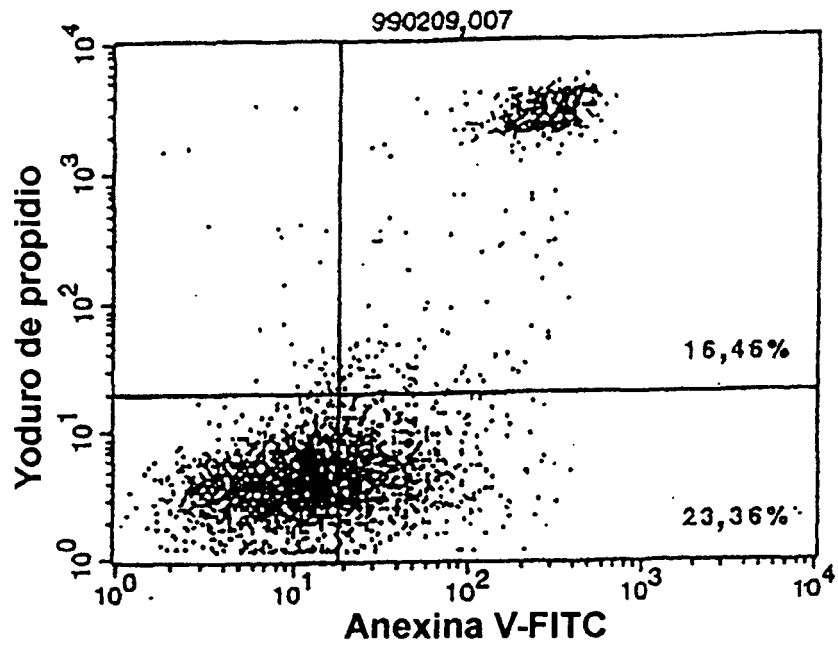


Fig. 17

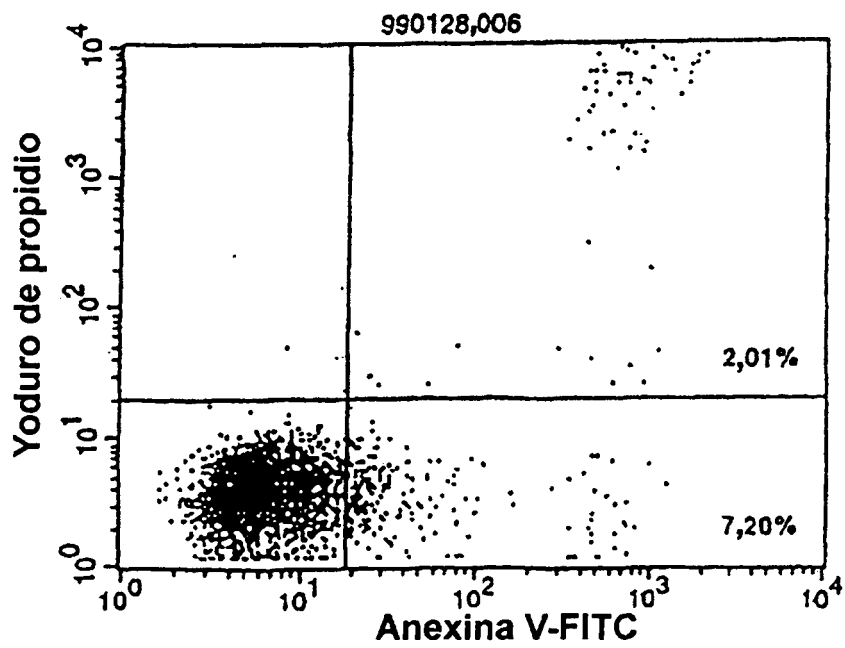


Fig. 18

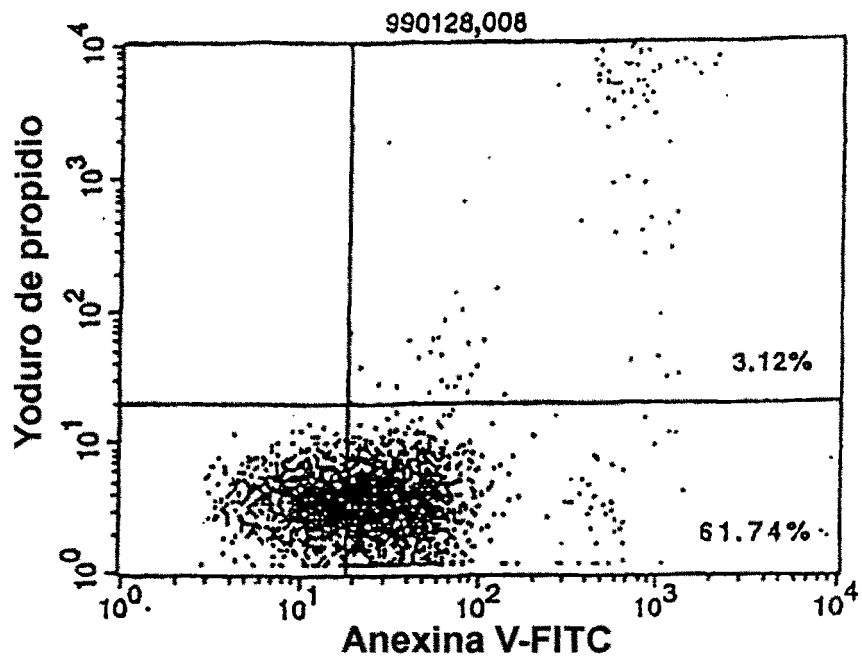


Fig. 19

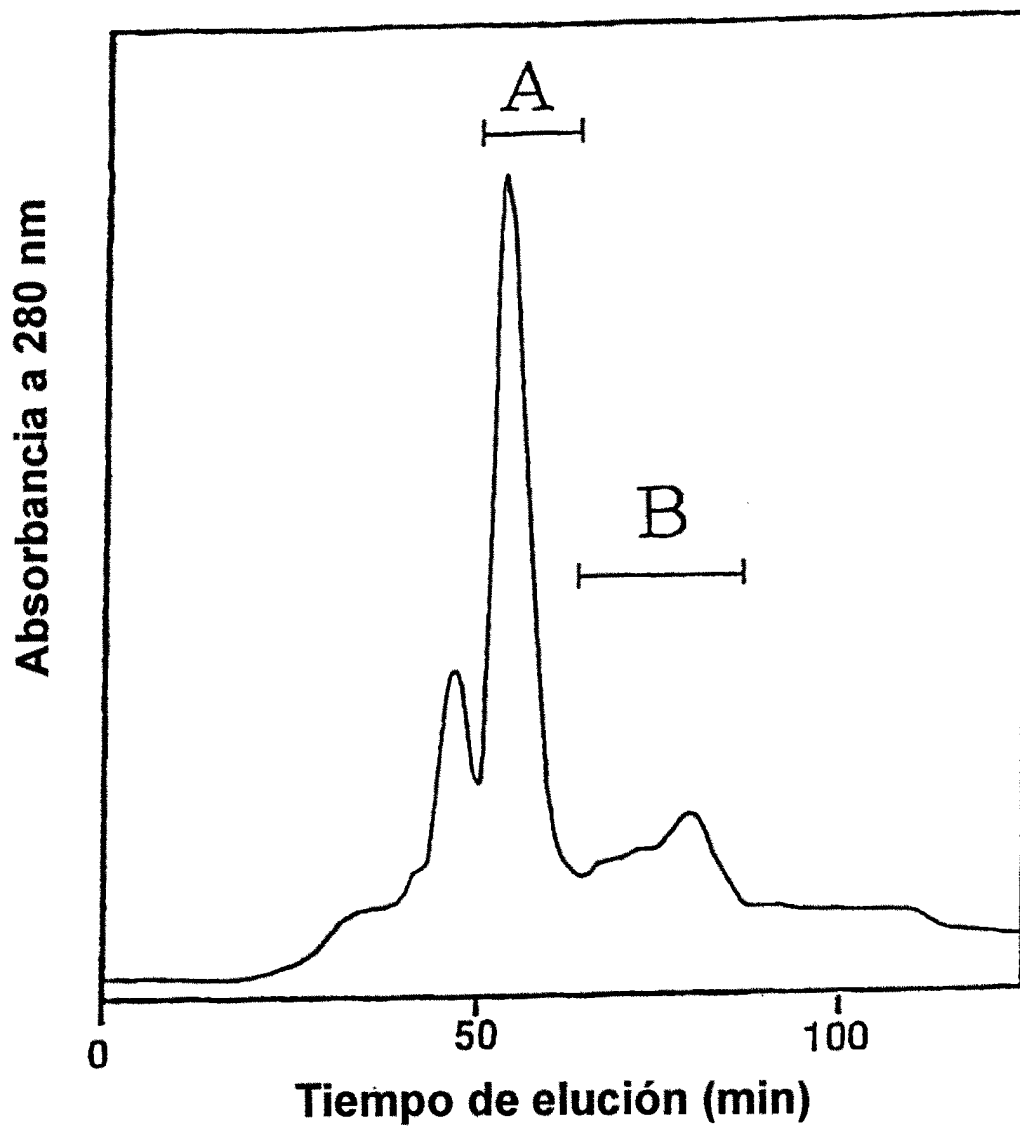


Fig. 20

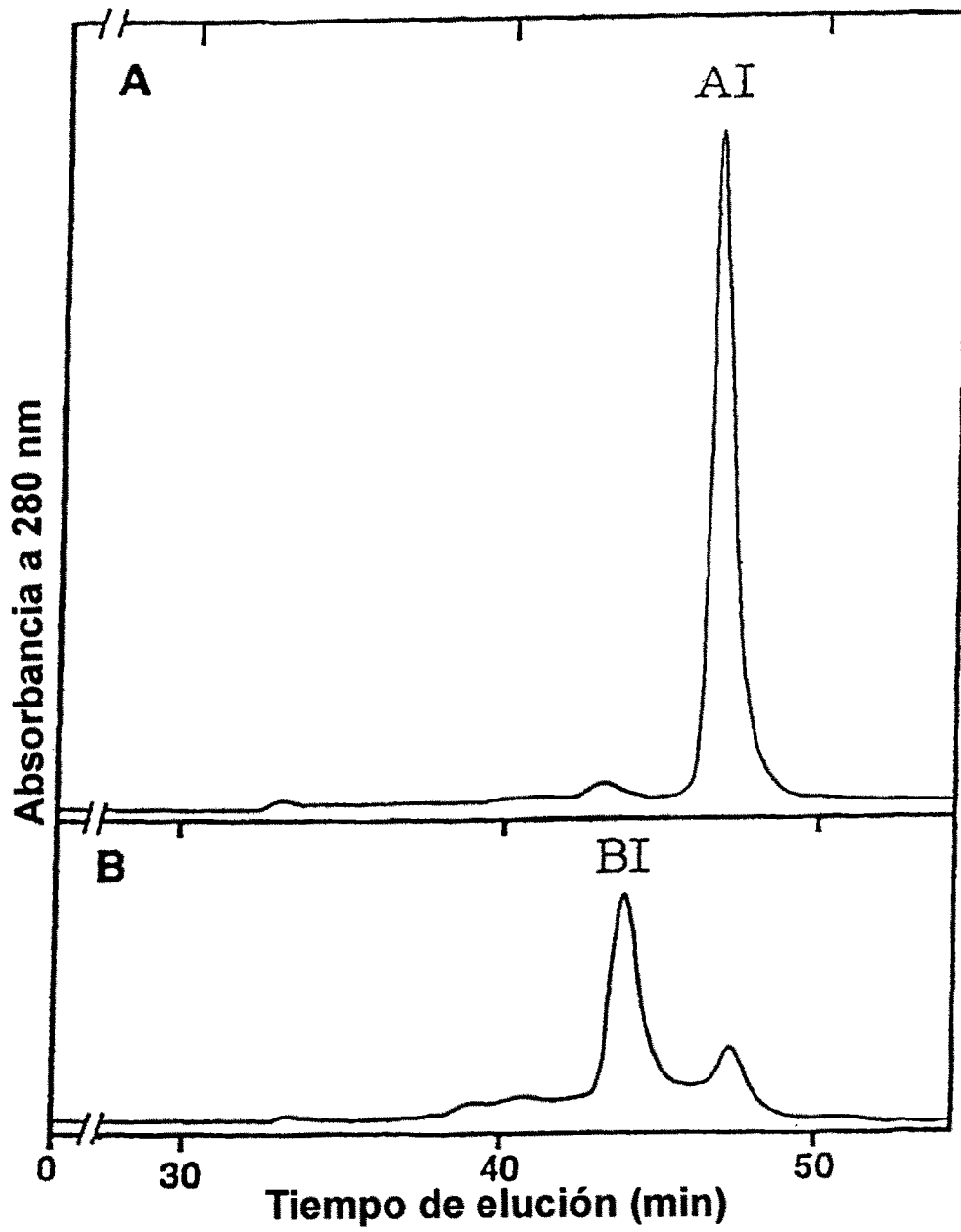


Fig. 21

### Análisis por SDS-PAGE de MABL2-scFv

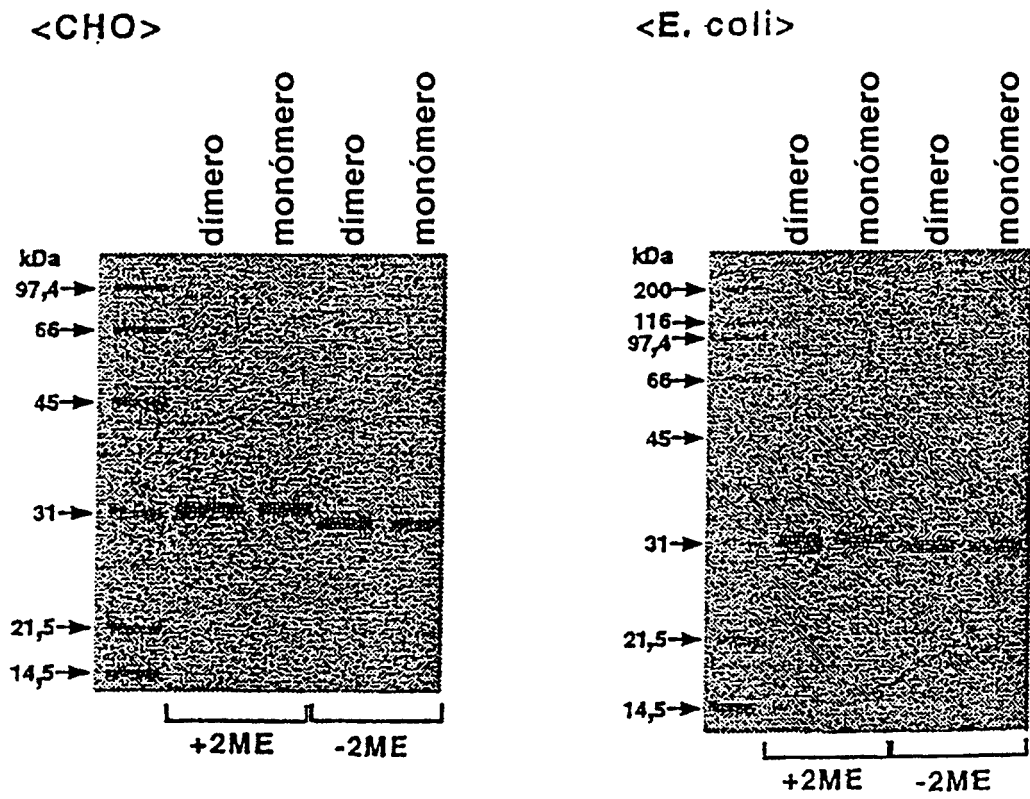


Fig. 22

Gel TSK G3000SW

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

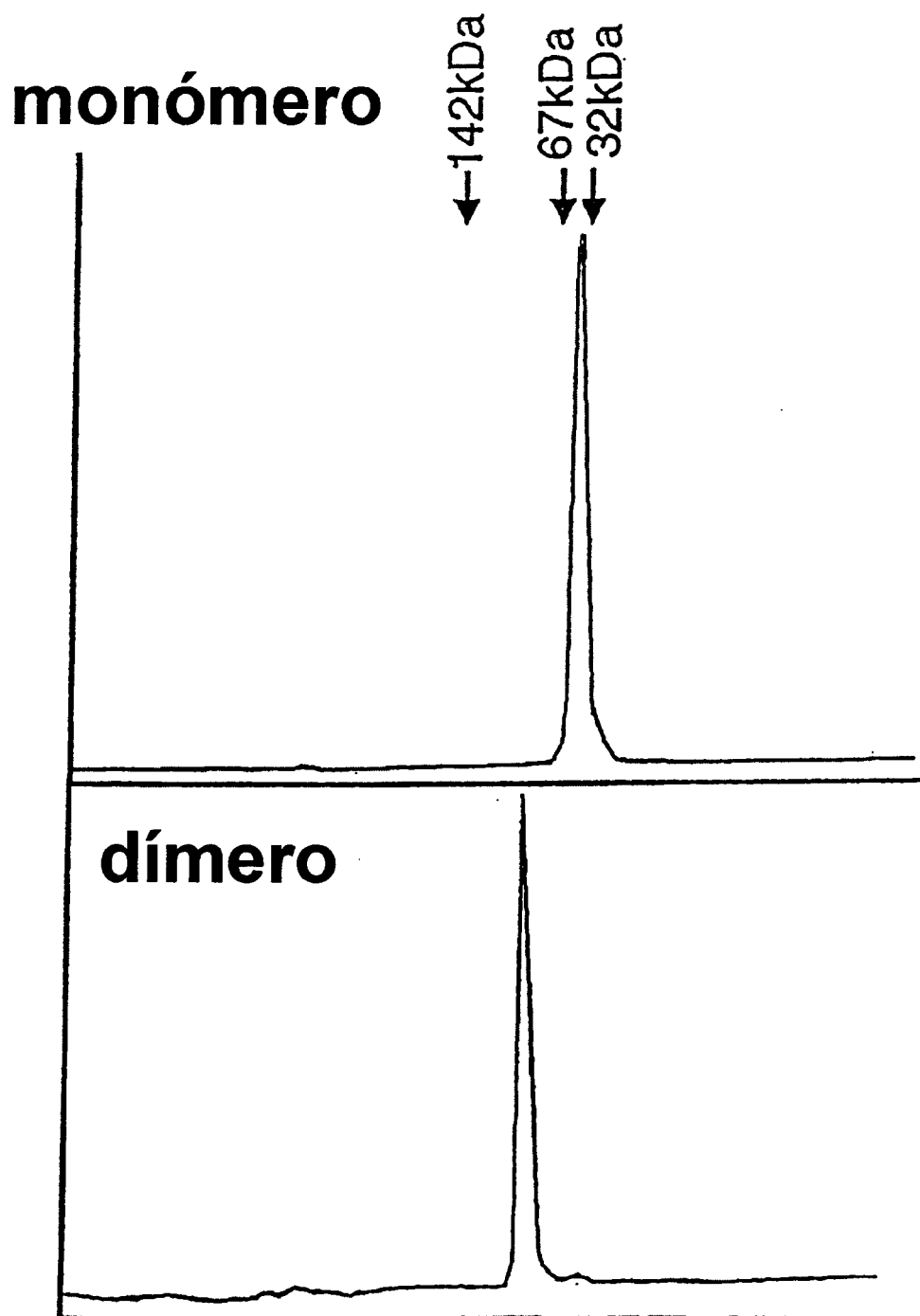
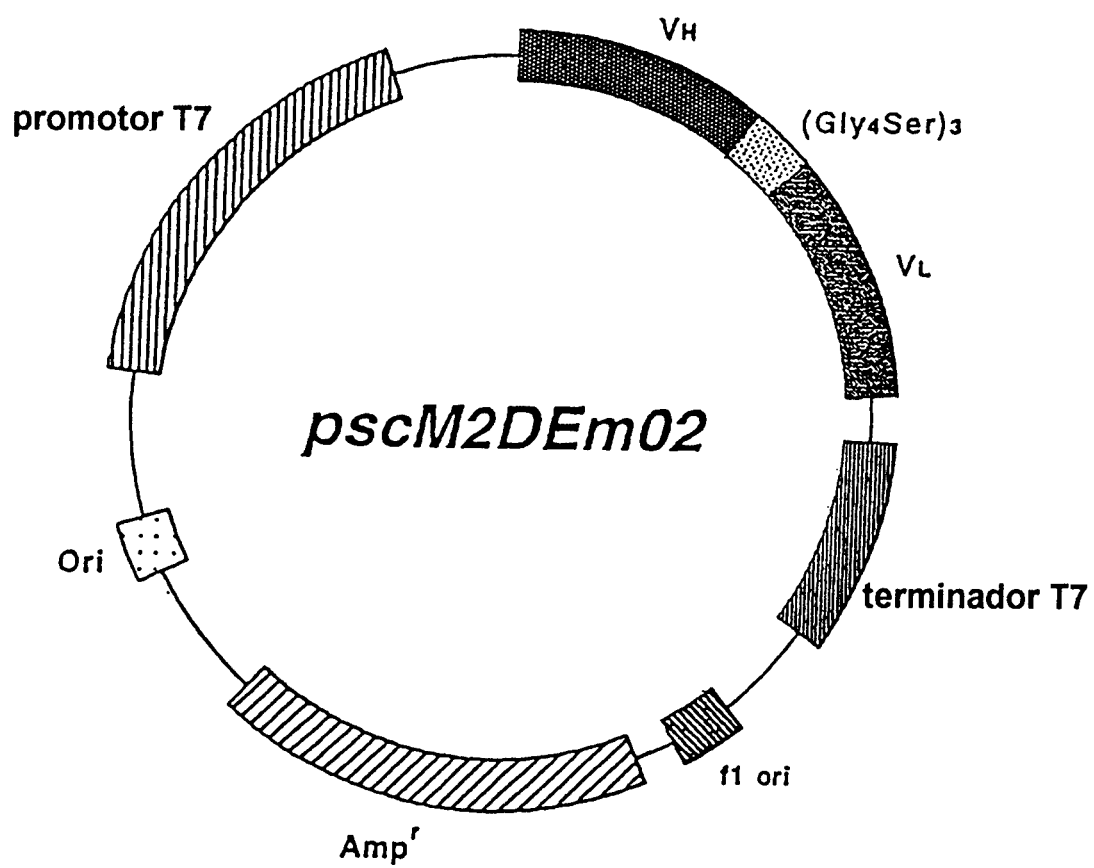




