



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 356 708**

51 Int. Cl.:
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C07K 16/32 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08773954 .6**
96 Fecha de presentación : **10.07.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2164516**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.03.2010**

54 Título: **Secuencia de ADN y proteína optimizada de un anticuerpo para mejorar la calidad y el rendimiento de proteínas de fusión con anticuerpos expresadas en bacterias.**

30 Prioridad: **13.07.2007 EP 07013750**
13.07.2007 US 949580 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.04.2011

73 Titular/es: **TOPOTARGET GERMANY AG.**
Paul-Ehrlich-Strasse 42-44
60596 Frankfurt am Main, DE

72 Inventor/es: **Wels, Winfried, S.;**
Dälken, Benjamin y
Schwarz, Sylvia, E.

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 356 708 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

El anticuerpo-toxina scFv(FRP5)-ETA es una proteína de fusión recombinante que consiste en un fragmento de anticuerpo de cadena sencilla derivado del anticuerpo específico de ErbB2 FRP5, unido por fusión de genes a un fragmento truncado de exotoxina A de *Pseudomonas*. Se ha descrito en detalle en la bibliografía una actividad antitumoral elevada y selectiva de scFv(FRP5)-ETA contra células cancerosas que expresan ErbB2 *in vitro*, en modelos animales y en pacientes con cáncer. La producción de scFv(FRP5)-ETA por expresión bacteriana en *E. coli* usando la metodología actual da como resultado, además del producto principal de scFv(FRP5)-ETA intacto, también un fragmento de scFv(FRP5)-ETA truncado como subproducto. La eliminación completa de este fragmento no deseado usando técnicas de purificación de proteínas clásicas no se ha conseguido hasta la fecha.

La materia objeto de la invención es una secuencia de ADN optimizada que codifica el fragmento de anticuerpo scFv(FRP5). Esta nueva secuencia evita la generación del subproducto no deseado en el contexto de una proteína de fusión scFv(FRP5)-ETA y posiblemente también otras proteínas de fusión que contienen scFv(FRP5) expresadas en bacterias. La secuencia de ADN del dominio scFv(FRP5) de scFv(FRP5)-ETA se modificó por intercambio de un codón diferente, evitando de este modo un de otro modo posible inicio interno de la traducción de proteína.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las células epiteliales de la mayoría de órganos expresan típicamente la tirosina quinasa receptora ErbB2 (HER2) a bajos niveles. Sin embargo, en varios tipos de carcinomas, la expresión de ErbB2 está claramente aumentada, con frecuencia como resultado de la amplificación génica. Debido a esta expresión preferente en muchos tumores de origen epitelial, su accesibilidad desde el espacio extracelular y su implicación en el procedimiento de transformación, la tirosina quinasa receptora ErbB2 es una diana preferida para la terapia del cáncer dirigida.

Basándose en un derivado de exotoxina A de *Pseudomonas* truncada que carece del dominio de unión celular endógeno de la toxina, se desarrolló una toxina recombinante que emplea un fragmento de anticuerpo Fv de cadena sencilla del anticuerpo monoclonal específico de ErbB2 FRP5 para la dirigir la toxina ErbB2 (1). En experimentos de destrucción celular *in vitro*, está molécula de scFv(FRP5)-ETA expresada en bacterias presentaba una actividad antitumoral potente contra un amplio intervalo de células tumorales humanas primarias y establecidas, incluyendo carcinomas de mama y de ovario (1-3), carcinomas de células escamosas (4, 5) y carcinomas de próstata (6). En animales de experimentación, el scFv(FRP5)-ETA inhibía eficazmente el crecimiento de xenoinjertos de tumores humanos establecidos (1, 3-5) y células tumorales de rata y murinas transfectadas de forma estable con construcciones de *c-erbB2* humanas (7, 8). En pacientes con cáncer, la inyección intratumoral de scFv(FRP5)-ETA en lesiones cutáneas de tumores que expresan ErbB2 dio como resultado un índice de respuesta del 60%, observándose una regresión completa de los nódulos tumorales inyectados en el 40%, y una reducción parcial en el tamaño de los tumores inyectados en otro 20% de los pacientes (9). En un estudio clínico reciente de fase I, se determinó la dosis máxima tolerada (DMT), la toxicidad limitante de dosis y los parámetros farmacocinéticos de scFv(FRP5)-ETA inyectado por vía intravenosa (10). De este modo, tres de los 18 pacientes mostraban enfermedad estable, y en otros tres pacientes se observaron signos clínicos de actividad en términos de signos y síntomas.

SUMARIO DE LA INVENCION

La preparaciones de proteínas terapéuticas para el tratamiento de pacientes humanos deben cumplir niveles de pureza y homogeneidad muy elevados para declararse autorizadas por las autoridades reguladoras. Los subproductos que contaminan preparaciones del compuesto activo pueden causar acontecimientos adversos en un paciente tales como reacciones tóxicas y/o la inducción de respuestas inmunes no deseadas. Por lo tanto, dichos subproductos deben eliminarse en la medida en que sea técnicamente posible, y para cualquier subproducto restante, deben demostrarse individualmente las actividades biológicas posibles o la ausencia de las mismas. Como consecuencia, los costes de producción aumentarán espectacularmente debido a la necesidad de técnicas de purificación sofisticadas y costosas usadas para eliminar dichos subproductos no deseados, y/o debido al ensayo adicional que es necesario si no puede eliminarse un subproducto particular.

Para la producción del anticuerpo-toxina scFv(FRP5)-ETA para aplicaciones *in vivo*, hasta ahora se usaba principalmente el vector de expresión bacteriana pSW220-5 (7). Este plásmido codifica una proteína de fusión que consiste en el fragmento de anticuerpo scFv específico de ErbB2 scFv(FRP5) derivado del anticuerpo monoclonal FRP5 (11, 12), fusionado genéticamente con exotoxina A de *Pseudomonas* truncada (ETA), que representa los restos aminoacídicos 252-613 de la toxina de tipo silvestre. Además, la unidad de expresión de scFv(FRP5)-ETA en el plásmido pSW220-5 incluye secuencias para dos grupos de hexahistidina (His₆) y una etiqueta FLAG N-terminal para la purificación y la detección de la proteína (Figura 1A). Las preparaciones de proteína de cultivos de expresión bacteriana transformados con pSW220-5 contienen un producto principal correspondiente al scFv(FRP5)-ETA de longitud completa y un subproducto principal (aproximadamente el 10%) que migra directamente por debajo de la banda principal. Ambas bandas proteicas pueden detectarse en preparaciones de proteína purificadas por tinción con Coomassie de geles de SDS-PAA (véase la Figura 2A, carril izquierdo), y con anticuerpos específicos de ETA en experimentos de inmunotransferencia (no se muestran los datos). Además, experimentos de inmunotransferencia previos pusieron de manifiesto que el subproducto está siendo reconocido por anticuerpos contra la porción de exotoxina A de scFv(FRP5)-ETA. Por lo tanto, se ha pensado que este subproducto se genera durante o después de la expresión por degradación

proteica del scFv(FRP5)-ETA de longitud completa por proteasas bacterianas. Usando técnicas de purificación de proteína convencionales no ha sido posible eliminar hasta ahora este fragmento proteico truncado.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION Y DE LAS REALIZACIONES EJEMPLARES

5 Un objeto de la invención es evitar la generación de este fragmento truncado de scFv(FRP5)-ETA sin afectar a las actividades biológicas terapéuticamente pertinentes de la proteína de longitud completa. Tras la aplicación de la presente invención, ya no puede formarse este subproducto no deseado durante la expresión bacteriana. Por lo tanto, pueden producirse ahora fácilmente preparaciones de proteína de mayor pureza.

10 La presente invención abarca la modificación de la unidad de expresión que codifica el scFv(FRP5)-ETA de tal forma que puede obtenerse una preparación de proteína homogénea a partir de cultivos de expresión bacteriana que carecen del subproducto truncado mencionado anteriormente. Al contrario que las consideraciones previas, los inventores formularon la hipótesis de que el subproducto puede no generarse por degradación proteolítica de la proteína de longitud completa, sino que puede ser el resultado de un inicio alternativo de la traducción de la proteína a partir de un codón AUG interno dentro de la secuencia de scFv(FRP5) del ARNm de scFv(FRP5)-ETA.