Fig. 23



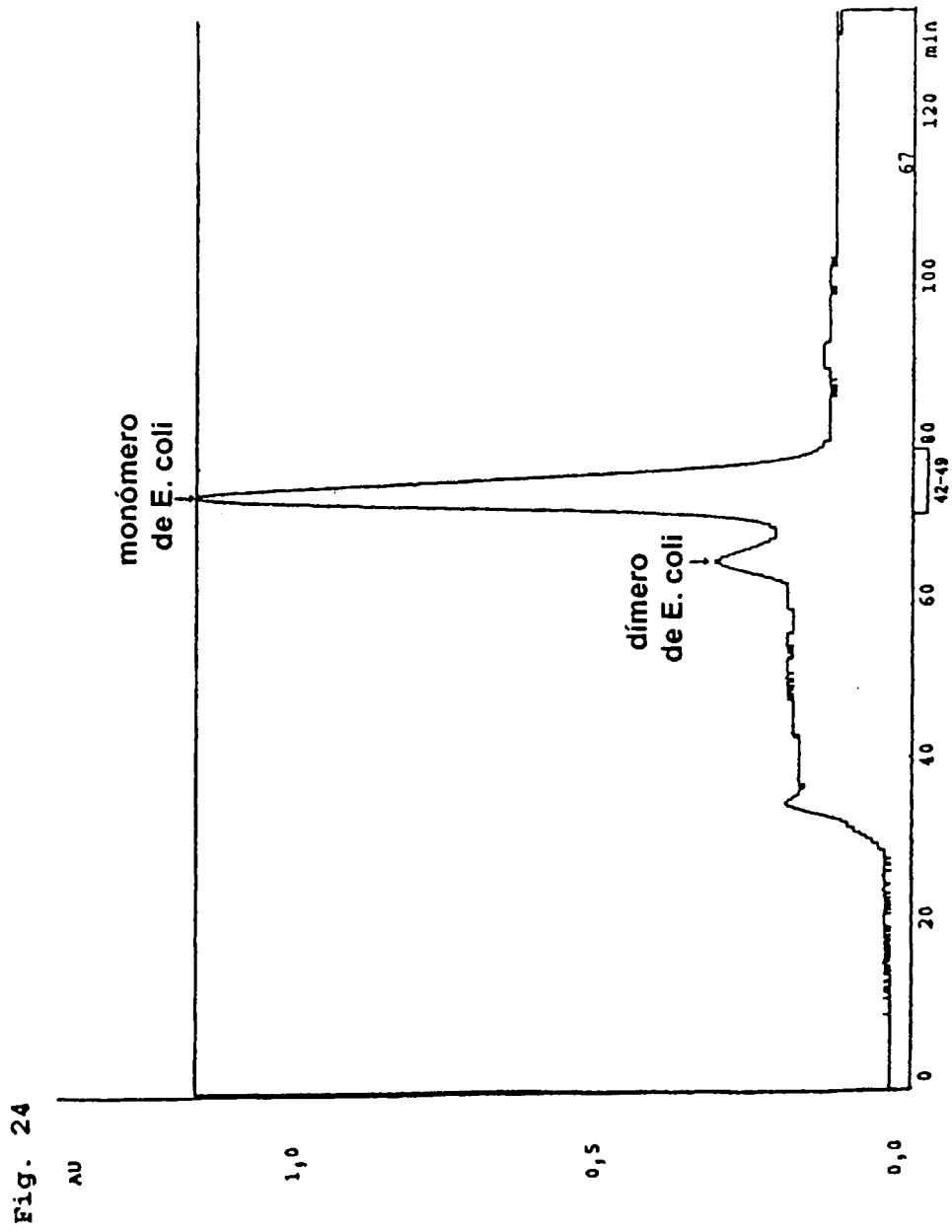


Fig. 25

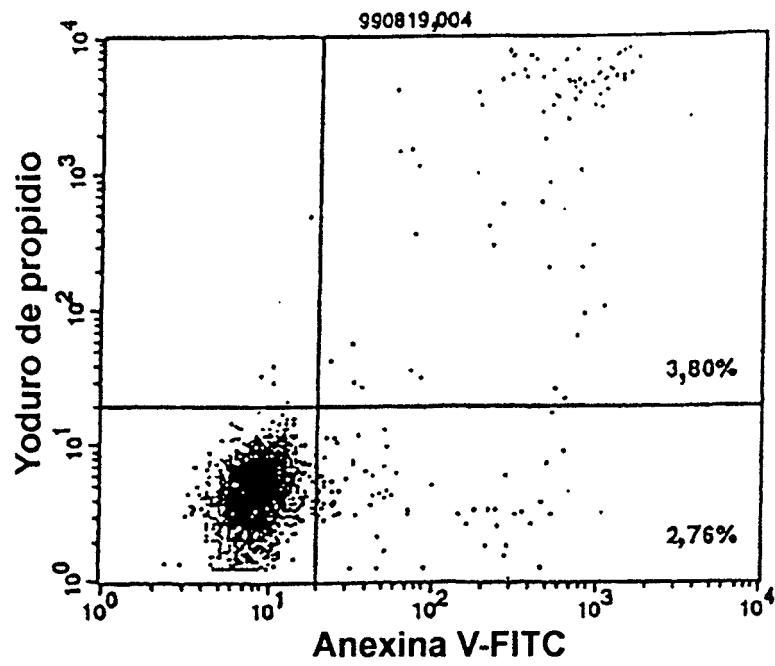


Fig. 26

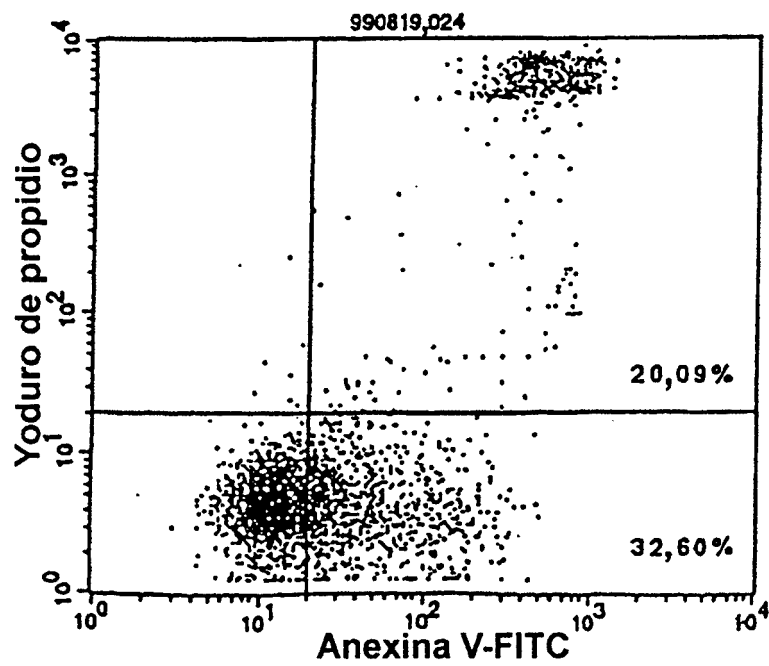


Fig. 27

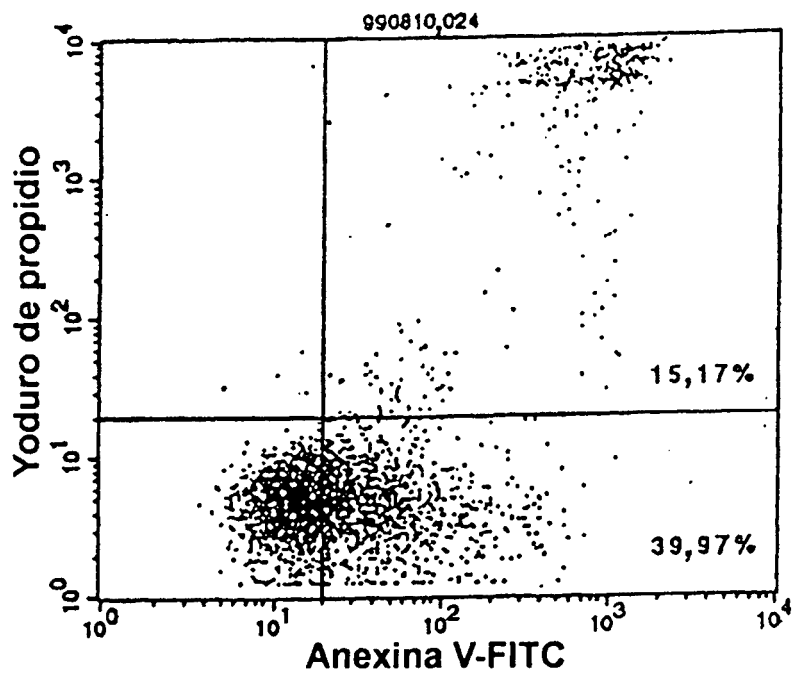


Fig. 28

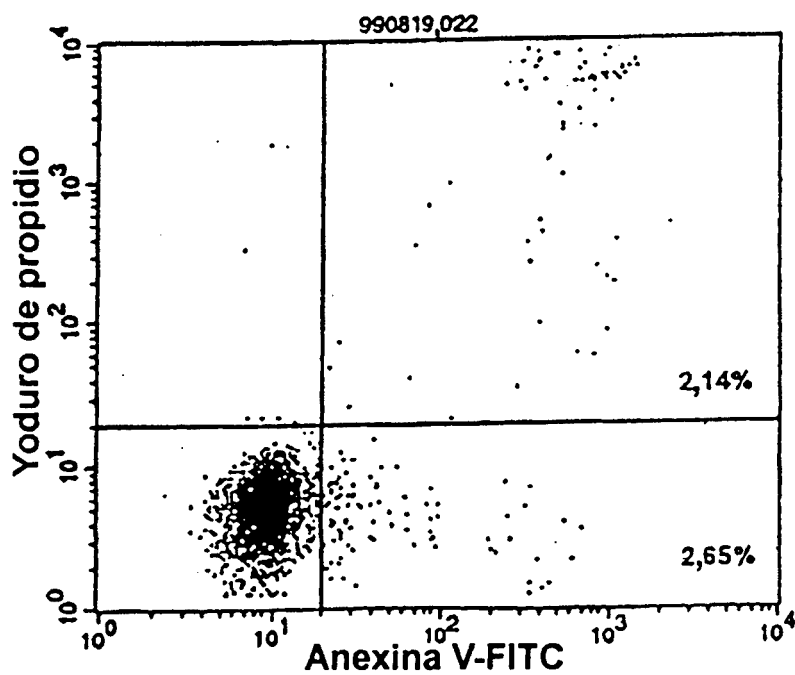


Fig. 29

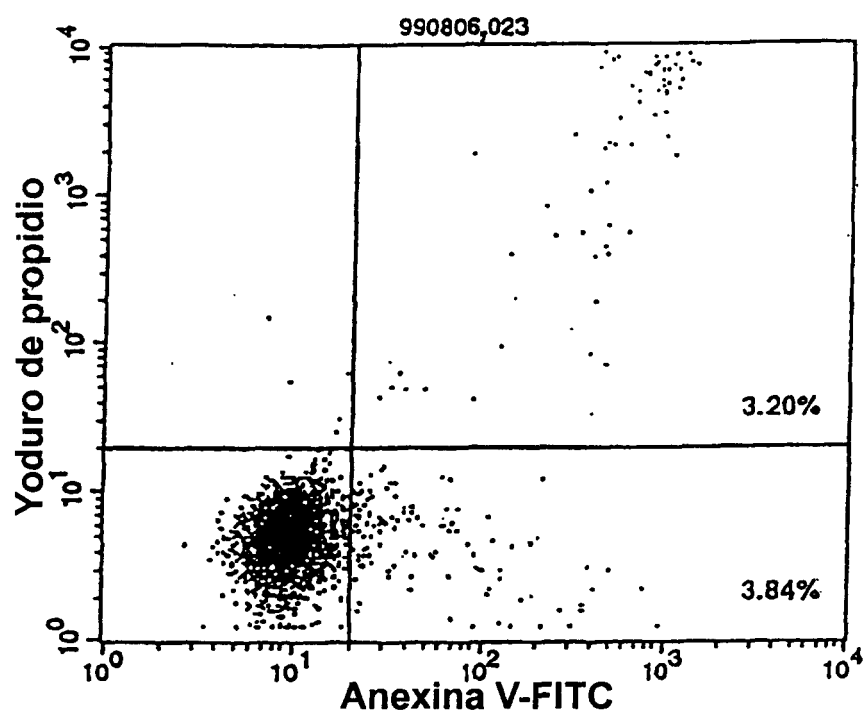


Fig. 30

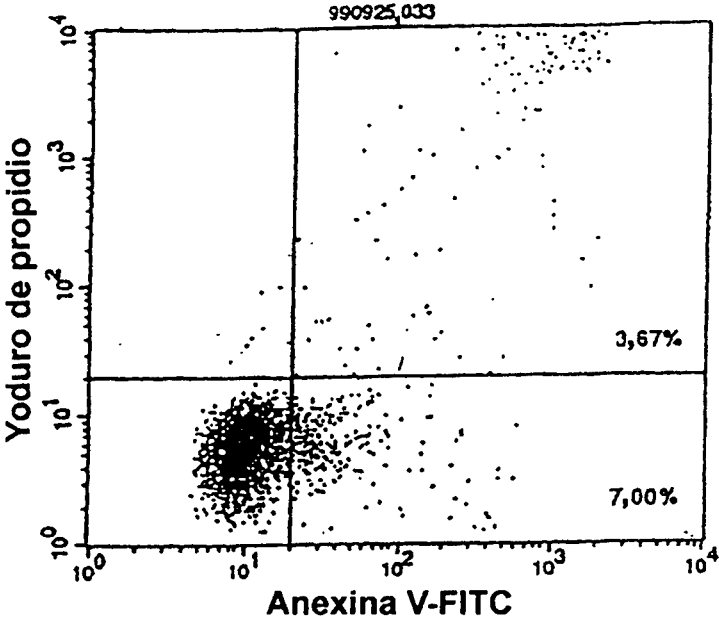


Fig. 31

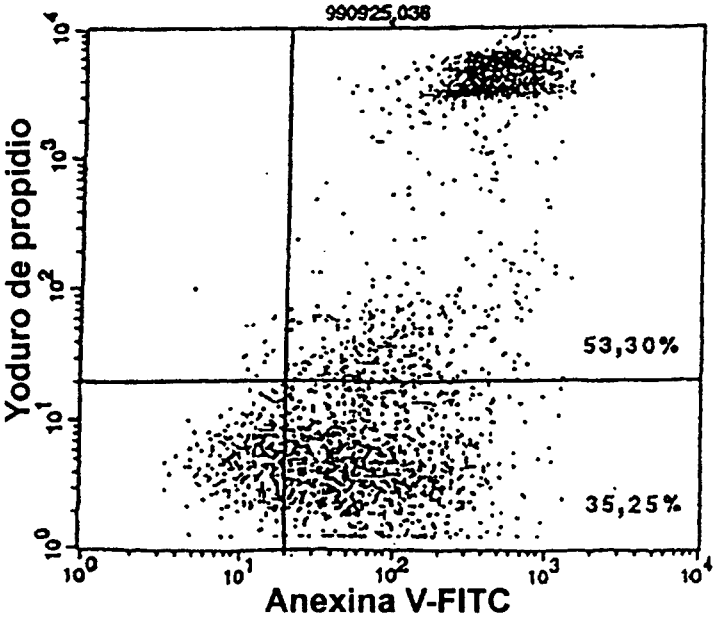
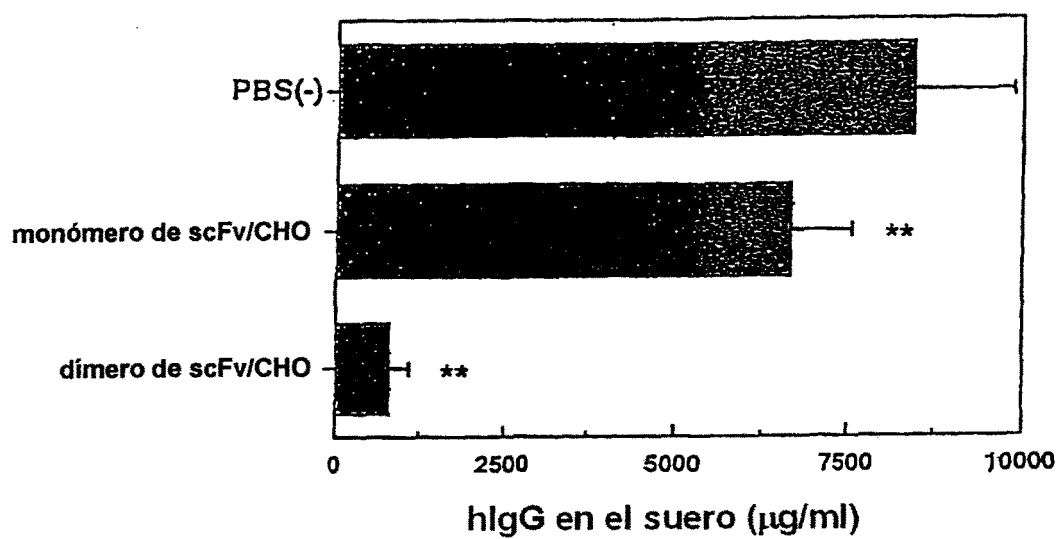


Fig. 32

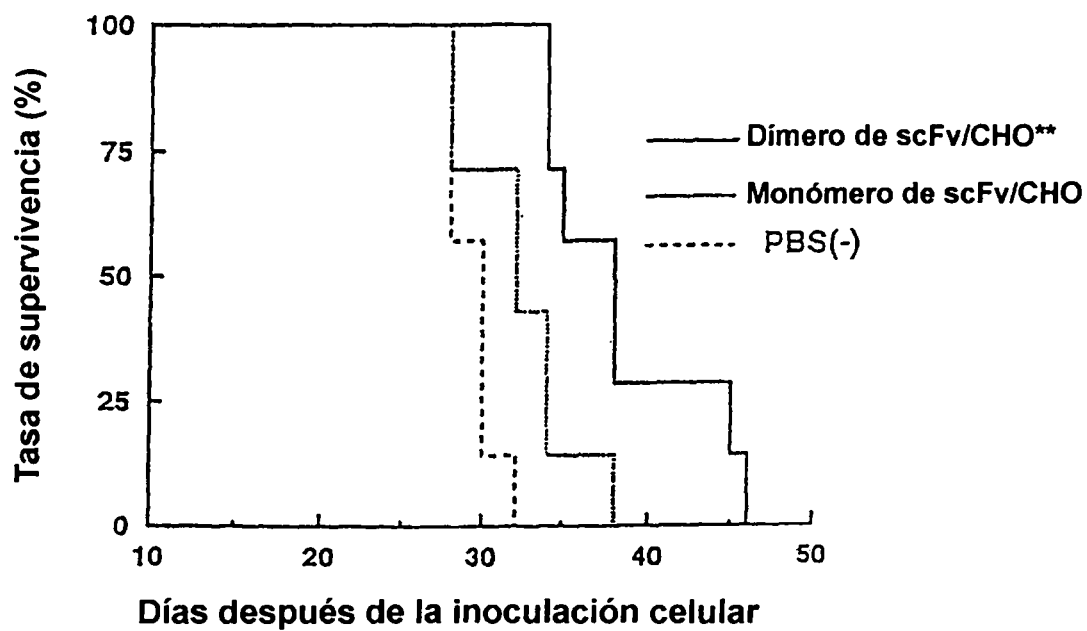
*Efecto de MABL-2(scFv) sobre la hlgG del suero en ratones SCID, KPMM2 i.v.*