15 En un primer aspecto, la invención se refiere a un polipéptido que comprende una primera secuencia de aminoácidos que comprende los aminoácidos 2-120 de la SEC ID N°: 11, y una segunda secuencia de aminoácidos que comprende los aminoácidos 136-242 de la SEC ID N°: 11, en el que dicha primera y segunda secuencia de aminoácidos están unidas por un grupo espaciador peptídico. Preferentemente, el polipéptido de la invención comprende la estructura siguiente:



20 en la que

V_H es la primera secuencia de aminoácidos,

Sp es el grupo espaciador peptídico, y

V_L es la segunda secuencia de aminoácidos.

25 Por consiguiente, la primera secuencia de aminoácidos está habitualmente en el extremo N-terminal del polipéptido. El polipéptido de la invención es habitualmente un anticuerpo de cadena sencilla en el que el dominio variable de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera se unen por medio de un grupo espaciador, preferentemente un péptido. La primera secuencia de aminoácidos en el polipéptido de la invención representa el dominio variable de la cadena pesada y la segunda secuencia de aminoácidos representa el dominio variable de la cadena ligera. Es más preferido un anticuerpo de cadena sencilla en el que el dominio variable de cadena pesada se localiza en el extremo N-terminal del anticuerpo recombinante.

30 La primera secuencia de aminoácidos comprende los aminoácidos 2-120 de la SEC ID N°: 11, preferentemente comprende los aminoácidos 1-120 de la SEC ID N°: 11, o consiste en los aminoácidos 1-120 de la SEC ID N°: 11. En una realización más preferida, la primera secuencia de aminoácidos comprende los aminoácidos 2-120 de la SEC ID N°: 1, preferentemente comprende los aminoácidos 1-120 de la SEC ID N°: 1, o consiste en los aminoácidos 1-120 de la SEC ID N°:1.

35 La segunda secuencia de aminoácidos comprende los aminoácidos 136-242 de la SEC ID N°: 11, preferentemente consiste en los aminoácidos 136-242 de la SEC ID N°:11.

40 El grupo espaciador peptídico puede tener una longitud de 3 a 30 aminoácidos, preferentemente de 5 a 25 aminoácidos, más preferentemente de 10 a 20 aminoácidos, más preferentemente de aproximadamente 15 aminoácidos (por ejemplo, 13, 14, 15, 16 ó 17 aminoácidos). También se prefiere que el grupo espaciador peptídico consista en aminoácidos seleccionados de glicina y serina. Se prefiere particularmente una realización en la que el grupo espaciador es el péptido de 15 aminoácidos que consiste en tres subunidades repetitivas de Gly-Gly-Gly-Gly-Ser.

El polipéptido de la invención comprende preferentemente la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N°: 11, más preferentemente comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N°: 1.

45 El aminoácido Xaa en la SEC ID N°: 11 puede ser cualquier aminoácido excepto metionina, o estar ausente. En el último caso, los aminoácidos en las posiciones 91 y 93 se unen directamente entre sí por medio de un enlace peptídico. Xaa en la SEC ID N°: 11 puede ser cualquier aminoácido excepto metionina, incluyendo aminoácidos de origen natural, aminoácidos de origen no natural y aminoácidos modificados. Cuando Xaa es un aminoácido de origen natural, Xaa puede ser alanina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, lisina, leucina, asparagina, prolina, glutamina, arginina, serina, treonina, valina, triptófano, tirosina o selenocisteína. Preferentemente, Xaa se selecciona del grupo que consiste en serina, alanina, treonina y cisteína. Más preferentemente, Xaa es serina. Cuando Xaa es un aminoácido de origen no natural o modificado, los posibles significados de Xaa incluyen, pero sin limitación, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, hidroxilisina, etilglicina y etilasparagina. Xaa también puede ser cualquier aminoácido modificado como se define en la tabla 4 de WIPO Standard

ST.25, que se incorpora en el presente documento por referencia.