\*\* :  $p < 0,01$

Fig. 33

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



\*\*; P<0,01 por ensayo t



Fig. 34

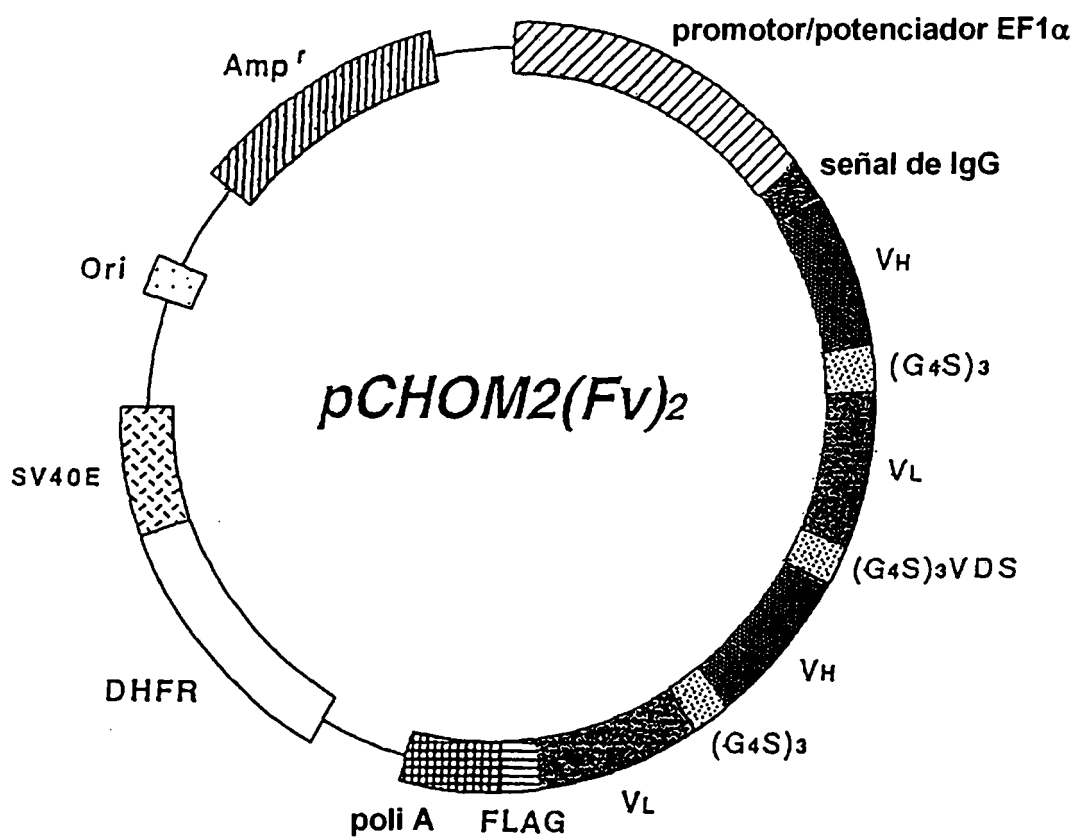


Fig. 35

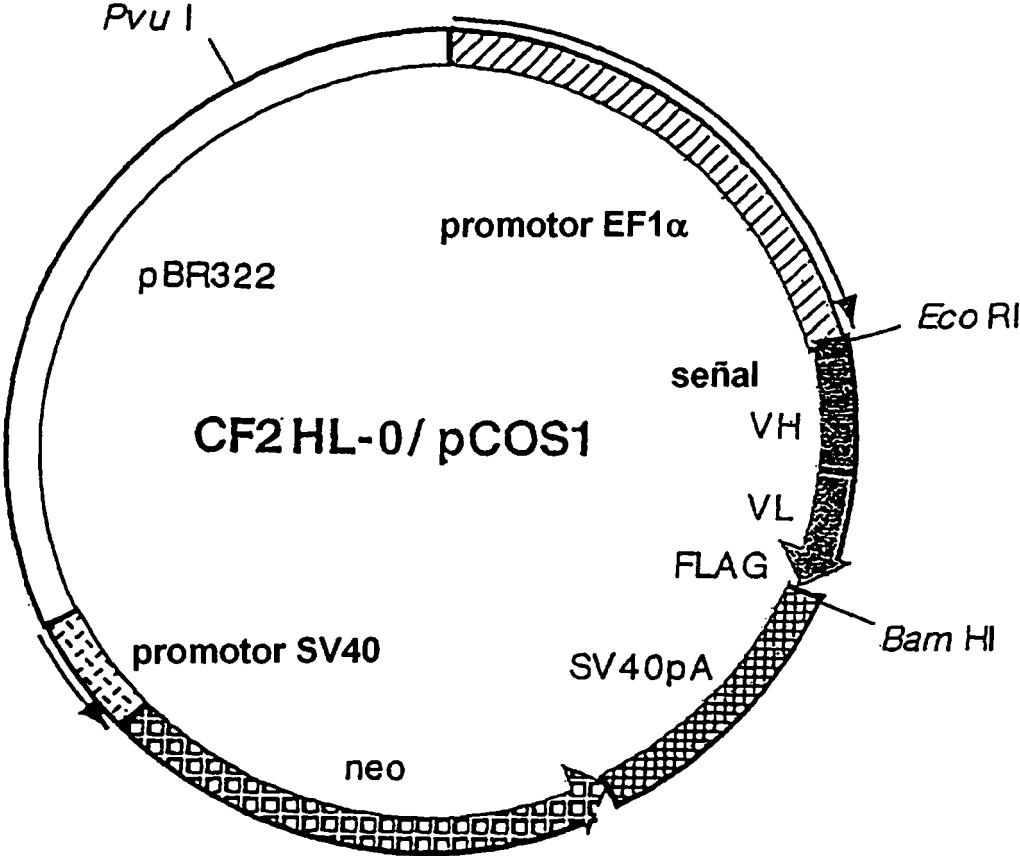


Fig. 36

Secuencia de bases y secuencia de aminoácidos del conector para el tipo HL

Cadena pesada	—	Cadena ligera	—	FLAG
... gtc tcg agt	conector	gac gtc gtg ...		
V S S		D V V		

Plásmido	Número de aminoácidos del conector	conector	
CF2HL-0/pCOS1	0	gtc tcg agt V S S	gac gtc gtg D V V
CF2HL-3/pCOS1	3	gtc tcg agt ggt ggt tcc V S S G G S	gac gtc gtg D V V
CF2HL-4/pCOS1	4	gtc tcg agt ggt ggt ggt tcc V S S G G G S	gac gtc gtg D V V
CF2HL-5/pCOS1	5	gtc tcg agt ggt ggt ggt ggt tcc V S S G G G G S	gac gtc gtg D V V
CF2HL-6/pCOS1	6	gtc tcg agt gt ggt ggt ggt ggt tcc V S S G G G G G S	gac gtc gtg D V V
CF2HL-7/pCOS1	7	gtc tcg agt ggt ggt ggt ggt ggt tcc V S S G G G G G G S	gac gtc gtg D V V

Fig. 37

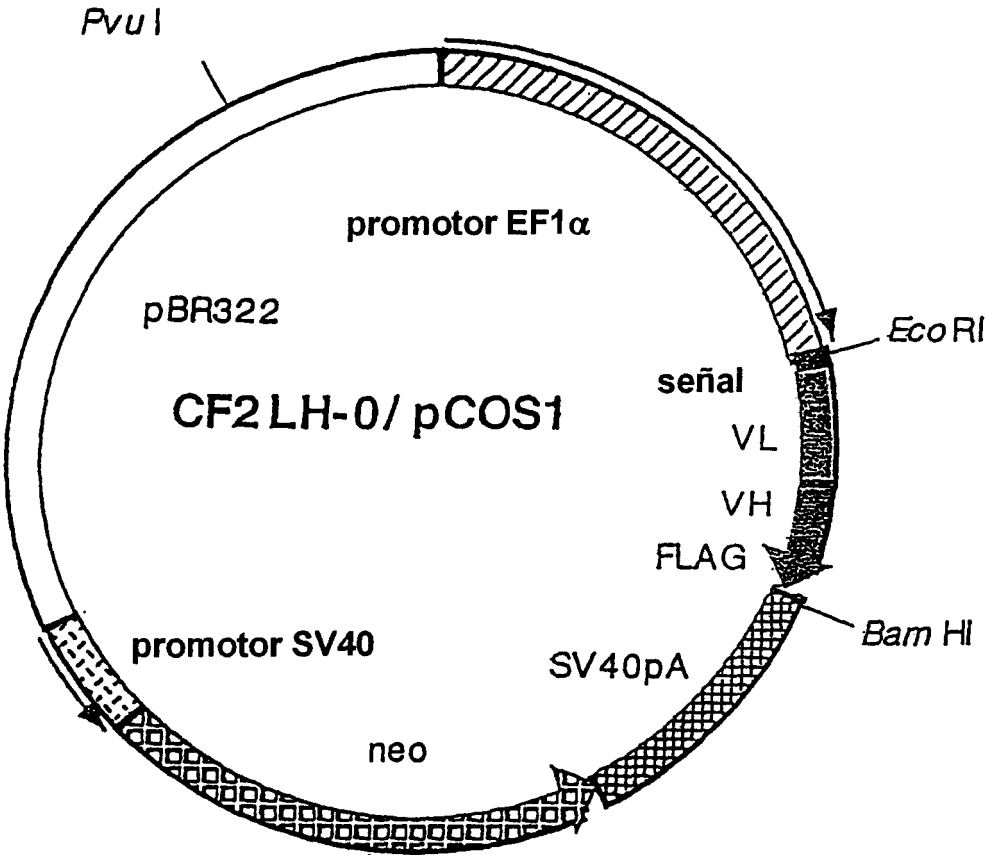
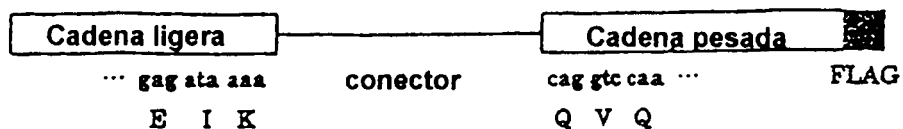


Fig. 38

Secuencia de bases y secuencia de aminoácidos del conector para el tipo LH



Plásmido	Número de aminoácidos del conector	conector
CF2LH-0/pCOS1	0	gag ata aaa E I K cag gtc caa Q V Q
CF2LH-3/pCOS1	3	gag ata aaa tcc gga ggc E I K S G G cag gtc caa Q V Q
CF2LH-4/pCOS1	4	gag ata aaa tcc gga ggt ggc E I K S G G G cag gtc caa Q V Q
CF2LH-5/pCOS1	5	gag ata aaa tcc gga ggt ggt ggc E I K S G G G G cag gtc caa Q V Q
CF2LH-6/pCOS1	6	gag ata aaa tcc gga ggt ggt ggt ggc E I K S G G G G G cag gtc caa Q V Q
CF2LH-7/pCOS1	7	gag ata aaa tcc gga ggt ggt ggt ggt ggc E I K S G G G G G G cag gtc caa Q V Q

Fig. 39

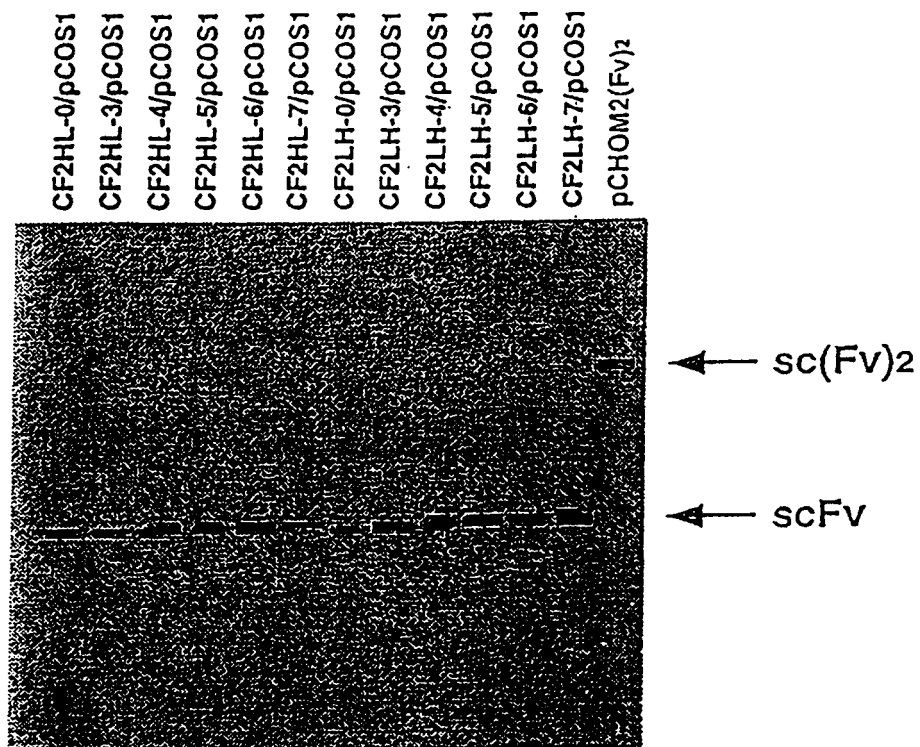


Fig. 40a

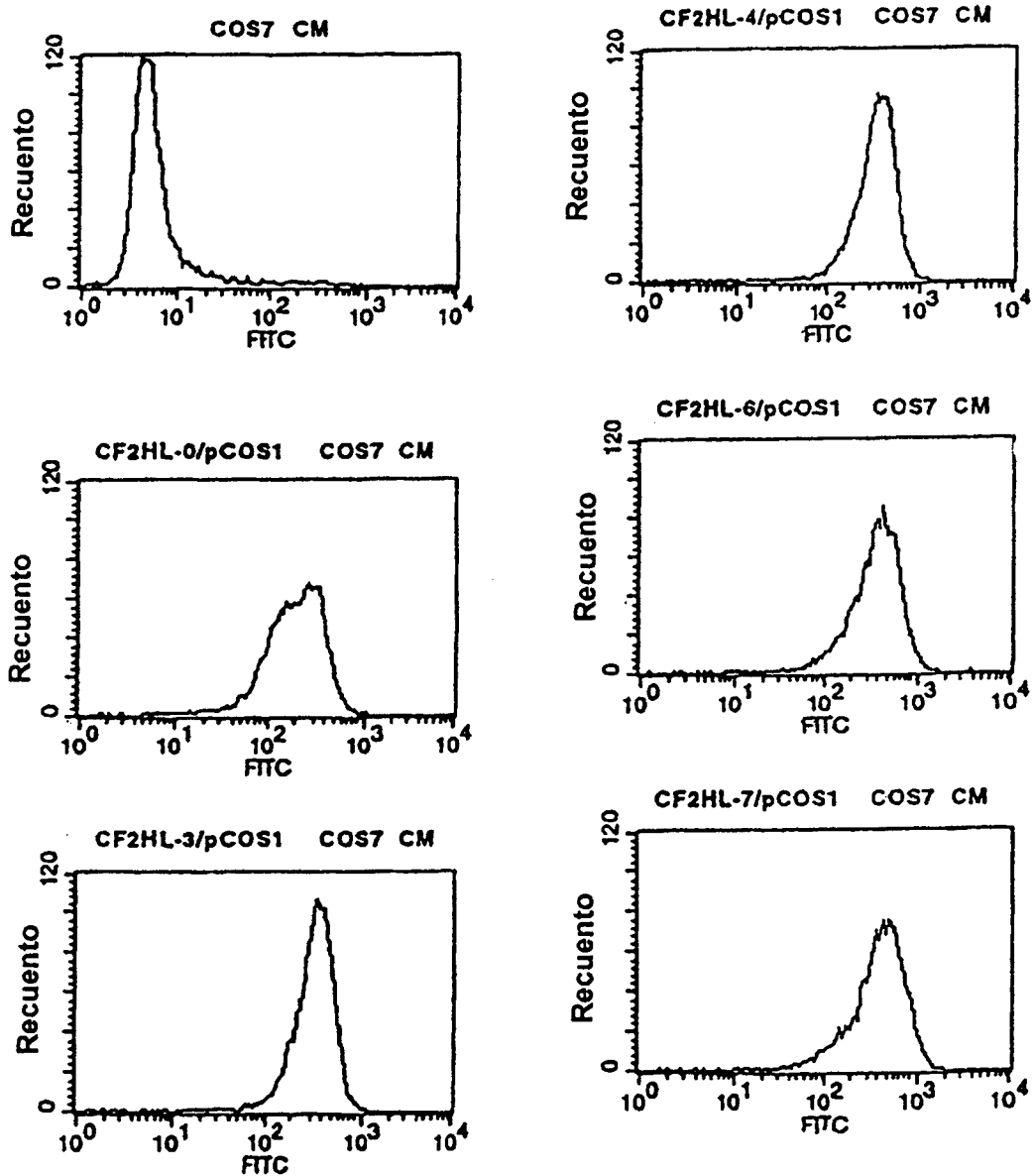


Fig. 40b

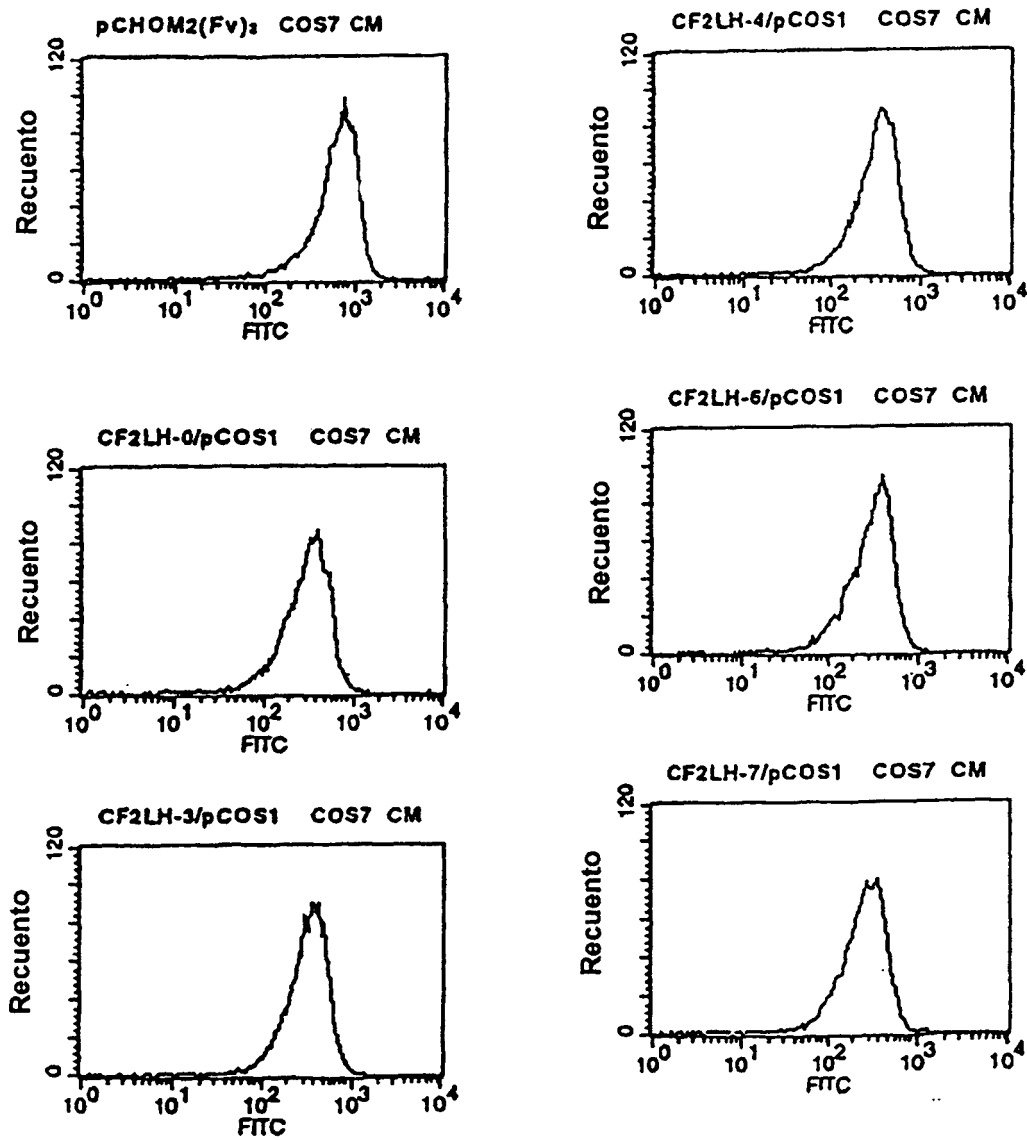




Fig. 41a

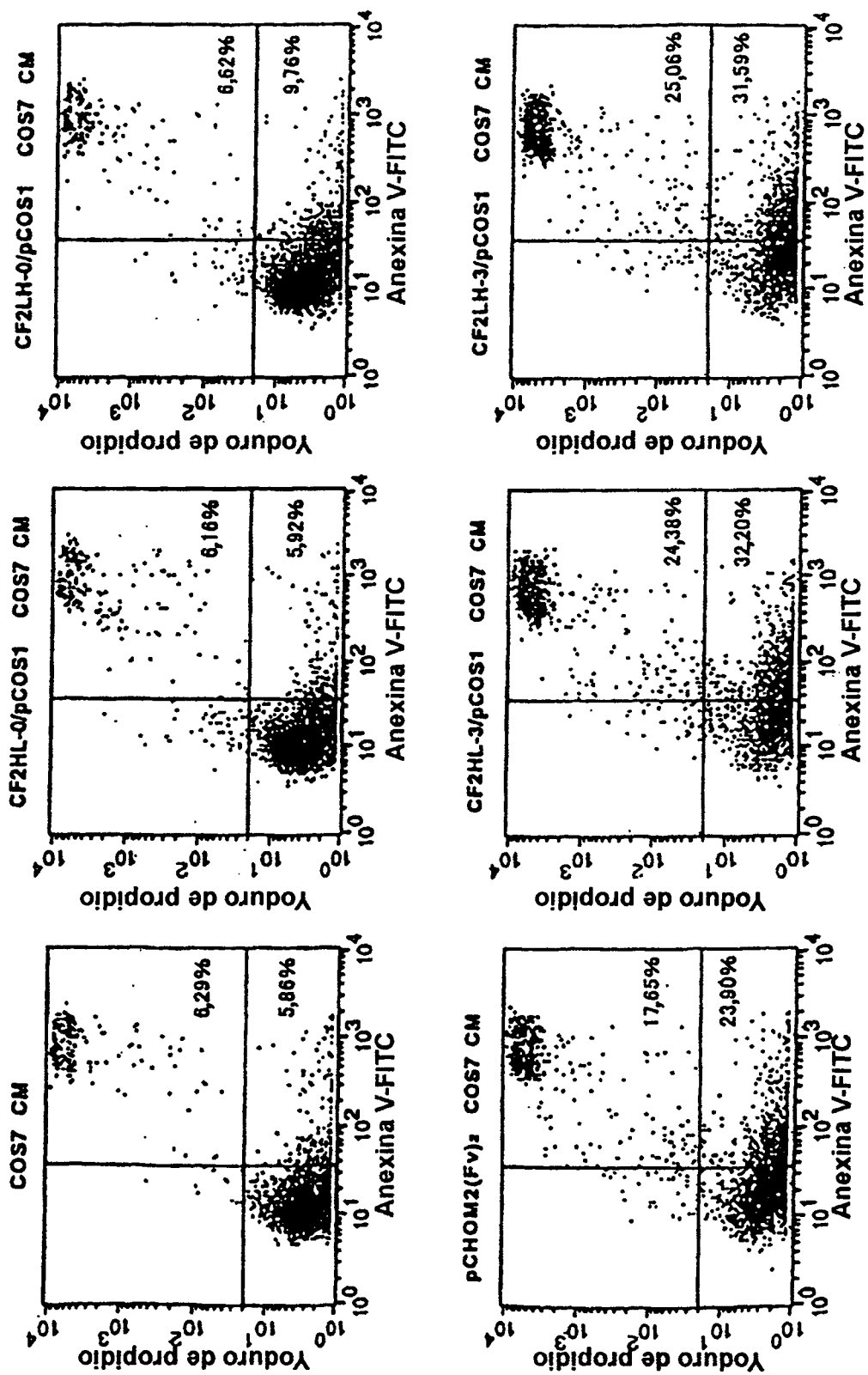


Fig. 41b

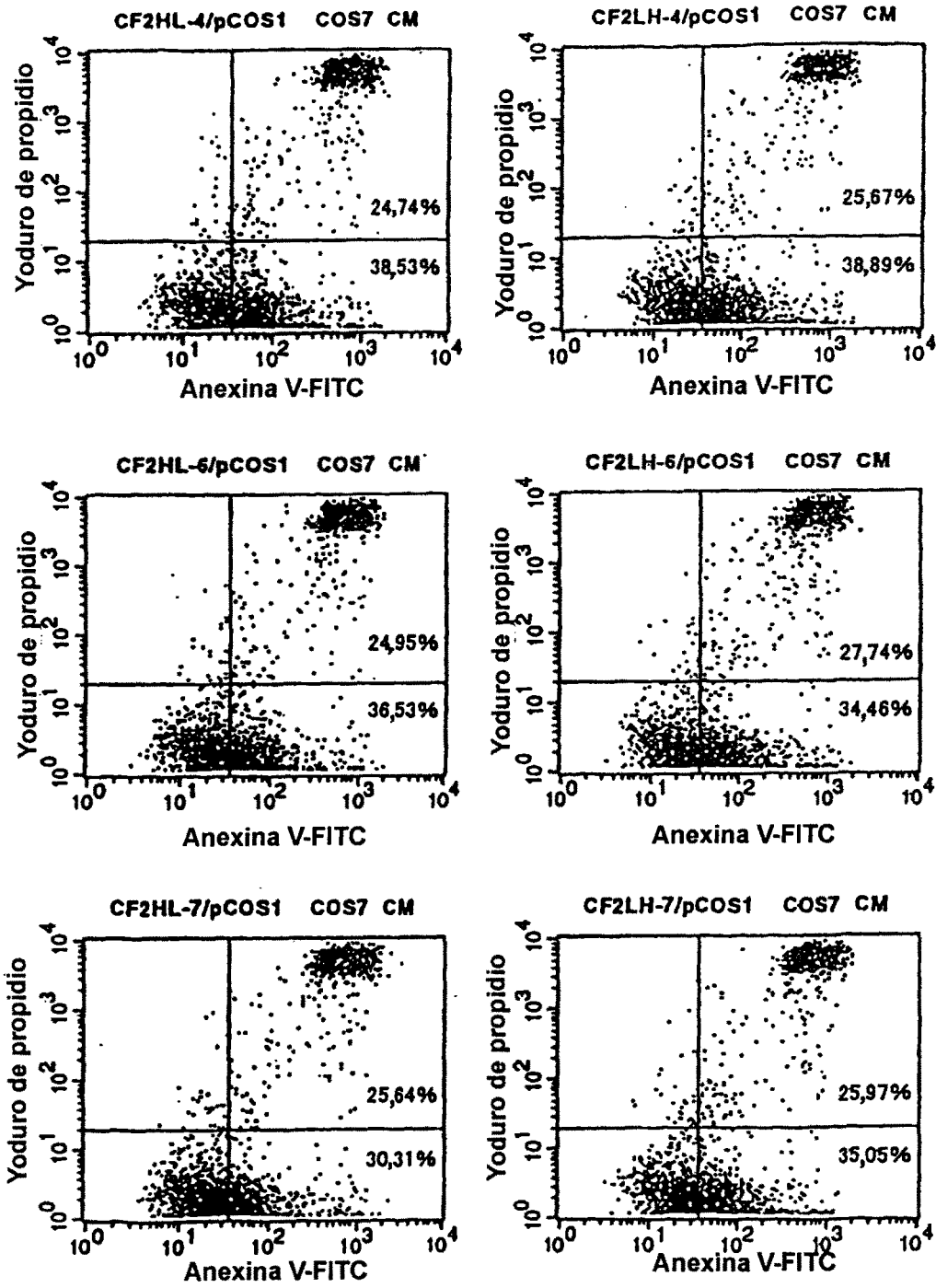


Fig. 42

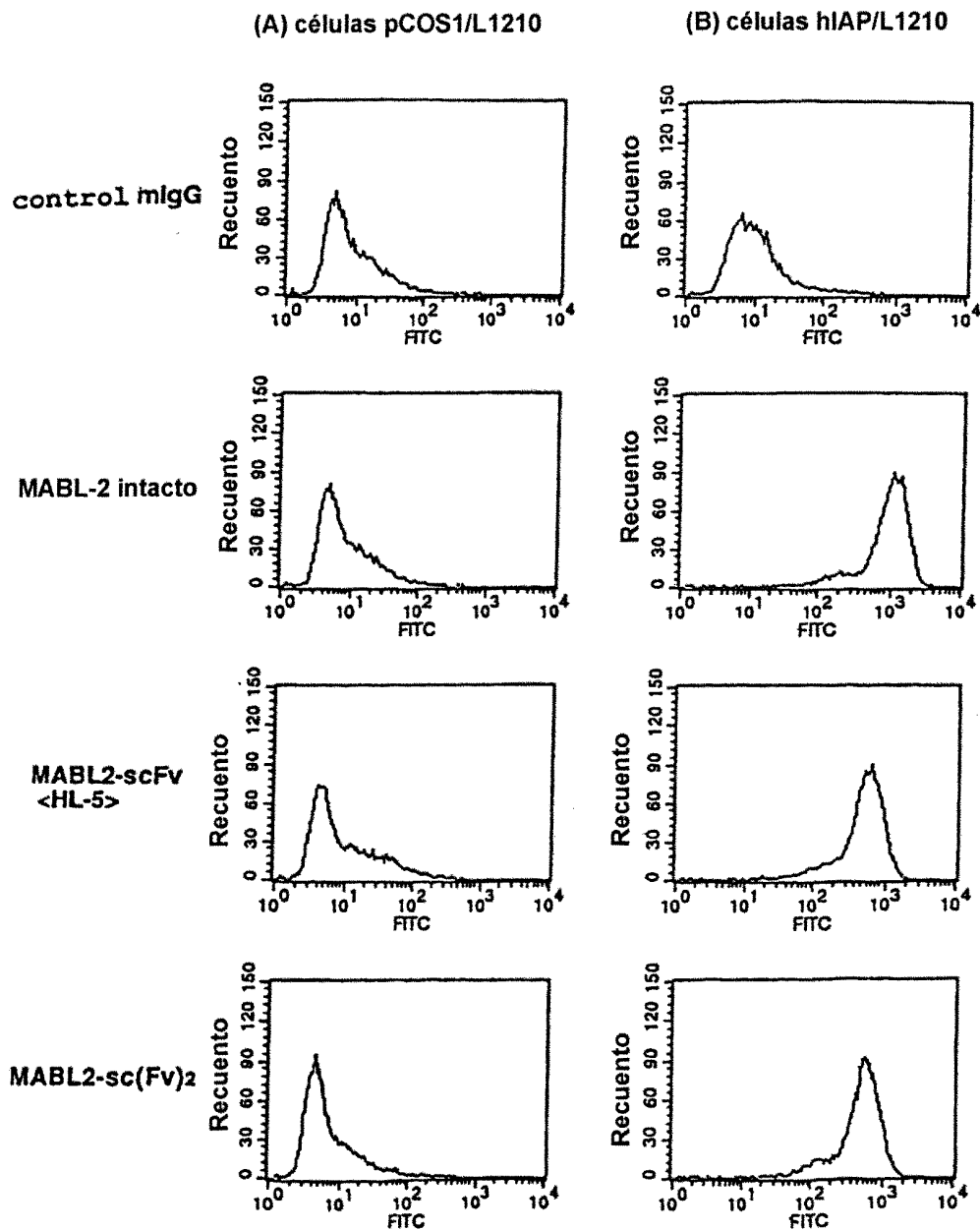


Fig. 43

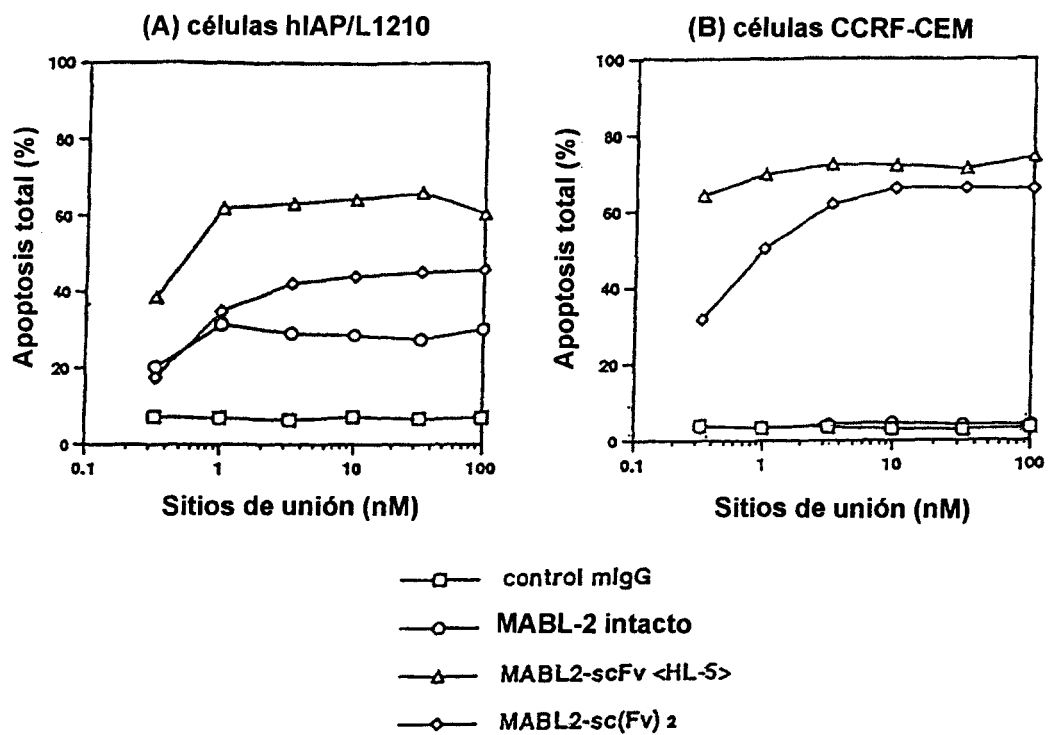


Fig. 44

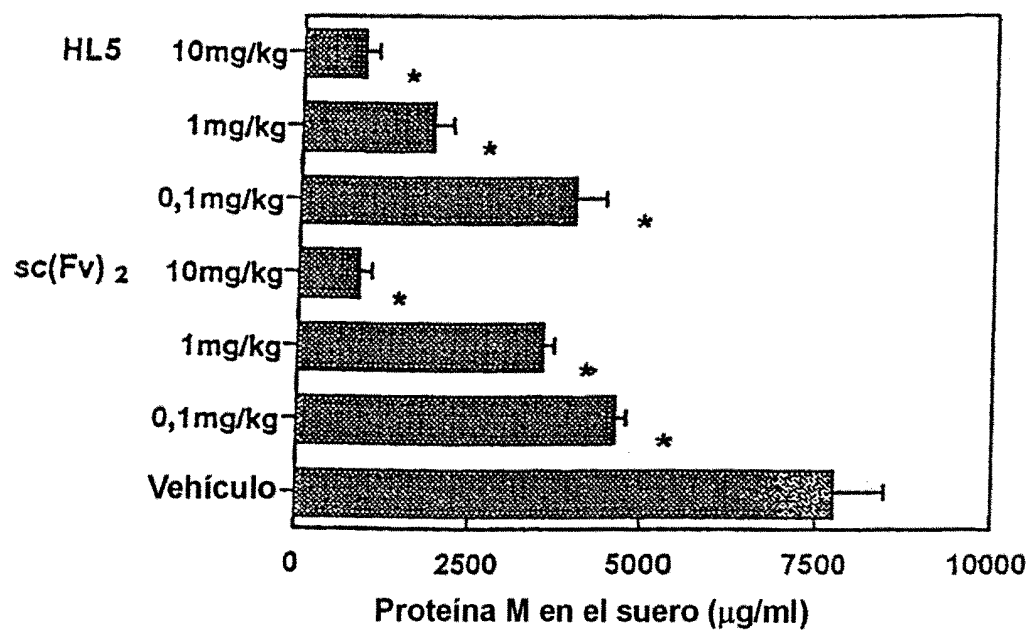


Fig. 45

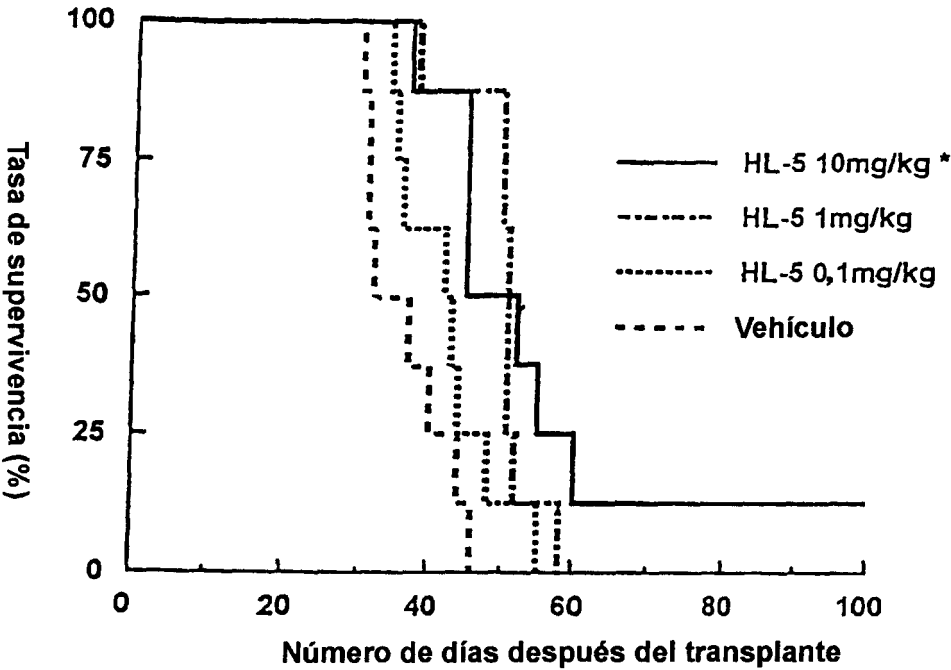


Fig. 46

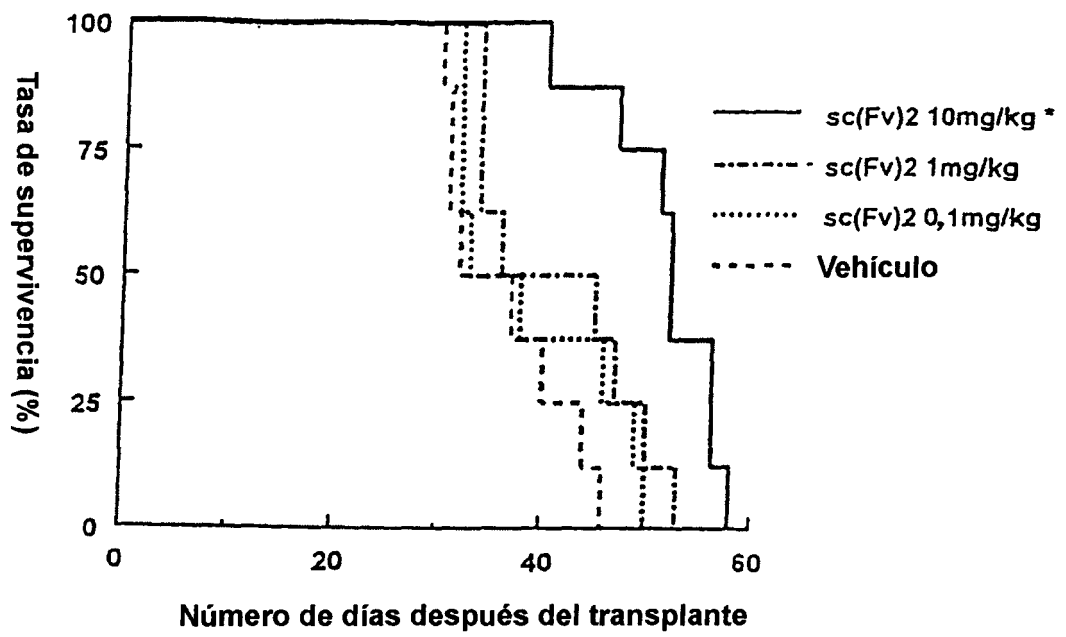


Fig. 47

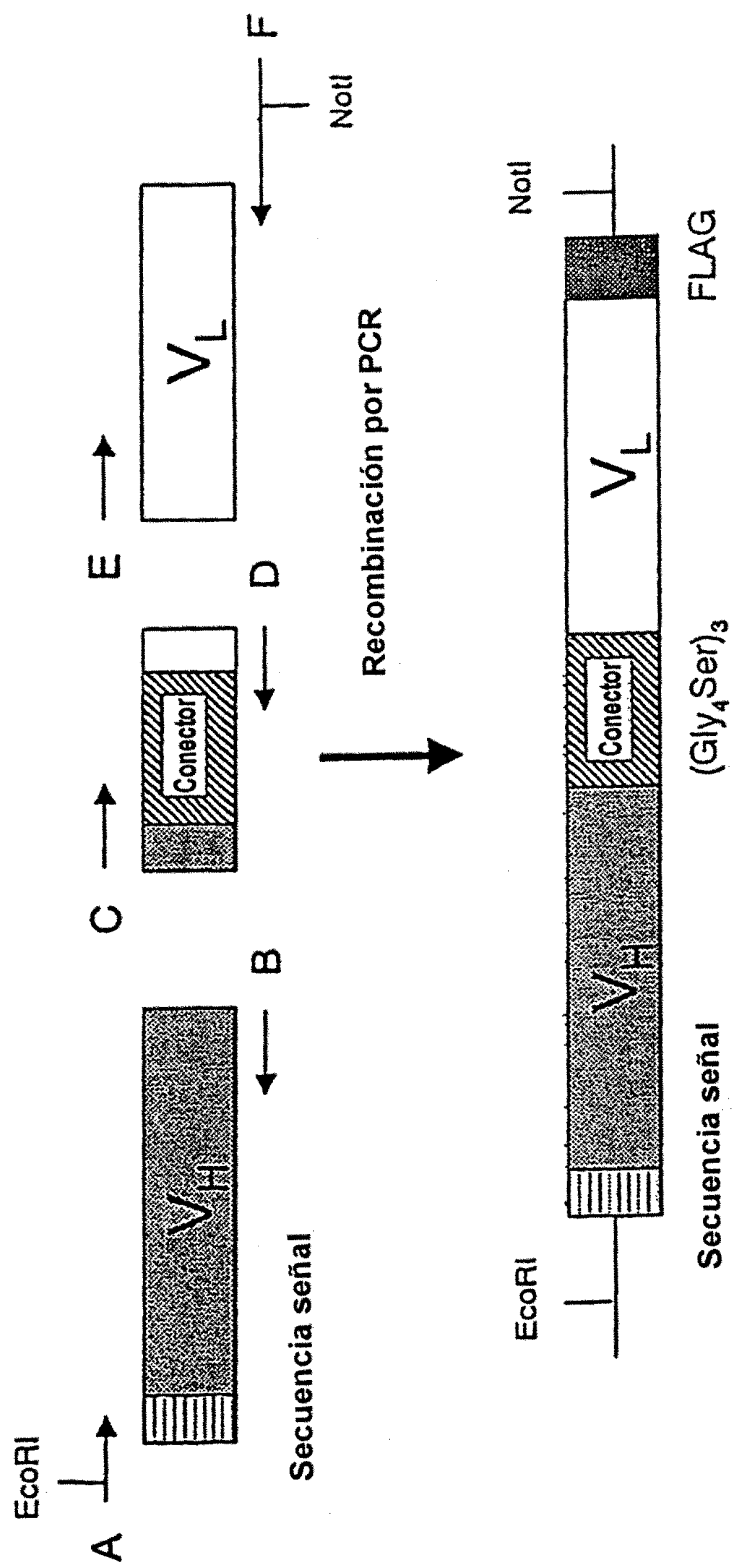




Fig. 48

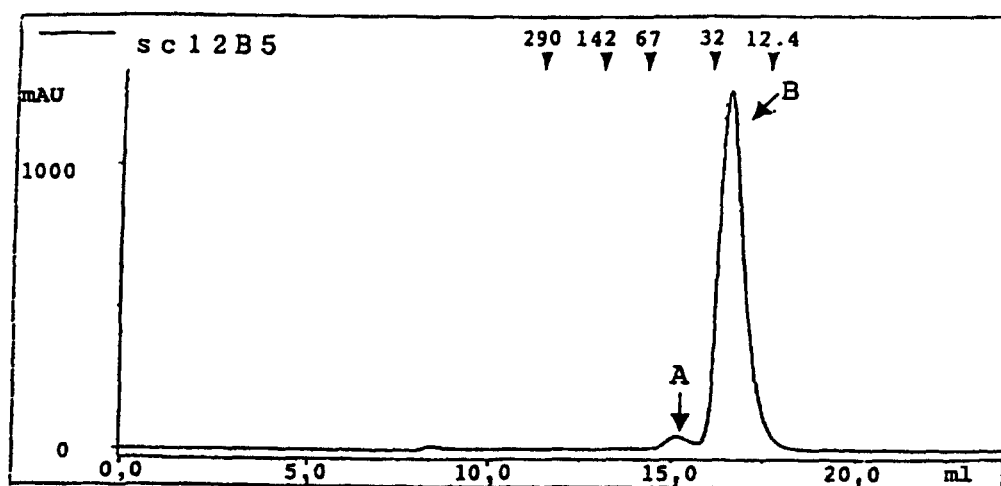
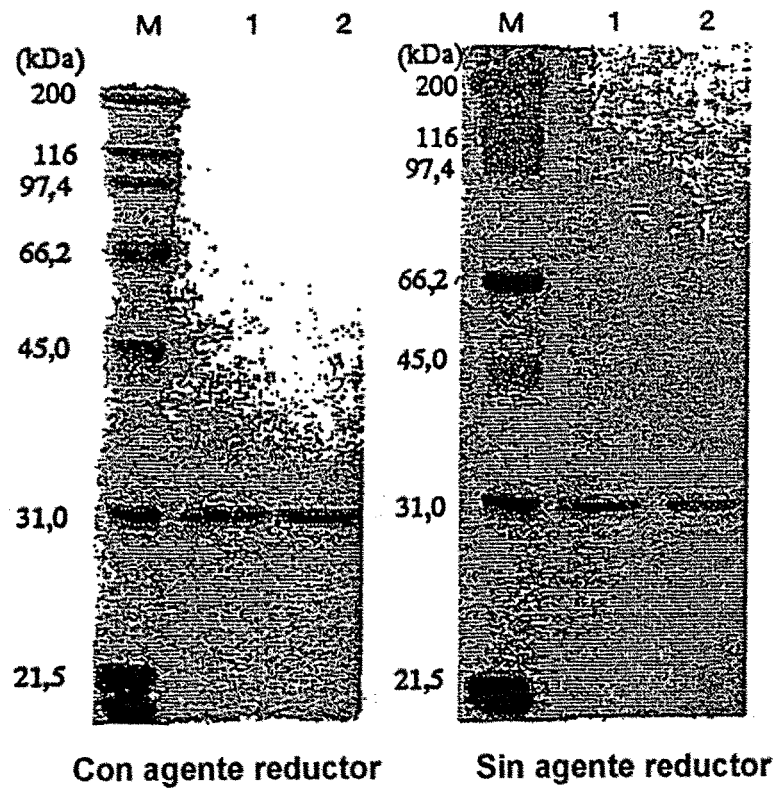


Fig. 49



M: marcador de PM  
1: fracción A de sc12B5  
2: fracción B de sc12B5

Fig. 50

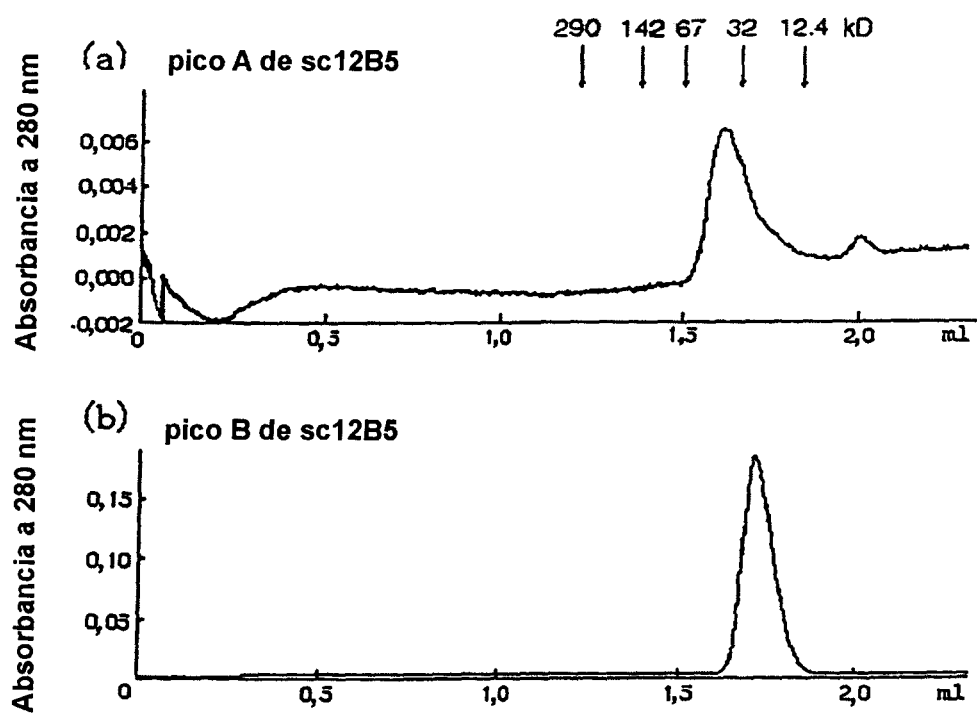


Fig. 51

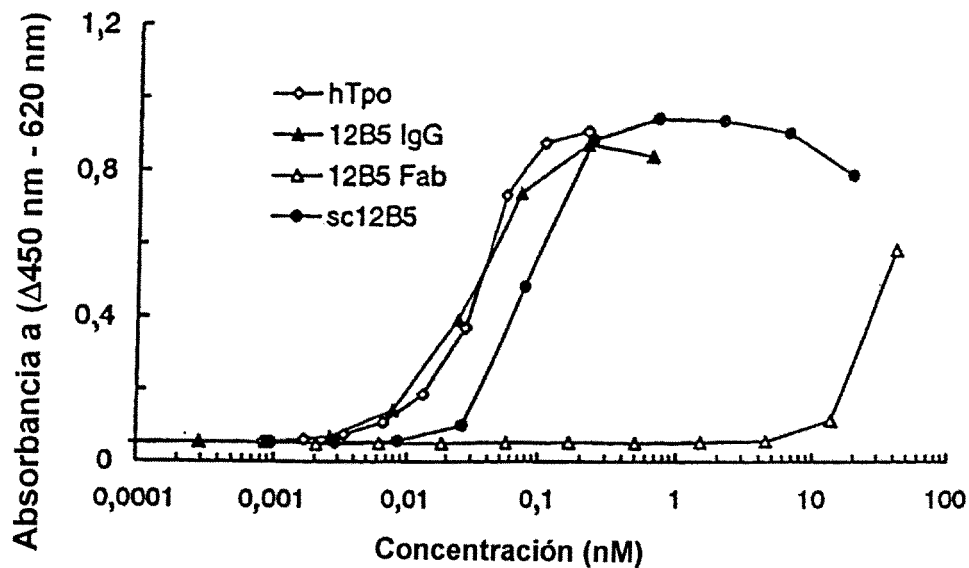


Fig. 52

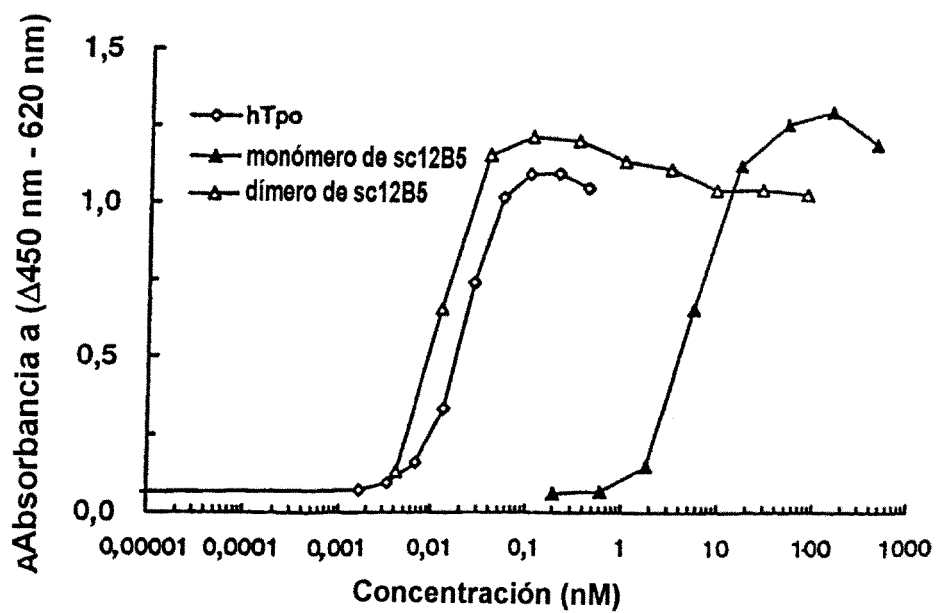


Fig. 53

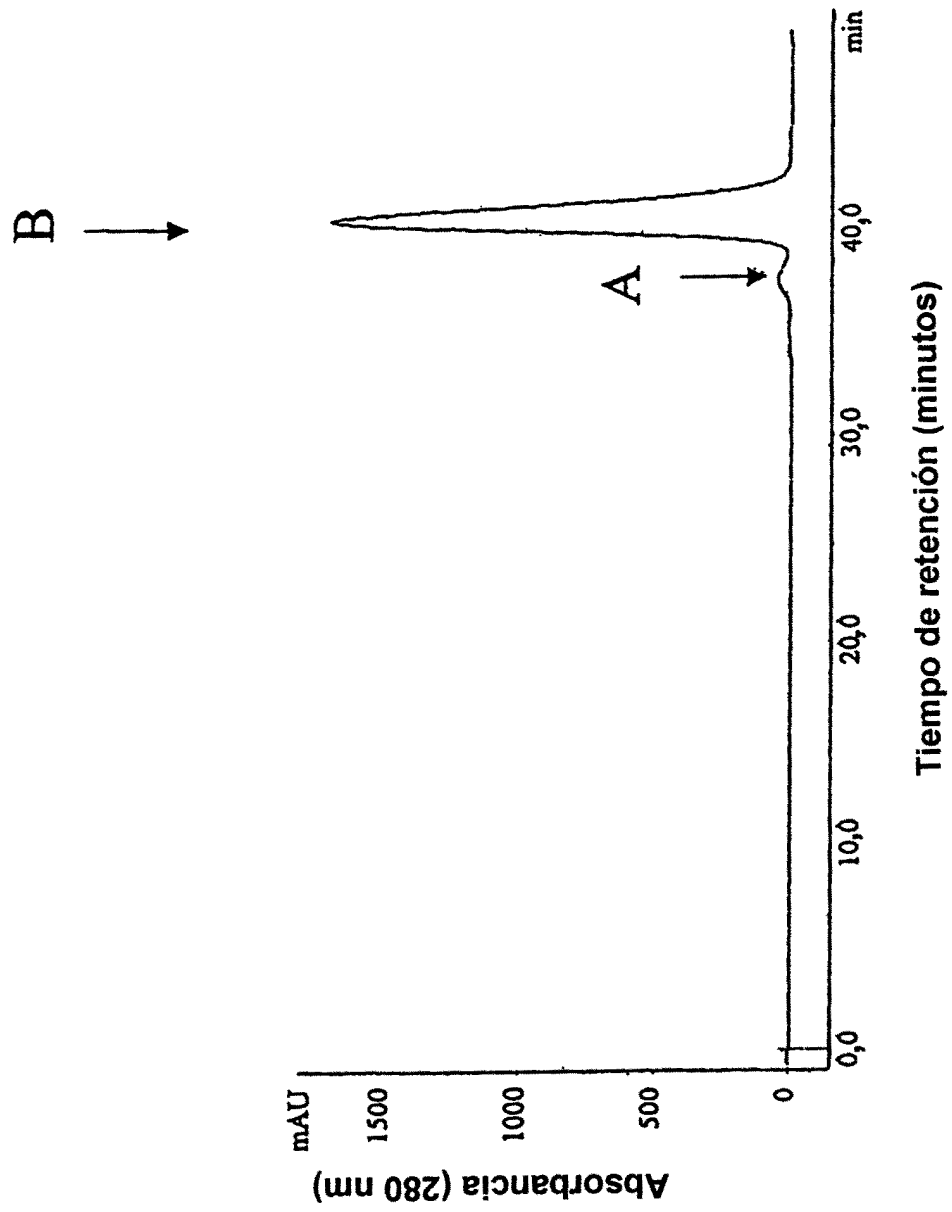


Fig. 54

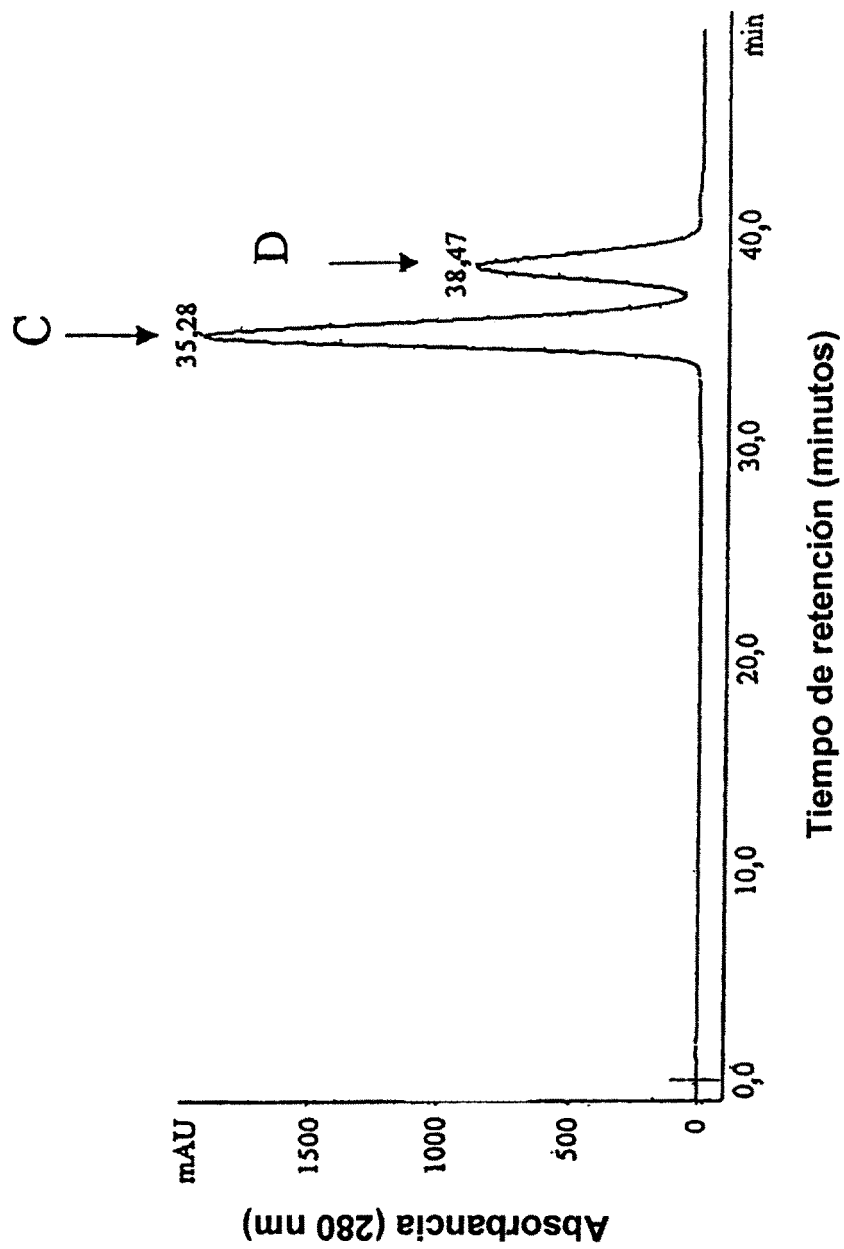


Fig. 5 5

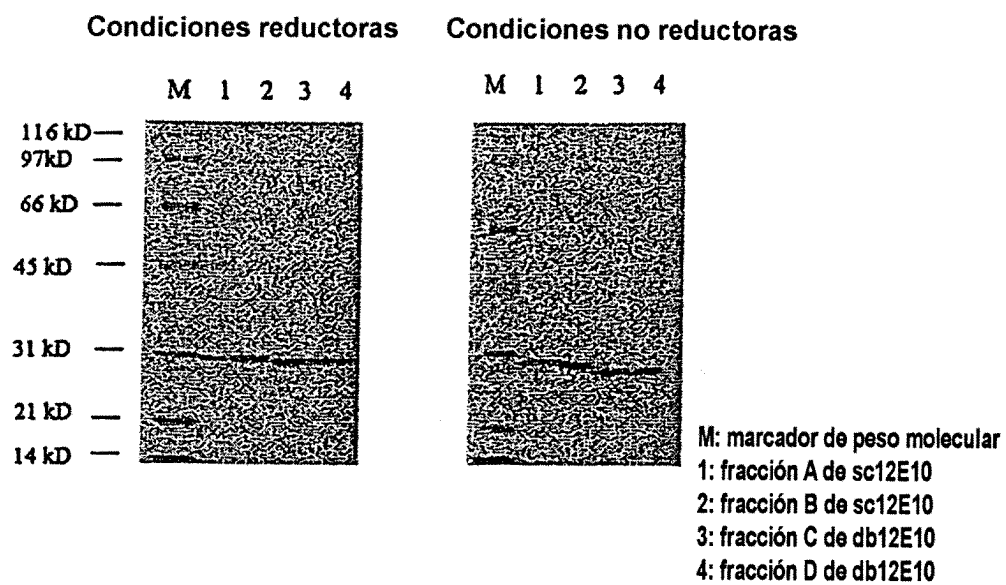
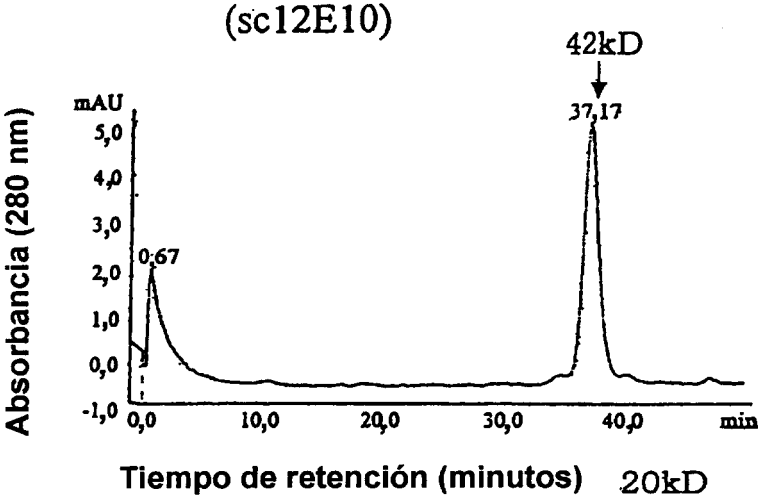


Fig. 56

pico A de sc3



pico B de sc3

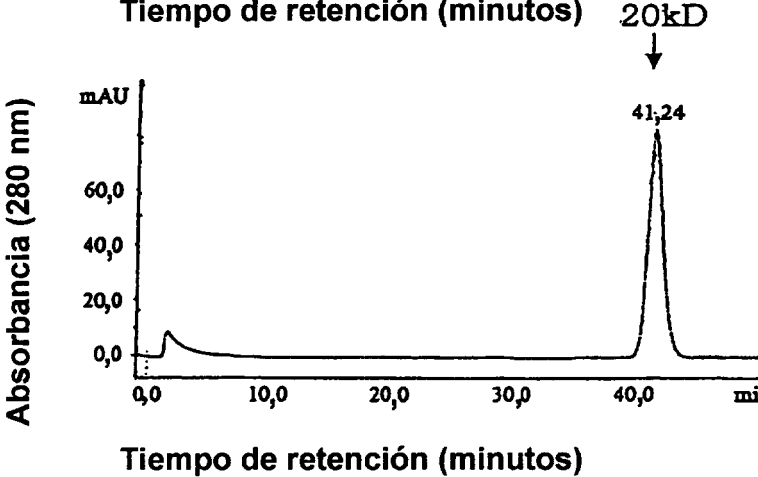




Fig. 57

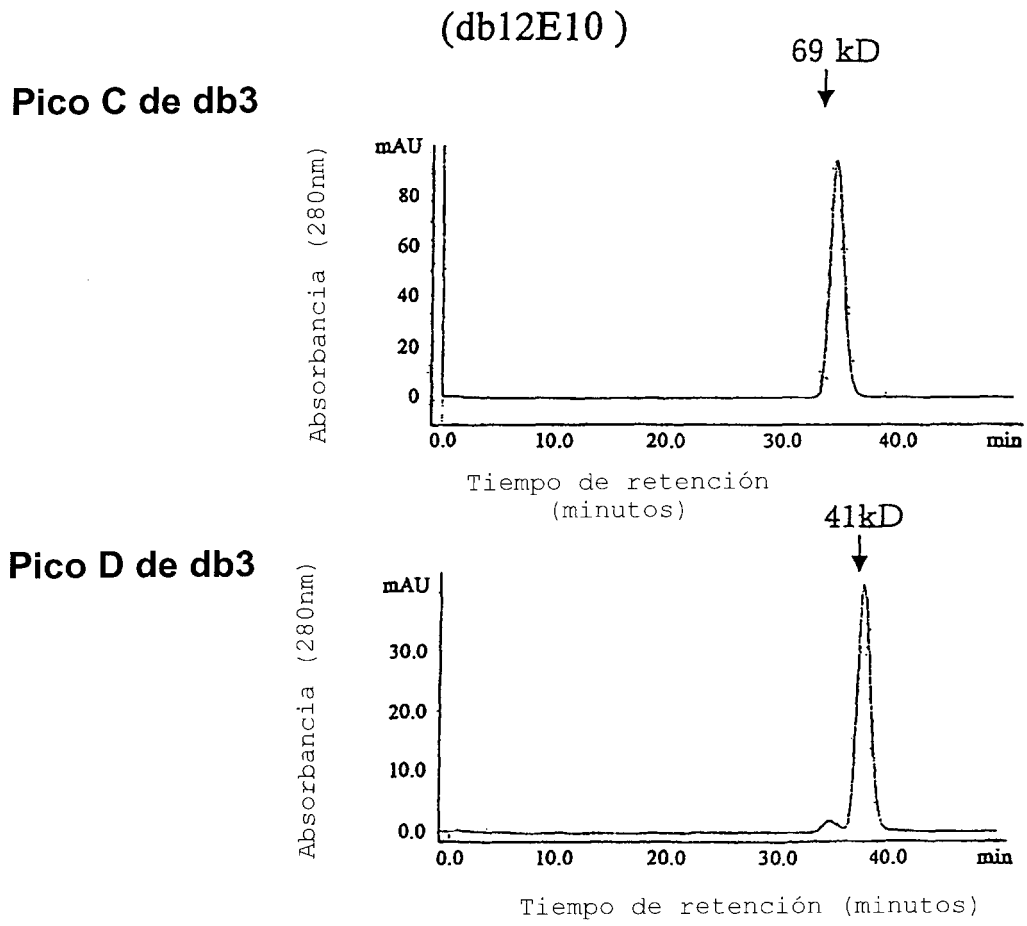


Fig. 5 8

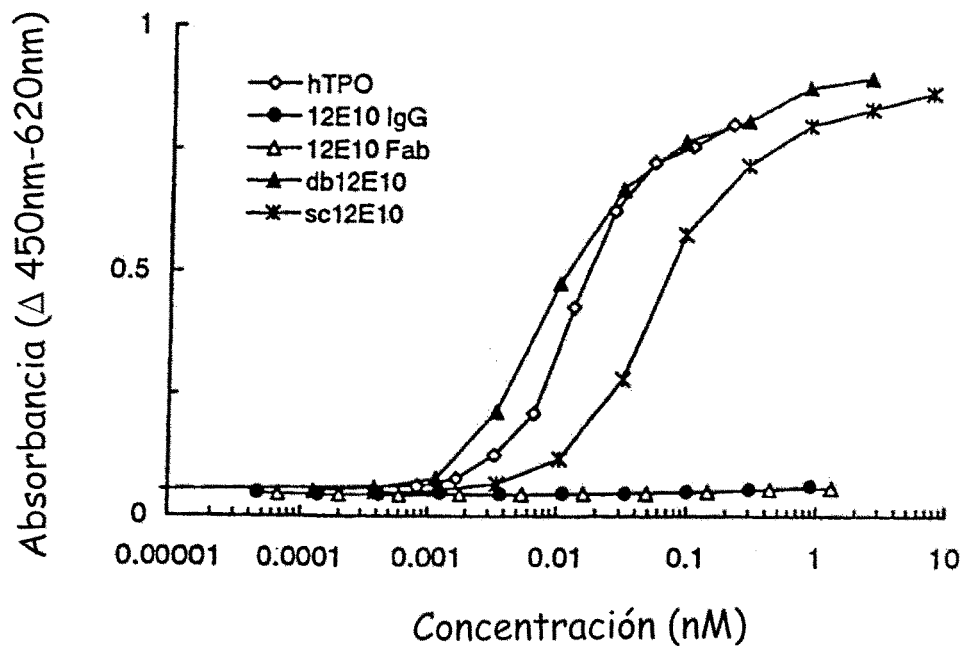
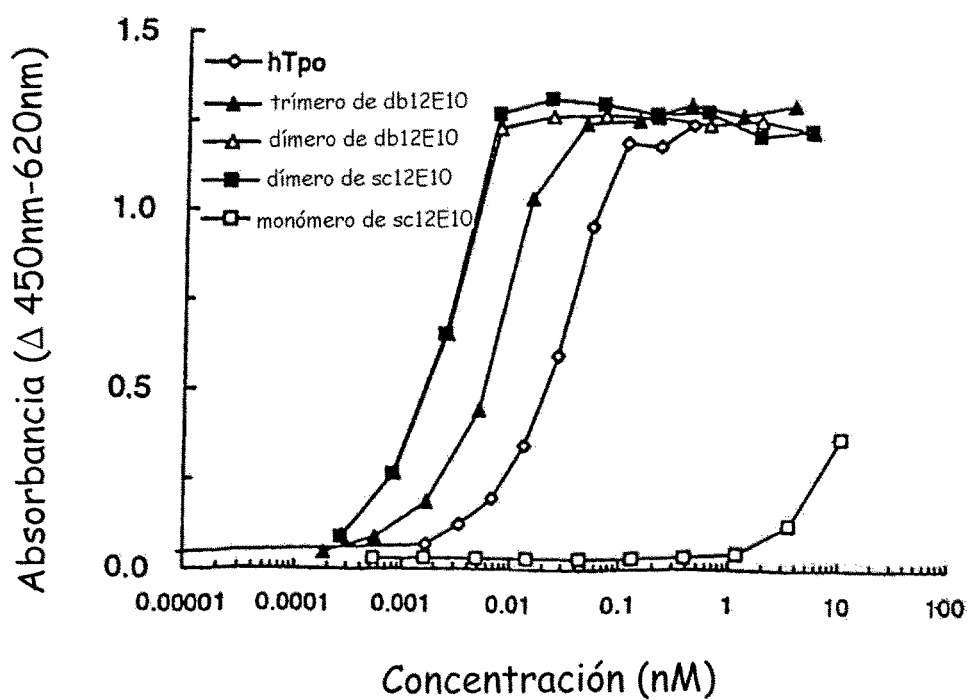


Fig. 5 9



# ES 2 304 235 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

- <110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA  
5 <120> Anticuerpo agonista de TPO degradado  
<130> FP1033  
<141> 22-10-2001  
<150> JP2000-321821  
10 <151> 20-10-2000  
<150> PCT/JP01/03288  
<151> 17-04-2001  
15 <150> JP2001-277314  
<151> 12-09-2001  
<160> 113  
<210> 1  
20 <211> 27  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
25 <223> Cebador de PCR  
  
<400> 1  
30 **ccatcctaatacgcactactatagggc 27**  
  
<210> 2  
<211> 27  
35 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Cebador de PCR  
40  
  
<400> 2  
**ggatcccgggtggatggatggaagatg 27**  
45  
<210> 3  
<211> 28  
<212> ADN  
50 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Cebador de PCR  
55  
  
<400> 3  
**ggatcccggg ccagtggatagacagatg 28**  
60 <210> 4  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
65 <220>  
<223> Cebador de PCR

ES 2 304 235 T3

<400> 4

**ggatcccggg agtggataga ccgatg 26**

5 <210> 5

<211> 394

<212> ADN

10 <213> Mus

<220>

<221> CDS

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

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

<400> 5

20 **atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct gcg 48**  
**Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala**  
**1 5 10 15**

25 **tcc agc agt gat gtt gtg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc 96**  
**Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val**  
**20 25 30**

30 **agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag agc ctt 144**  
**Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu**  
**35 40 45**

35 **cta cac agt aaa gga aac acc tat tta caa tgg tac cta cag aag cca 192**  
**Leu His Ser Lys Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Tyr Leu Gln Lys Pro**  
**50 55 60**

40 **ggc cag tct cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct 240**  
**Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser**  
**65 70 75 80**

45 **ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca 288**  
**Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr**  
**85 90 95**

50 **ctc aag atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat ttc tgc 336**  
**Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys**  
**100 105 110**

55 **tct caa agt aca cat gtt ccg tac acg tcc gga ggg ggg acc aag ctg 384**  
**Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Ser Gly Gly Gly Thr Lys Leu**  
**115 120 125**

60 **gaa ata aaa c**  
**Glu Ile Lys**  
**130**

65 <210> 6

<211> 409

ES 2 304 235 T3

<212> ADN

<213> Mus

<220>

5 <221> CDS

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

<223> pGEM-M1H. 1-57; péptido señal, 58-409; péptido maduro

10 <400> 6

atg gaa tgg agc tgg ata ttt ctc ttc ctc ctg tca gga act gca ggt 48

15 Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly

1 5 10 15

gtc cac tcc cag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gac ctg gta aag 96

20 Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys

20 25 30

cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc 144

25 Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

35 40 45

ggt aac cat gtt atg cac tgg gtg aag cag aag cca ggg cag ggc ctt 192

30 Val Asn His Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu

50 55 60

gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat ggt act aag tac aat 240

35 Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn

65 70 75 80

gag aag ttc aag ggc aag gcc aca ctg act tca gag aaa tcc tcc agc 288

40 Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Glu Lys Ser Ser Ser

85 90 95

gca gcc tac atg gag ctc agc agc ctg gcc tct gag gac tct gcg gtc 336

45 Ala Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val

100 105 110

tac tac tgt gca aga ggg ggt tac tat agt tac gac gac tgg ggc caa 384

50 Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Ser Tyr Asp Asp Trp Gly Gln

115 120 125

ggc acc act ctc aca gtc tcc tca g 409

55

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

ES 2 304 235 T3

<210> 7  
 <211> 394  
 <212> ADN  
 5 <213> Mus  
 <220>  
 <221> CDS  
 10 <222> (1)...(393)  
 <223> pGEM-M2L. 1-57; péptido señal, 58-394; péptido maduro

<400> 7

15     **atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct ggt**     **48**  
**Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Gly**  
       **1                  5                  10                  15**

20     **tcc agc agt gat gtt gtg atg acc caa agt cca ctc tcc ctg cct gtc**     **96**  
**Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val**  
                  **20                  25                  30**

25     **agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tca agt cag agc ctt**     **144**  
**Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu**  
                  **35                  40                  45**

30     **gtg cac agt aat gga aag acc tat tta cat tgg tac ctg cag aag cca**     **192**  
**Val His Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro**  
                  **50                  55                  60**

35     **ggc cag tct cca aaa ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct**     **240**  
**Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser**  
                  **65                  70                  75                  80**

40     **ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca gtg aca gat ttc aca**     **288**  
**Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Val Thr Asp Phe Thr**  
                  **85                  90                  95**

45     **ctc atg atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat ttc tgc**     **336**  
**Leu Met Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys**  
                  **100                  105                  110**

50     **tct caa agt aca cat gtt ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg**     **384**  
**Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu**  
                  **115                  120                  125**

55     **gaa ata aaa c**     **394**  
**Glu Ile Lys**  
                  **130**

ES 2 304 235 T3

<210> 8  
 <211> 409  
 <212> ADN  
 5 <213> Mus  
 <220>  
 <221> CDS  
 10 <222> (1)...(408)  
 <223> pGEM-M2H. 1-57; péptido señal, 58-409; péptido maduro  
 <400> 8

15        **atg gaa tgg agc tgg ata ttt ctc ttc ctc ctg tca gga act gca ggt    48**  
**Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly**

20            1                    5                    10                    15  
**gtc cac tcc cag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gaa ctg gta aag    96**  
**Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys**

25                    20                    25                    30  
**cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc    144**  
**Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe**

30                    35                    40                    45  
**gct aac cat gtt att cac tgg gtg aag cag aag cca ggg cag ggc ctt    192**  
**Ala Asn His Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu**

35                    50                    55                    60  
**gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat ggt act aag tat aat    240**  
**Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn**

40                    65                    70                    75                    80  
**gag aag ttc aag gac aag gcc act ctg act tca gac aaa tcc tcc acc    288**  
**Glu Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Thr**

45                                    85                                    90                                    95  
**aca gcc tac atg gac ctc agc agc ctg gcc tct gag gac tct ggc gtc    336**  
**Thr Ala Tyr Met Asp Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val**

50                                    100                                    105                                    110  
**tat tac tgt gca aga ggg ggt tac tat act tac gac gac tgg ggc caa    384**  
**Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Thr Tyr Asp Asp Trp Gly Gln**

55                                    115                                    120                                    125  
**ggc acc act ctc aca gtc tcc tca g                                    409**  
**Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser**

60                    130                    135

65

## ES 2 304 235 T3

<210> 9  
<211> 32  
<212> ADN  
5 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> cebador de PCR  
10 <400> 9  
**cccaagcttc caccatgaag ttgcctgtta gg 32**

15 <210> 10  
<211> 32  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
20 <220>  
<223> cebador de PCR  
25 <400> 10  
**cccaagcttc caccatggaa tggagctgga ta 32**

30 <210> 11  
<211> 34  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
35 <220>  
<223> cebador de PCR  
<400> 11  
40 **cgcgatcca ctcacgtttt atttccagct tggt 34**

45 <210> 12  
<211> 34  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
50 <223> cebador de PCR  
<400> 12  
55 **cgcgatcca ctcacctgag gagactgtga gagt 34**

60 <210> 13  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
65 <223> cebador de PCR



ES 2 304 235 T3

<400> 13

**catgccatgg cgcaggtcca gctgcagcag 30**

5

<210> 14

<211> 27

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador de PCR

15

<400> 14

**accaccacct gaggagactg tgagagt 27**

20

<210> 15

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> cebador de PCR

30

<400> 15

**gtctcctcag gtggtggtgg ttcgggt 27**

<210> 16

35

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

40

<223> cebador de PCR

<400> 16

45

**cacaacatcc gatccgccac cacccga 27**

<210> 17

<211> 27

50

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

55

<223> cebador de PCR

<400> 17

60

**ggcggatcgg atgttgtgat gacccaa 27**

<210> 18

<211> 57

65

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

# ES 2 304 235 T3

<223> cebador de PCR

<400> 18

5           **ccggaattct cattatttat cgtcacgctc ttgtagtct tttatttcca gcttggc 57**

<210> 19

<211> 45

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Secuencia de aminoácidos y secuencia de nucleótidos del conector

<400> 19

20           **ggc ggc ggc ggc tcg ggc ggc ggc ggc tcg ggc ggc ggc ggc tcg 45**

**Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser**

25                           **5                           10                           15**

<210> 20

<211> 828

30 <212> ADN

<213> Mus

<220>

35 <221> CDS

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

<223> pscM1. MABL1-scFv

40

45

50

55

60

65

ES 2 304 235 T3

<400> 20

```

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

```

ES 2 304 235 T3

5 ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggc gga tcg gat gtt gtg atg acc caa 480  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln  
 145 150 155 160  
 10 act cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct 528  
 Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser  
 165 170 175  
 15 tgc aga tct agt cag agc ctt cta cac agt aaa gga aac acc tat tta 576  
 Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Lys Gly Asn Thr Tyr Leu  
 180 185 190  
 20 caa tgg tac cta cag aag cca ggc cag tct cca aag ctc ctg atc tac 624  
 Gln Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
 25 195 200 205  
 30 aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt 672  
 Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser  
 210 215 220  
 35 gga tca ggg acà gat ttc aca ctc aag atc agc aga gtg gag gct gag 720  
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu  
 225 230 235 240  
 40 gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac acg 768  
 Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr  
 245 250 255  
 45 tcc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa gac tac aaa gac gat gac 816  
 Ser Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp  
 50 260 265 270  
 gat aaa taatga 828  
 55 Asp Lys

<210> 21

<211> 31

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador de PCR

ES 2 304 235 T3

<400> 21

**acgcgtcgac tcccaggtcc agctgcagca g 31**

5

<210> 22

<211> 18

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador de PCR

15

<400> 22

**gaaggtgtat ccagaagc 18**

20 <210> 23

<211> 819

<212> ADN

<213> Mus

25

<220>

<221> CDS

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

30

<223> pCHOM1. MABL1-scFv

<400> 23

35

**atg gga tgg agc tgt atc atc ctc ttc ttg gta gca aca gct aca ggt 48**

**Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly**

40

45

50

55

60

65

ES 2 304 235 T3

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

ES 2 304 235 T3

tcc ctg cct gtc agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct 528  
 Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser  
 5 165 170 175  
 agt cag agc ctt cta cac agt aaa gga aac acc tat tta caa tgg tac 576  
 Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Lys Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Tyr  
 10 180 185 190  
 cta cag aag cca ggc cag tct cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt tcc 624  
 Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser  
 15 195 200 205  
 aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg 672  
 Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly  
 20 210 215 220  
 aca gat ttc aca ctc aag atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga 720  
 Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly  
 25 225 230 235 240  
 gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac acg tcc gga ggg 768  
 Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Ser Gly Gly  
 30 245 250 255  
 ggg acc aag ctg gaa ata aaa gac tac aaa gac gat gac gat aaa taa 816  
 Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys  
 35 260 265 270  
 tga 819

50 <210> 24  
 <211> 828  
 <212> ADN  
 55 <213> Mus  
 <220>  
 <221> CDS  
 60 <222> (1)...(822)  
 <223> pscM2. MABL2-scFv

65

ES 2 304 235 T3

<400> 24

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



ES 2 304 235 T3

	tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc tca ggt ggt ggt ggt tcg	432
	Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser	
5	130 135 140	
	ggg ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggc gga tcg gat gtt gtg atg acc caa	480
10	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln	
	145 150 155 160	
	agt cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct	528
15	Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser	
	165 170 175	
20	tgc aga tca agt cag agc ctt gtg cac agt aat gga aag acc tat tta	576
	Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Lys Thr Tyr	
	180 185 190	
25	cat tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct cca aaa ctc ctg atc tac	624
	His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr	
	195 200 205	
30	aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt	672
	Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser	
35	210 215 220	
	gga tca gtg aca gat ttc aca ctc atg atc agc aga gtg gag gct gag	720
40	Gly Ser Val Thr Asp Phe Thr Leu Met Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu	
	225 230 235 240	
	gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac acg	768
45	Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr	
	245 250 255	
50	ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa gac tac aaa gac gat gac	816
	Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp	
	260 265 270	
55	gat aaa taatga	828

Asp Lys

60	<210> 25
	<211> 819
	<212> ADN
65	<213> Mus
	<220>
	<221> CDS

ES 2 304 235 T3

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

<223> pCHOM2. MABL2-scFv

5 <400> 25

**atg gga tgg agc tgt atc atc ctc ttc ttg gta gca aca gct aca ggt 48**  
**Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly**  
**1 5 10 15**  
**gtc gac tcc cag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gaa ctg gta aag 96**  
**Val Asp Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys**  
**20 25 30**  
**cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc 144**  
**Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe**  
**35 40 45**  
**gct aac cat gtt att cac tgg gtg aag cag aag cca ggg cag ggc ctt 192**  
**Ala Asn His Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu**  
**50 55 60**  
**gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat ggt act aag tat aat 240**  
**Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn**  
**65 70 75 80**  
**gag aag ttc aag gac aag gcc act ctg act tca gac aaa tcc tcc acc 288**  
**Glu Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Thr**

45

50

55

60

65

ES 2 304 235 T3

	85	90	95	
5	aca gcc tac atg gac ctc agc agc ctg gcc tct gag gac tct gcg gtc			336
	Thr Ala Tyr Met Asp Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val			
	100	105	110	
10	tat tac tgt gca aga ggg ggt tac tat act tac gac gac tgg ggc caa			384
	Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Thr Tyr Asp Asp Trp Gly Gln			
	115	120	125	
15	ggc acc act ctc aca gtc tcc tca ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggt			432
	Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly			
20	130	135	140	
	ggt tcg ggt ggt ggc gga tcg gat gtt gtg atg acc caa agt cca ctc			480
	Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu			
25	145	150	155	160
	tcc ctg cct gtc agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tca			528
	Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser			
	165	170	175	
35	agt cag agc ctt gtg cac agt aat gga aag acc tat tta cat tgg tac			576
	Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu His Trp Tyr			
	180	185	190	
40	ctg cag aag cca ggc cag tct cca aaa ctc ctg atc tac aaa gtt tcc			624
	Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser			
	195	200	205	
45	aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca gtg			672
	Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Val			
50	210	215	220	
	aca gat ttc aca ctc atg atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga			720
	Thr Asp Phe Thr Leu Met Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly			
55	225	230	235	240

60

65

ES 2 304 235 T3

```

5      gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac acg ttc gga ggg 768
      Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly
          245                250                255

10     ggg acc aag ctg gaa ata aaa gac tac aaa gac gat gac gat aaa taa 816
      Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
          260                265                270

15     tga                                                    819

```

- <210> 26
- <211> 456
- 20 <212> ADN
- <213> Mus
- <220>
- 25 <221> CDS
- <222> (1)...(450)
- <223> pCHO-shIAP. IAP humana soluble
- 30 <400> 26

```

35     atg tgg ccc ctg gta gcg gcg ctg ttg ctg ggc tcg gcg tgc tgc gga 48
      Met Trp Pro Leu Val Ala Ala Leu Leu Leu Gly Ser Ala Cys Cys Gly
          1                5                10                15

40     tca gct cag cta cta ttt aat aaa aca aaa tct gta gaa ttc acg ttt 96
      Ser Ala Gln Leu Leu Phe Asn Lys Thr Lys Ser Val Glu Phe Thr Phe
          20                25                30

45     tgt aat gac act gtc gtc att cca tgc ttt gtt act aat atg gag gca 144
      Cys Asn Asp Thr Val Val Ile Pro Cys Phe Val Thr Asn Met Glu Ala
          35                40                45

50     caa aac act act gaa gta tac gta aag tgg aaa ttt aaa gga aga gat 192
      Gln Asn Thr Thr Glu Val Tyr Val Lys Trp Lys Phe Lys Gly Arg Asp

```

60  
65

# ES 2 304 235 T3

```
                    50                55                60
att tac acc ttt gat gga gct cta aac aag tcc act gtc ccc act gac 240
5  Ile Tyr Thr Phe Asp Gly Ala Leu Asn Lys Ser Thr Val Pro Thr Asp
    65                70                75                80
10 ttt agt agt gca aaa att gaa gtc tca caa tta cta aaa gga gat gcc 288
    Phe Ser Ser Ala Lys Ile Glu Val Ser Gln Leu Leu Lys Gly Asp Ala
                                85                90                95
15 tct ttg aag atg gat aag agt gat gct gtc tca cac aca gga aac tac 336
    Ser Leu Lys Met Asp Lys Ser Asp Ala Val Ser His Thr Gly Asn Tyr
                                100                105                110
20 act tgt gaa gta aca gaa tta acc aga gaa ggt gaa acg atc atc gag 384
    Thr Cys Glu Val Thr Glu Leu Thr Arg Glu Gly Glu Thr Ile Ile Glu
                                115                120                125
25 cta aaa tat cgt gtt gtt tca tgg ttt tct cca aat gaa aat gac tac 432
    Leu Lys Tyr Arg Val Val Ser Trp Phe Ser Pro Asn Glu Asn Asp Tyr
                                130                135                140
30 aag gac gac gat gac aag tgatag 456
    Lys Asp Asp Asp Asp Lys
00 145                150
```

<210> 27

<211> 46

45 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> cebador de PCR

<400> 27

**ggaattccat atgcaagtgc aacttcaaca gtctggacct gaactg 46**

55

<210> 28

<211> 31

60 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador de PCR

65

ES 2 304 235 T3

<400> 28

**ggaattctca ttattttatt tccagcttgg t 31**

5

<210> 29

<211> 741

<212> ADN

10 <213> Mus

<220>

<221> CDS

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

15 <223> pscM2DEm01. MABL2-scFv

<400> 29

20

**atg caa gtg caa ctt caa cag tct gga cct gaa ctg gta aag cct ggg 48**

**Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly**

25

**1 5 10 15**

**gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc gct aac 96**

**Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ala Asn**

30

**20 25 30**

**cat gtt att cac tgg gtg aag cag aag cca ggg cag ggc ctt gag tgg 144**

35

**His Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp**

**35 40 45**

40

45

50

55

60

65

ES 2 304 235 T3

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

ES 2 304 235 T3

**Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Val Thr Asp**  
 195 200 205  
 5 **ttc aca ctc atg atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat 672**  
**Phe Thr Leu Met Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr**  
 10 210 215 220  
**ttc tgc tct caa agt aca cat gtt cgg tac acg ttc gga ggg ggg acc 720**  
**Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr**  
 15 225 230 235 240  
**aag ctg gaa ata aaa taatga 741**  
 20 **Lys Leu Glu Ile Lys**  
 245

25 <210> 30  
 <211> 18  
 30 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador de PCR  
 35 <400> 30

**cagacagtgg ttcaaagt 18**

40 <210> 31  
 <211> 72  
 <212> ADN  
 45 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador de PCR  
 50 <400> 31

**cgcgctcgacc gatccgccac caccggaacc accaccacc gaaccaccac cacctttat 60**

55 **ttccagcttg gt 72**

<210> 32  
 <211> 1605  
 60 <212> ADN  
 <213> Mus  
 <220>  
 <221> CDS  
 65 <222> (1)...(1599)  
 <223> pCHOM2(Fv)2. MABL2-sc(Fv)2



ES 2 304 235 T3

<400> 32

5           atg gga tgg agc tgt atc atc ctc ttc ttg gta gca aca gct aca ggt   48  
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly  
           1                   5                   10                   15

10          gtc gac tcc cag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gaa ctg gta aag   96  
 Val Asp Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys

15                   20                   25                   30

          cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc   144  
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

20                   35                   40                   45

          gct aac cat gtt att cac tgg gtg aag cag aag cca ggg cag ggc ctt   192  
 Ala Asn His Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu

25                   50                   55                   60

          gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat ggt act aag tat aat   240  
 Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn

30                   65                   70                   75                   80

35          gag aag ttc aag gac aag gcc act ctg act tca gac aaa tcc tcc acc   288

40

45

50

55

60

65

ES 2 304 235 T3

	Glu Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Thr			
	85	90	95	
5	aca gcc tac atg gac ctc agc agc ctg gcc tct gag gac tct gcg gtc		336	
	Thr Ala Tyr Met Asp Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val			
10	100	105	110	
	tat tac tgt gca aga ggg ggt tac tat act tac gac gac tgg ggc caa		384	
	Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Thr Tyr Asp Asp Trp Gly Gln			
15	115	120	125	
	ggc acc act ctc aca gtc tcc tca ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggt		432	
20	Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly			
	130	135	140	
25	ggc tcg ggt ggt ggc gga tcg gat gtt gtg atg acc caa agt cca ctc		480	
	Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu			
30	145	150	155	160
	tcc ctg cct gtc agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tca		528	
	Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser			
35	165	170	175	
	agt cag agc ctt gtg cac agt aat gga aag acc tat tta cat tgg tac		576	
	Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu His Trp Tyr			
40	180	185	190	
	ctg cag aag cca ggc cag tct cca aaa ctc ctg atc tac aaa gtt tcc		624	
45	Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser			
	195	200	205	
50	aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca gtg		672	
	Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Val			
55	210	215	220	
	aca gat ttc aca ctc atg atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga		720	
	Thr Asp Phe Thr Leu Met Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly			

ES 2 304 235 T3

	225		230		235		240	
5	gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt cgg tac acg ttc gga ggg							768
	Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly							
			245		250		255	
10	ggg acc aag ctg gaa ata aaa ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggt ggt							816
	Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly							
			260		265		270	
15	tcg ggt ggt ggc gga tcg gtc gac tcc cag gtc cag ctg cag cag tct							864
	Ser Gly Gly Gly Gly Ser Val Asp Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser							
20			275		280		285	
	gga cct gaa ctg gta aag cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag							912
25	Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys							
			290		295		300	
	gct tct gga tac acc ttc gct aac cat gtt att cac tgg gtg aag cag							960
30	Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ala Asn His Val Ile His Trp Val Lys Gln							
			305		310		315	
	aag cca ggg cag ggc ctt gag tgg att gga tat att tat cct tac aat							1008
35	Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn							
			325		330		335	
40	gat ggt act aag tat aat gag aag ttc aag gac aag gcc act ctg act							1056
	Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr							
45			340		345		350	
	tca gac aaa tcc tcc acc aca gcc tac atg gac ctc agc agc ctg gcc							1104
	Ser Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr Met Asp Leu Ser Ser Leu Ala							
50			355		360		365	
	tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt gca aga ggg ggt tac tat act							1152
55	Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Thr							
			370		375		380	

60

65

ES 2 304 235 T3

5            tac gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc tca ggt ggt 1200  
             Tyr Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly  
             385                            390                            395                            400  
 10            ggt ggt tcg ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggc gga tcg gat gtt gtg 1248  
             Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val  
    405                            410                            415  
 15            atg acc caa agt cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga gat caa gcc 1296  
             Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala  
    420                            425                            430  
 20            tcc atc tct tgc aga tca agt cag agc ctt gtg cac agt aat gga aag 1344  
             Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Lys  
    435                            440                            445  
 25            acc tat tta cat tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct cca aaa ctc 1392  
             Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu  
    450                            455                            460  
 30            ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc 1440  
             Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe  
             465                            470                            475                            480  
 35            agt ggc agt gga tca gtg aca gat ttc aca ctc atg atc agc aga gtg 1488  
             Ser Gly Ser Gly Ser Val Thr Asp Phe Thr Leu Met Ile Ser Arg Val  
    485                            490                            495  
 40            gag gct gag gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt 1536  
             Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val  
    500                            505                            510  
 45            ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa gac tac aaa 1584  
             Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys  
    515                            520                            525  
 50            gac gat gac gat aaa taatga 1605  
 55  
 60            Asp Asp Asp Asp Lys  
             530

<210> 33

65 <211> 23

<212> ADN

## ES 2 304 235 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador de PCR

5

<400> 33

**tgaggaattc ccaccatggg atg 33**

10

<210> 34

<211> 40

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador de PCR

20 <400> 34

**cacgacgtca ctcgagactg tgagagtggg gccttgccc 40**

25 <210> 35

<211> 40

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> cebador de PCR

35 <400> 35

**agtctcgagt gacgtcgtga tgacccaaag tccactctcc 40**

<210> 36

40 <211> 31

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

45

<220>

<223> cebador de PCR

<400> 36

50 **gactggatcc tcattattta tcgtcatcgt c 31**

<210> 37

<211> 22

55

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

60 <223> cebador de PCR

<400> 37

**cgcgtaatac gactcactat ag 22**

65

<210> 38

<211> 46

ES 2 304 235 T3

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> cebador de PCR

<400> 38

10 **gcaattggac ctgttttata tcgagcttgg tccccctcc gaact 46**

<210> 39

<211> 45

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> cebador de PCR

<400> 39

25 **gctcgagata aaacaggtcc aattgcagca gtctggacct gaact 45**

<210> 40

<211> 60

30 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador de PCR

35 <400> 40

**gactggatcc tcattattta tcgtcatcgt cttttagtc tgaggagact gtgagagtgg 60**

40 <210> 41

<211> 32

<212> ADN

45 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador de PCR

50 <400> 41

**gactgaattc ccaccatgaa gttgcctgtt ag 32**

55 <210> 42

<211> 40

<212> ADN

60 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador de PCR

65

ES 2 304 235 T3

<400> 42

**cagtctcgag tggtggtcc gacgtcgtga tgacccaag 40**

5

<210> 43

<211> 43

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador de PCR

15

<400> 43

**cagtctcgag tggtggtggt tccgacgtcg tgatgacca aag 43**

20

<210> 44

<211> 46

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> cebador de PCR

30

<400> 44

**cagtctcgag tggtggtggt ggttccgacg tcgtgatgac ccaaag 46**

35

<210> 45

<211> 49

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> cebador de PCR

<400> 45

45

**cagtctcgag tggtggtggt ggtggtccg acgtcgtgat gacccaag 49**

<210> 46

50

<211> 52

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

55

<223> cebador de PCR

<400> 46

60

**cagtctcgag tggtggtggt ggtggtggtt ccgacgtcgt gatgacccaa ag 52**

<210> 47

<211> 20

65

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 304 235 T3

<223> cebador de PCR

<400> 47

5 **ggccgcatgt tgtcacgaat 20**

<210> 48

<211> 780

10 <212> ADN

<213> Mus

<220>

15 <221> CDS

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

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

20 <400> 48

**atg gga tgg agc tgt atc atc ctc ttc ttg gta gca aca gct aca ggt gtc 51**

**MET Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly Val**

25

**5**

**10**

**15**

**gac tcc cag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gaa ctg gta aag cct ggg 102**

**Asp Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly**

30

**20**

**25**

**30**

**gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc gct aac cat 153**

**Ala Ser Val Lys MET Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ala Asn His**

35

**35**

**40**

**45**

**50**

**gtt att cac tgg gtg aag cag aag cca ggg cag ggc ctt gag tgg att gga 204**

**Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly**

40

**55**

**60**

**65**

**tat att tat cct tac aat gat ggt act aag tat aat gag aag ttc aag gac 255**

**Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Asp**

45

50

**70**

**75**

**80**

**85**

**aag gcc act ctg act tca gac aaa tcc tcc acc aca gcc tac atg gac ctc 306**

**Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr MET Asp Leu**

55

**90**

**95**

**100**

**agc agc ctg gcc tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt gca aga ggg ggt 357**

**Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly**

60

**105**

**110**

**115**

65



ES 2 304 235 T3

5            tac tat act tac gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcg agt 408  
           Tyr Tyr Thr Tyr Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
           120                            125                            130                            135  
 10            gac gtc gtg atg acc caa agt cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga gat 459  
           Asp Val Val MET Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp  
                                   140                            145                            150  
 15            caa gcc tcc atc tct tgc aga tca agt cag agc ctt gtg cac agt aat gga 510  
           Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly  
                                   155                            160                            165                            170  
 20            aag acc tat tta cat tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct cca aaa ctc 561  
           Lys Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu  
                                   175                            180                            185  
 25            ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt 612  
           Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser  
                                   190                            195                            200  
 30            ggc agt gga tca gtg aca gat ttc aca ctc atg atc agc aga gtg gag gct 663  
           Gly Ser Gly Ser Val Thr Asp Phe Thr Leu MET Ile Ser Arg Val Glu Ala  
                                   205                            210                            215                            220  
 35            gag gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac acg 714  
           Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr  
                                   225                            230                            235  
 40            ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa gac tac aaa gac gat gac gat 765  
           Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp  
                                   240                            245                            250                            255  
 45            aaa taa tga gga tcc 780  
 50            Lys  
 55

<210> 49

<211> 45

60 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador de PCR

65

ES 2 304 235 T3

<400> 49

**caagctcgag ataaaatccg gaggccaggt ccaattgcag cagtc 45**

5 <210> 50

<211> 48

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador de PCR

15 <400> 50

**caagctcgag ataaaatccg gaggtggcca ggtccaattg cagcagtc 48**

20 <210> 51

<211> 51

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> cebador de PCR

30 <400> 51

**caagctcgag ataaaatccg gaggtggtgg ccaggtccaa ttgcagcagt c 51**

<210> 52

35 <211> 54

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> cebador de PCR

<400> 52

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

<210> 53

50 <211> 57

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

55 <223> cebador de PCR

<400> 53

60 **caagctcgag ataaaatccg gaggtggtgg tggggccag gtccaattgc agcagtc 57**

<210> 54

<211> 780

65 <212> ADN

<213> Mus

<220>

ES 2 304 235 T3

<221> CDS

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

<223> CF2HL-0/pCOS1. MABL2-scFv <LH-0>

5

<400> 54

**atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct ggt tcc 51**  
**MET Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu MET Phe Trp Ile Pro Gly Ser**  
                                   **5                                  10                                  15**  
**agc agt gat gtt gtg atg acc caa agt cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt 102**  
**Ser Ser Asp Val Val MET Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu**  
                                   **20                                  25                                  30**  
**gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tca agt cag agc ctt gtg cac agt 153**  
**Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser**  
                                   **35                                  40                                  45                                  50**  
**aat gga aag acc tat tta cat tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct cca 204**  
**Asn Gly Lys Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro**  
                                   **55                                  60                                  65**  
**aaa ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg 255**  
**Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg**  
                                   **70                                  75                                  80                                  85**  
**ttc agt ggc agt gga tca gtg aca gat ttc aca ctc atg atc agc aga gtg 306**  
**Phe Ser Gly Ser Gly Ser Val Thr Asp Phe Thr Leu MET Ile Ser Arg Val**  
                                   **90                                  95                                  100**  
**gag gct gag gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg 357**  
**Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro**  
                                   **105                                  110                                  115**  
**tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctc gag ata aaa cag gtc caa ttg cag 408**  
**Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gln Val Gln Leu Gln**  
                                   **120                                  125                                  130                                  135**  
**cag tct gga cct gaa ctg gta aag cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc 459**  
**Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys MET Ser Cys**  
                                   **140                                  145                                  150**  
**aag gct tct gga tac acc ttc gct aac cat gtt att cac tgg gtg aag cag 510**  
**Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ala Asn His Val Ile His Trp Val Lys Gln**  
                                   **155                                  160                                  165                                  170**  
**aag cca ggg cag ggc ctt gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat 561**

ES 2 304 235 T3

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

35 <210> 55  
 <211> 351  
 <212> ADN  
 40 <213> Humano  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)...(351)  
 45 <223> 12B5HV. Péptido 1-351  
 <400> 55

50 cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gga ggc ttg gtc cgg ccc ggg ggg 48  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg Pro Gly Gly

55

60

65

ES 2 304 235 T3

	1	5	10	15	
5	tcc ctg agt ctc tcc tgt gca gtc tct gga atc acc ctc agg acc tac				96
	Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Thr Leu Arg Thr Tyr				
		20	25	30	
10	ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg				144
	Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val				
		35	40	45	
15	gca ggt ata tcc ttt gac gga aga agt gaa tac tat gca gac tcc gtg				192
	Ala Gly Ile Ser Phe Asp Gly Arg Ser Glu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val				
20		50	55	60	
	cag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac agt tcc aag aac acc ctg tat				240
25	Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ser Lys Asn Thr Leu Tyr				
		65	70	75	80
30	ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt				288
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys				
		85	90	95	
35	gcg aga gga gca cat tat ggt ttc gat atc tgg ggc caa ggg aca atg				336
	Ala Arg Gly Ala His Tyr Gly Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met				
40		100	105	110	
	gtc acc gtc tcg agt				351
45	Val Thr Val Ser Ser				
		115			

- 50 <210> 56
- <211> 57
- <212> ADN
- <213> Humano
- 55 <220>
- <221> CDS
- <222> (1)...(57)
- 60 <223> secuencia lectora

65

ES 2 304 235 T3

<400> 56

**atg gag ttt ggg ctg agc tgg gtt ttc ctc gtt gct ctt tta aga ggt 48**

5 **Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly**

5

10

15

10 **gtc cag tgt**

57

**Val Gln Cys**

<210> 57

15 <211> 115

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> 12B5VH-1

<400> 57

25 **atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag 60**

**gtgcagctgg tgcagtctgg gggaggcttg gtccggcccc gggggtccct gagtc 115**

30 <210> 58

<211> 115

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> 12B5VH-2

40 <400> 58

**aaggatatac ctgccacca ctccagcccc ttgcctggag cctggcggac ccagtgcag 60**

**ccgtaggtcc tgagggtgat tccagagact gcacaggaga gactcagga ccccc 115**

45

<210> 59

<211> 115

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 12B5VH-3

55 <400> 59

**atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag 60**

60 **gtgcagctgg tgcagtctgg gggaggcttg gtccggcccc gggggtccct gagtc 115**

<210> 60

65 <211> 108

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

## ES 2 304 235 T3

<220>

<223> 12B5VH-4

5 <400> 60

**actcgagacg gtgaccattg tcccttggcc ccagatatcg aaaccataat gtgctcctct 60**

10

**cgcacagtaa tacacagccg tgcctcggc tctcaggtg ttcatttg 108**

<210> 61

<211> 32

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 12B5VH-S, cebador de PCR

20

<400> 61

**ttcaagcttc caccatggag tttgggctga gc 32**

25

<210> 62

<211> 34

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> 12B5VH-A, cebador de PCR

35 <400> 62

**ttgggatcca ctcaccactc gagacggtga ccat 34**

40 <210> 63

<211> 588

<212> ADN

<213> Humano

45

<220>

<221> CDS

<222> (236)...(558)

50 <223> 1-235; intrón, 236-588; región constante de IgG humana (parcial)

55

60

65

ES 2 304 235 T3

<400> 63

```

gaattcgtga gtggatccca agctagcttt ctggggcagg ccaggcctga ccttggett 60
5  ggggcagggg gggggctaag gtgaggcagg tggcgccagc caggtgcaca cccaatgccc 120
atgagcccag acaactggacg ctgaacctcg cggacagtta agaaccagg ggcctctgcg 180
ccctgggccc agctctgtcc cacaccgagg tcacatggca caacctctct tgca gcc 237
10                                     Ala
                                     1

15

tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc 285
20 Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
      5                10                15
acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc 333
25 Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
      20                25                30
ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc 381
30 Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
      35                40                45
gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc etc 429
35 Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
      50                55                60                65
agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac 477
40 Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
      70                75                80
atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aaa 525
45 Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
      85                90                95
gtt gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca 558
50 Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
      100                105

```

60 <210> 64

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

65 <220>

<223> G1CH1-S, cebador de PCR



ES 2 304 235 T3

<400> 64

**tgagaattcg tgagtggatc ccaagct 27**

5

<210> 65

<211> 60

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> G1CH1-A, cebador de PCR

15 <400> 65

**aaaagatctt tatcatgtg gagttttgtc acaagattg ggctcaactt tcttgtccac 60**

20 <210> 66

<211> 432

<212> ADN

<213> Humano

25 <220>

<221> CDS

<222> (12)...(419)

30 <223> HEF-12B5H-g gamma. Péptido 12-419

<400> 66

35 **aagcttccac c atg gag ttt ggg ctg agc tgg gtt ttc ctc gtt gct ctt 50**

**Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu**

40

1

5

10

**tta aga ggt gtc cag tgt cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gga ggc 98**

**Leu Arg Gly Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly**

45

15

20

25

**ttg gtc cgg ccc ggg ggg tcc ctg agt ctc tcc tgt gca gtc tct gga 146**

50

55

60

65

ES 2 304 235 T3

5           Leu Val Arg Pro Gly Gly Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly  
           30                           35                           40                           45  
 atc acc ctc agg acc tac ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc 194  
 10           Ile Thr Leu Arg Thr Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly  
                                   50                           55                           60  
 aag ggg ctg gag tgg gtg gca ggt ata tcc ttt gac gga aga agt gaa 242  
 15           Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Gly Ile Ser Phe Asp Gly Arg Ser Glu  
                                   65                           70                           75  
 tac tat gca gac tcc gtg cag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac agt 290  
 20           Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser  
                                   80                           85                           90  
 25           tcc aag aac acc ctg tat ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac 338  
           Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp  
                                   95                           100                           105  
 30           acg gct gtg tat tac tgt gcg aga gga gca cat tat ggt ttc gat atc 386  
           Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ala His Tyr Gly Phe Asp Ile  
 35           110                           115                           120                           125  
           tgg ggc caa ggg aca atg gtc acc gtc tcg agt ggtgagtgga tcc 432  
 40           Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
                                   130                           135

45 <210> 67  
     <211> 321  
     <212> ADN  
     <213> Humano  
 50 <220>  
     <221> CDS  
     <222> (1)...(321)  
 55 <223> 12B5LV. Péptido 1-321

60

65

ES 2 304 235 T3

<400> 67

```

5      gac atc cag atg acc cag tct cct tcc acc ctg tct gca tct att gga 48
      Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Ile Gly
      1          5          10         15
10     gac aga gtc acc atc acc tgc cgg gcc agc gag ggt att tat cac tgg 96
      Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Gly Ile Tyr His Trp
      20         25         30
15     ttg gcc tgg tat cag cag aag cca ggg aaa gcc cct aaa ctc ctg atc 144
      Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
      35         40         45
20     tat aag gcc tct agt tta gcc agt ggg gcc cca tca agg ttc agc ggc 192
      Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Ala Ser Gly Ala Pro Ser Arg Phe Ser Gly
      50         55         60
25     agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct 240
      Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
      65         70         75         80
30     gat gat ttt gca act tat tac tgc caa caa tat agt aat tat ccg ctc 288
      Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro Leu
      85         90         15
35     act ttc ggc gga ggg acc aag ctg gag atc aaa 321
      Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
      100        105

```

```

50 <210> 68
    <211> 66
    <212> ADN
    <213> Humano
55 <220>
    <221> CDS
    <222> (1)...(66)
60 <223> secuencia lectora

```

65

ES 2 304 235 T3

<400> 68

**atg gac atg agg gtc ccc gct cag ctc ctg ggg etc ctg ctg etc tgg 48**

5 **MET Asp MET Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp**

**5 10 15**

10 **ctc cca ggt gcc aaa tgt 66**

**Leu Pro Gly Ala Lys Cys**

**20**

15

<210> 69

<211> 110

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> 12B5VL-1

25 <400> 69

**atggacatga gggccccgc tcagctcctg gggtcctgc tgctctgget cccaggtgcc 60**

30 **aaatgtgaca tccagatgac ccagtctcct tccacctgt ctgcatctat 110**

<210> 70

<211> 110

35 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> 12B5VL-2

<400> 70

**ggagtttagg ggctttcct ggcttctgct gataccagge caaccagtga taaatacct 60**

45 **cgctggcccc gcaggtgatg gtgactctgt ctccaataga tgcagacagg 110**

<210> 71

50 <211> 110

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

55 <223> 12B5VL-3

<400> 71

**aagcccctaa actcctgac tataaggcct ctagttagc cagtggggcc ccatcaaggt 60**

**tcagcggcag tggatctggg acagatttca ctctaccat cagcagcctg 110**

<210> 72

65 <211> 103

<212> ADN

## ES 2 304 235 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 12B5VL-4

5

<400> 72

**tttgatctcc agcttgggtcc ctccgccgaa agtgagcgga taattactat attgttgca 60**

10

**gtaataagtt gcaaaatcat caggctgcag gctgctgatg gtg 103**

<210> 73

15

<211> 32

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20

<223> 12B5VL-S; cebador de PCR

<400> 73

25

**ttcaagcttc caccatggac atgagggtcc cc 32**

<210> 74

<211> 35

30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35

<223> 12B5VL-A; cebador de PCR

<400> 74

**tctaggatcc actcacgttt gatctccagc ttggt 35**

40

<210> 75

<211> 415

<212> ADN

45

<213> Humano

<220>

<221> CDS

50

<222> (12)...(398)

<223> HEF-12B5H-g kappa. Péptido 12-398

55

60

65

ES 2 304 235 T3

<400> 75

aagcttccac c atg gac atg agg gtc ccc gct cag ctc ctg ggg ctc ctg 50  
 5 Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu  
 1 5 10  
 ctg ctc tgg ctc cca ggt gcc aaa tgt gac atc cag atg acc cag tct 98  
 10 Leu Leu Trp Leu Pro Gly Ala Lys Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser  
 15 15 20 25  
 cct tcc acc ctg tct gca tct att gga gac aga gtc acc atc acc tgc 146  
 20 Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Ile Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys  
 30 30 35 40 45  
 cgg gcc agc gag ggt att tat cac tgg ttg gcc tgg tat cag cag aag 194  
 25 Arg Ala Ser Glu Gly Ile Tyr His Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys  
 30 50 55 60  
 cca ggg aaa gcc cct aaa ctc ctg atc tat aag gcc tct agt tta gcc 242  
 30 Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Ala  
 35 65 70 75  
 agt ggg gcc cca tca agg ttc agc ggc agt gga tct ggg aca gat ttc 290  
 40 Ser Gly Ala Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe  
 45 80 85 90  
 act ctc acc atc agc agc ctg cag cct gat gat ttt gca act tat tac 338  
 45 Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr  
 50 95 100 105  
 tgc caa caa tat agt aat tat ccg ctc act ttc ggc gga ggg acc aag 386  
 50 Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys  
 55 110 115 120 125  
 ctg gag atc aaa cgtgagtgga tcctaga 415  
 60 Leu Glu Ile Lys

<210> 76

<211> 24

<212> ADN

65 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 304 235 T3

<223> Secuencia marcadora FLAG

<400> 76

5           **gac tac aag gat gac gac gat aag 24**

**Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys**

10   **5**

<210> 77

<211> 31

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> 12B5-S; cebador de PCR

<400> 77

25           **atagaattcc accatggagt ttgggctgag c 31**

<210> 78

<211> 24

30 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> HuVHJ3; cebador de PCR

35

<400> 78

**tgaagagacg gtgaccattg tccc 24**

40

<210> 79

<211> 28

<212> ADN

45 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> RhuJH3; cebador de PCR

50

<400> 79

**ggacaatggt caccgtctct tcaggtgg 28**

55

<210> 80

<211> 32

<212> ADN

60 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> RhuVK1; cebador de PCR

65

ES 2 304 235 T3

<400> 80

**ggagactggg tcattctggat gtccgatccg cc 32**

5 <210> 81

<211> 23

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> HuVK1.2; cebador de PCR

15 <400> 81

**gacatccaga tgaccagtc tcc 23**

<210> 82

20 <211> 59

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> 12B5F-A; cebador de PCR

<400> 82

30 **attgcgccg cttatcactt atcgtctca tcctttagt ctttgatctc cagcttgg 59**

<210> 83

35 <211> 45

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> Secuencia de aminoácidos y secuencia de nucleótidos conectora

<400> 83

45 **ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggc gga tcg 45**

**Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser**

**5**

**10**

**15**

50

<210> 84

<211> 823

55 <212> ADN

<213> Humano

<220>

<221> CDS

60 <222> (12)...(809)

<223> sc12B5, Fv de cadena sencilla

65



ES 2 304 235 T3

<400> 84

```

aagcttcac c atg gag ttt ggg ctg agc tgg gtt ttc ctc gtt gct ctt 50
      Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu
      1           5           10
tta aga ggt gtc cag tgt cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gga ggc 98
Leu Arg Gly Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly
      15           20           25
ttg gtc cgg ccc ggg ggg tcc ctg agt ctc tcc tgt gca gtc tct gga 146
Leu Val Arg Pro Gly Gly Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly
      30           35           40           45
atc acc ctc agg acc tac ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc 194
Ile Thr Leu Arg Thr Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
      50           55           60
aag ggg ctg gag tgg gtg gca ggt ata tcc ttt gac gga aga agt gaa 242
Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Gly Ile Ser Phe Asp Gly Arg Ser Glu
      65           70           75
tac tat gca gac tcc gtg cag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac agt 290
Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser
      80           85           90
tcc aag aac acc ctg tat ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac 338
Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
      95           100          105
acg gct gtg tat tac tgt gcg aga gga gca cat tat ggt ttc gat atc 386
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ala His Tyr Gly Phe Asp Ile
      110          115          120          125
tgg ggc caa ggg aca atg gtc acc gtc tcg agt ggt ggt ggt ggt tcg 434
Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
      130          135          140
ggg ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggc gga tcg gac atc cag atg acc cag 482
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln
      145          150          155
tct cct tcc acc ctg tct gca tct att gga gac aga gtc acc atc acc 530
Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Ile Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
      160          165          170

```

ES 2 304 235 T3

tgc cgg gcc agc gag ggt att tat cac tgg ttg gcc tgg tat cag cag 578  
 Cys Arg Ala Ser Glu Gly Ile Tyr His Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln  
 5           175                   180                   185  
 aag cca ggg aaa gcc cct aaa ctc ctg atc tat aag gcc tct agt tta 626  
 10 Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Ser Leu  
 190                   195                   200                   205  
 gcc agt ggg gcc cca tca agg ttc agc ggc agt gga tct ggg aca gat 674  
 15 Ala Ser Gly Ala Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp  
                   210                   215                   220  
 20 ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct gat gat ttt gca act tat 722  
 Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr  
 25                   225                   230                   235  
 TAC TGC CAA CAA TAT AGT AAT TAT CCG CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC 770  
 30 Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr  
                   240                   245                   250  
 aag ctg gag atc aaa gac tac aag gat gac gac gat aag tgataagcgg c 820  
 35 Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys  
                   255                   260                   265  
 40 cgc 823

<210> 85  
 45 <211> 114  
 <212> PRT  
 <213> Humana  
 50 <400> 85

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
 55           1                   5                   10                   15

60  
65

ES 2 304 235 T3

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Ile Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
 50 55 60  
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Ser Gln Phe Ser Leu  
 65 70 75 80  
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95  
 Arg Gly Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Arg Gly Thr Met Val Thr Val  
 100 105 110  
 Ser Ser

30

<210> 86

<211> 342

35 <212> ADN

<213> Humano

<400> 86

40

caggtgcagc tgcagcagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60  
 acctgcactg tctctggtga ctccatcagt agttactact ggagctggat tcggcagccc 120  
 45 ccagggaaagg gactggagtg gattgggtat atctattaca gtgggagcac caactacaac 180  
 ccctccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagagcca gttctccctg 240  
 50 aagetgagct ctgtgaccgc cgcagacacg gccgtgtatt actgtgcgag agggcgggtac 300  
 ttcgatgtct ggggccgtgg caccatggtc actgtctcct ca 342

55

<210> 87

<211> 57

<212> ADN

60 <213> Humano

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(57)

65 <223> secuencia lectora

<308> GenBank nº AF062252

ES 2 304 235 T3

<400> 87

**atg aaa cat ctg tgg ttc ttc ctt ctc ctg gtg gca gct ccc aga tgg 48**

5 **Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp**

**1 5 10 15**

10 **gtc ctg tcc 57**

**Val Leu Ser**

15 <210> 88

<211> 110

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> 12E10VH1

<400> 88

25 **atgaaacatc tgtggttctt cttctcctg gtggcagctc ccagatgggt cctgtcccag 60**

**gtgcagctgc agcagtcggg cccaggactg gtgaagcctt cggagaccct 110**

30 <210> 89

<211> 110

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> 12E10VH2

40 <400> 89

**accaatcca ctccagtccc ttccctgggg gctgccgaat ccagctccag tagtaactac 60**

**tgatggagtc accagagaca gtgcaggtga gggacagggt ctccgaagc 110**

45 <210> 90

<211> 110

<212> ADN

50 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> 12E10VH3

55 <400> 90

**tggagtggat tgggtatata tattacagtg ggagcaccaa ctacaacccc tccctcaaga 60**

60 **gtcgagtcaac catatcagta gacacgtcca agagccagtt ctccctgaag 110**

<210> 91

<211> 114

<212> ADN

65 <213> Secuencia artificial

## ES 2 304 235 T3

<220>

<223> 12E10VH4

5 <400> 91

**tgaggagaca gtgacatgg tgccacggcc ccagacatcg agtaccgcc ctctcgaca 60**

10

**gtaatacacg gccgtgtctg cggcgggtcac agagctcagc ttcagggaga actg 114**

<210> 92

<211> 32

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 12E10VHS, cebador de PCR

20

<400> 92

**ttcaagcttc caccatgaaa catctgtggt tc 32**

25

<210> 93

<211> 34

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> 12E10VHA, cebador de PCR

35 <400> 93

**ttgggatcca ctcacctgag gagacagtga ccat 34**

40 <210> 94

<211> 426

<212> ADN

45 <213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (12)...(417)

50 <223> 12E10H, región V de la cadena H

55

60

65

ES 2 304 235 T3

<400> 94

```

aagcttcac c atg aaa cat ctg tgg ttc ttc ctt ctc ctg gtg gca gct 50
5      Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala
      1           5           10
10     ccc aga tgg gtc ctg tcc cag gtg cag ctg cag cag tcg ggc cca gga 98
      Pro Arg Trp Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly
      15           20           25
15     ctg gtg aag cct tcg gag acc ctg tcc ctc acc tgc act gtc tct ggt 146
      Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly
20     30           35           40           45
      gac tcc atc agt agt tac tac tgg agc tgg att cgg cag ccc cca ggg 194
25     Asp Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly
      50           55           60
30     aag gga ctg gag tgg att ggg tat atc tat tac agt ggg agc acc aac 242
      Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn
      65           70           75
35     tac aac ccc tcc ctc aag agt cga gtc acc ata tca gta gac acg tcc 290
      Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser
40     80           85           90
      aag agc cag ttc tcc ctg aag ctg agc tct gtg acc gcc gca gac acg 338
45     Lys Ser Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr
      95           100          105
50     gcc gtg tat tac tgt gcg aga ggg cgg tac ttc gat gtc tgg ggc cgt 386
      Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Arg
55     110          115          120          125
      ggc acc atg gtc act gtc tcc tca ggtgagtgga tcccaa 426
      Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
      130

```

60 <210> 95  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 <213> Mus

65

ES 2 304 235 T3

<400> 95

```

5      Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
      1          5          10          15
      Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr
10     20          25          30
      Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
15     35          40          45
      Met Ile Tyr Glu Gly Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
20     50          55          60
      Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
25     65          70          75          80
      Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Thr Arg
30     85          90          95
      Ser Thr Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
      100          105          110

```

35 <210> 96

<211> 330

<212> ADN

<213> Mus

40

<400> 96

```

45     tcctatgtgc tgactcagcc accctcgggtg tcagggtctc ctggacagtc gatcaccatc 60
      tcctgcaactg gaaccagcag tgacgttggg ggttataact atgtctcctg gtaccaaacag 120
      caccaggca aagcccccaa actcatgatt tatgagggca gtaaacggcc ctcaggggtt 180
50     tctaategct tctctggctc caagtctggc aacacggcct ccctgaccat ctctgggctc 240
      caggctgagg acgaggctga ttattactgc agctcatata caaccagaag cactcgggtg 300
55     ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330

```

<210> 97

<211> 57

60 <212> ADN

<213> Humano

<220>

<221> CDS

65 <222> (1)...(57)

<223> secuencia lectora





## ES 2 304 235 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 12E10VL4, cebador de PCR

5

<400> 101

**taggacggtc agcttgggcc ctccgccgaa cacccgagtg cttctgggtg tataatgagct 60**

10

**gcagtaataa tcagcctcgt cctcagcctg gagcccagag at 102**

<210> 102

15

<211> 31

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20

<223> 12E10VLS, cebador de PCR

<400> 102

25

**atcaagcttc caccatggcc tggaccgttc t 31**

<210> 103

<211> 36

30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35

<223> 12E10VLA, cebador de PCR

<400> 103

**ctaggatccg ggctgacctt ggacggtcag cttggt 36**

40

<210> 104

<211> 387

<212> ADN

45

<213> Mus

<220>

<221> CDS

50

<222> (1)...(387)

<223> 12E10L, región V de la cadena L

<310>

55

60

65

ES 2 304 235 T3

<400> 104

```

    atg gcc tgg acc gtt ctc ctc ctc ggc ctc ctc tct cac tgc aca ggc   48
5   Met Ala Trp Thr Val Leu Leu Leu Gly Leu Leu Ser His Cys Thr Gly
    1           5           10           15
10  tct gtg acc tcc tat gtg ctg act cag cca ccc tcg gtg tca ggg tct   96
    Ser Val Thr Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ser
           20           25           30
15  cct gga cag tgc atc acc atc tcc tgc act gga acc agc agt gac gtt  144
    Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val
           35           40           45
20  ggt ggt tat aac tat gtc tcc tgg tac caa cag cac cca ggc aaa gcc  192
    Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala
           50           55           60
25  ccc aaa ctc atg att tat gag ggc agt aaa cgg ccc tca ggg gtt tct  240
    Pro Lys Leu Met Ile Tyr Glu Gly Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser
           65           70           75           80
30  aat cgc ttc tct ggc tcc aag tct ggc aac acg gcc tcc ctg acc atc  288
    Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile
           85           90           95
35  tct ggg ctc cag gct gag gac gag gct gat tat tac tgc agc tca tat  336
    Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr
           100          105          110
40  Aca acc aga agc act cgg gtg ttc ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc  384
    Thr Thr Arg Ser Thr Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val
           115          120          125
55  cta                                     387
    Leu
60 <210> 105
    <211> 24
    <212> ADN
    <213> Secuencia artificial
65 <220>
    <221> CDS

```

## ES 2 304 235 T3

<222> (1)...(24)

<223> FLAG, secuencia lectora

5 <400> 105

**gac tac aag gat gac gac gat aag 24**

10 **Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys**

<210> 106

<211> 30

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 12E10S, cebador de PCR

20

<400> 106

**tatgaattcc accatgaaac atctgtggtt 30**

25

<210> 107

<211> 38

<212> ADN

30

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> DB2, cebador de PCR

35

<400> 107

**taggagctac cgcctccacc tgaggagaca gtagccat 38**

40

<210> 108

<211> 44

<212> ADN

45

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> DB1, cebador de PCR

50

<400> 108

**gtctcctcag gtggaggcgg tagctcctat gtgctgactc agcc 44**

55

<210> 109

<211> 59

<212> ADN

60

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 12E10FA, cebador de PCR

65

ES 2 304 235 T3

<400> 109

**attggggccg cttatcactt atcgtcgtca tcctttagt ctaggacggt cagcttgg 59**

5

<210> 110

<211> 792

<212> ADN

10

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> CDS

15

<222> (11)... (778)

<223> 12E10, Fv de cadena sencilla

<400> 110

20

**gaattccacc atg aaa cat ctg tgg ttc ttc ctt ctc ctg gtg gca gct 49**

**Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala**

**1 5 10**

25

**ccc aga tgg gtc ctg tcc cag gtg cag ctg cag cag tcg ggc cca gga 97**

**Pro Arg Trp Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly**

**15 20 25**

30

**ctg gtg aag cct tcg gag acc ctg tcc ctc acc tgc act gtc tct ggt 145**

**Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly**

**30 35 40 45**

35

**gac tcc atc agt agt tac tac tgg agc tgg att cgg cag ccc cca ggg 193**

**Asp Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly**

**50 55 60**

40

**aag gga ctg gag tgg att ggg tat atc tat tac agt ggg agc acc aac 241**

**Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn**

**65 70 75**

45

**tac aac ccc tcc ctc aag agt cga gtc acc ata tca gta gac acg tcc 289**

**Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser**

**80 85 90**

55

**aag agc cag ttc tcc ctg aag ctg agc tct gtg acc gcc gca gac acg 337**

**Lys Ser Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr**

**95 100 105**

60

**gcc gtg tat tac tgt gcg aga ggg cgg tac ttc gat gtc tgg ggc cgt 385**

**Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Arg**

**110 115 120 125**

65

ES 2 304 235 T3

5           ggc acc atg gtc act gtc tcc tca ggt gga ggc ggt agc tcc tat gtg 433  
           Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Tyr Val  
                           130                           135                           140  
 10           ctg act cag cca ccc tcg gtg tca ggg tct cct gga cag tcg atc acc 481  
           Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr  
                           145                           150                           155  
 15           atc tcc tgc act gga acc agc agt gac gtt ggt ggt tat aac tat gtc 529  
           Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val  
                           160                           165                           170  
 20           tec tgg tac caa cag cac cca ggc aaa gcc ccc aaa ctc atg att tat 577  
           Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr  
                           175                           180                           185  
 25           gag ggc agt aaa cgg ccc tca ggg gtt tct aat cgc ttc tct ggc tcc 625  
           Glu Gly Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser  
                           190                           195                           200                           205  
 30           aag tct ggc aac acg gcc tcc ctg acc atc tct ggg ctc cag gct gag 673  
           Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu  
                           210                           215                           220  
 35           gac gag gct gat tat tac tgc agc tca tat aca acc aga agc act cgg 721  
           Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Thr Arg Ser Thr Arg  
                           225                           230                           235  
 40           gtg ttc ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc cta gac tac aag gat gac 769  
           Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Asp Tyr Lys Asp Asp  
                           240                           245                           250  
 45           gac gat aag tgataagcgg ccgc 792  
 50           Asp Asp Lys  
 55                           255

60 <210> 111  
 <211> 62  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 65 <220>  
 <223> sc4.3, cebador de PCR

## ES 2 304 235 T3

<400> 111  
**ggtggctgag tcagcacata ggacgatccg ccaccaccg aaccaccacc acccgaacca 60**  
5 **cc** **62**

<210> 112  
<211> 61  
10 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
15 <223> sc1.3, cebador de PCR

<400> 112  
20 **gcaccatggt cactgtctcc tcaggtggtg gtggttcggg tgggtggtgt tcgggtggtg 60**  
**g** **61**

<210> 113  
25 <211> 822  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
30 <221> CDS  
<222> (11)...(807)  
<223> sc12E10, Fv de cadena sencilla  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

ES 2 304 235 T3

<400> 113

5           gaattccacc atg aaa cat ctg tgg ttc ttc ctt ctc ctg gtg gca gct   49  
             Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala  
                   1                   5                   10  
 10       ccc aga tgg gtc ctg tcc cag gtg cag ctg cag cag tcg ggc cca gga   97  
       Pro Arg Trp Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly  
           15                   20                   25  
 15       ctg gtg aag cct tcg gag acc ctg tcc ctc acc tgc act gtc tct ggt   145  
       Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly  
 20       30                   35                   40                   45  
       gac tcc atc agt agt tac tac tgg agc tgg att cgg cag ccc cca ggg   193  
       Asp Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly  
                   50                   55                   60  
 25       aag gga ctg gag tgg att ggg tat atc tat tac agt ggg agc acc aac   241  
       Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn  
                   65                   70                   75  
 30       tac aac ccc tcc ctc aag agt cga gtc acc ata tca gta gac acg tcc   289  
       Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser  
           80                   85                   90  
 35       aag agc cag ttc tcc ctg aag ctg agc tct gtg acc gcc gca gac acg   337  
       Lys Ser Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr  
           95                   100                   105  
 40       gcc gtg tat tac tgt gcg aga ggg cgg tac ttc gat gtc tgg ggc cgt   385  
       Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Arg  
          110                   115                   120                   125  
 45       ggc acc atg gtc act gtc tcc tca ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggt   433  
       Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
                  130                   135                   140  
 50  
 55  
 60  
 65

ES 2 304 235 T3

5 ggt tcg ggt ggt ggc gga tcg tcc tat gtg ctg act cag cca ccc tcg 481  
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser  
 145 150 155  
 10 gtg tca ggg tct cct gga cag tcg atc acc atc tcc tgc act gga acc 529  
 Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr  
 160 165 170  
 15 agc agt gac gtt ggt ggt tat aac tat gtc tcc tgg tac caa cag cac 577  
 Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His  
 175 180 185  
 20 cca ggc aaa gcc ccc aaa ctc atg att tat gag ggc agt aaa cgg ccc 625  
 Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Glu Gly Ser Lys Arg Pro  
 190 195 200 205  
 25 tca ggg gtt tct aat cgc ttc tct ggc tcc aag tct ggc aac acg gcc 673  
 Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala  
 210 215 220  
 30 tcc ctg acc atc tct ggg ctc cag gct gag gac gag gct gat tat tac 721  
 Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr  
 225 230 235  
 35 tgc agc tca tat aca acc aga agc act cgg gtg ttc ggc gga ggg acc 769  
 Cys Ser Ser Tyr Thr Thr Arg Ser Thr Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr  
 240 245 250  
 40 aag ctg acc gtc cta gac tac aag gat gac gac gat aag tgataagcgg 818  
 Lys Leu Thr Val Leu Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys  
 255 260 265  
 45 ccgc 822  
 50  
 55  
 60  
 65