Como alternativa, Xaa puede estar ausente, lo que significa que la metionina en la posición 92 de la secuencia de FRP5 (véase, por ejemplo, la SEC ID N°: 9) se ha deletado y no se sustituye por otro aminoácido. De acuerdo con esa realización, el polipéptido de la invención puede comprender la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N°: 12.

El anticuerpo recombinante de cadena sencilla puede comprender además una molécula efectora y/o secuencias señal que faciliten el procesamiento del anticuerpo por la célula huésped en la que se prepara.

Las moléculas efectoras consideradas son las útiles para fines terapéuticos o de diagnóstico, por ejemplo, enzimas que causan una reacción detectable, por ejemplo, fosfatasa, tal como fosfatasa alcalina de *E.coli* o fosfatasa alcalina de mamífero, por ejemplo, fosfatasa alcalina bovina, peroxidasa de rábano picante, beta-D-galactosidasa, glucosa oxidasa, glucoamilasa, anhidrasa carbónica, acetilcolinesterasa, lisozima, malato deshidrogenasa o glucosa-6-fosfato, un péptido que tiene propiedades de unión particulares, por ejemplo, estreptavidina de *Streptomyces avidinii* que se une fuertemente a biotina, o enzimas, toxinas u otros fármacos que atacan a las células a que se une el anticuerpo, por ejemplo, una proteasa, una citolisina o una exotoxina, por ejemplo, ricina A, toxina diftérica A o exotoxina de *Pseudomonas*. En lo siguiente, un anticuerpo recombinante de cadena sencilla que comprende además una molécula efectora se denomina proteína de fusión, o pretende incluirse en el significado de las expresiones "anticuerpo (recombinante) de cadena sencilla" o "anticuerpo recombinante", si es apropiado. La molécula efectora puede ser un polipéptido que tenga actividad de destrucción celular. La actividad de destrucción celular puede determinarse de acuerdo con el Ejemplo 3 de la presente solicitud.

La expresión molécula efectora también incluye variantes biológicamente activas de las proteínas mencionadas anteriormente, por ejemplo, variantes producidas a partir de un ADN que se ha sometido a mutagénesis *in vitro*, con la condición de que la proteína codificada por dicho ADN conserve la actividad biológica de la proteína nativa. Dichas modificaciones pueden consistir en una adición, intercambio o delección de aminoácidos, dando como resultado esta última en variantes acortadas. Por ejemplo, una enzima tal como una fosfatasa puede prepararse a partir de un ADN que se ha modificado para facilitar la clonación del gen codificante, o una exotoxina, tal como exotoxina de *Pseudomonas*, puede prepararse a partir de un ADN que se ha mutado para deletar el dominio de unión celular y/o para aumentar o reducir su potencial de destrucción celular.

El polipéptido efector puede comprender los aminoácidos 245-606 de la SEC ID N°: 3.

La expresión molécula efectora también incluye entidades químicas que tienen actividad de destrucción celular. La actividad de destrucción celular puede determinarse de acuerdo con el Ejemplo 3 de la presente solicitud. Dichas entidades químicas incluyen, pero sin limitación, fármacos quimioterápicos, compuestos citotóxicos y compuestos citostáticos. Son ejemplos de fármacos quimioterápicos y compuestos citotóxicos:

- agentes alquilantes
- antibióticos citotóxicos
- antimetabolitos
- alcaloides de la vinca y etopósido
- otros

Los agentes alquilantes reaccionan con restos nucleófilos, tales como las entidades químicas en los precursores de nucleótidos para la producción de ADN. Afectan al proceso de la división celular alquilando estos nucleótidos e impidiendo su ensamblaje en el ADN. Los agentes alquilantes adecuados incluyen Mustargeno, Fosfato de Estramustina, Melfalán, Clorambucilo, Prednimustina, Ciclofosfamida, Ifosfamida, Trofosfamida, Busulfán, Treosulfán, Tiotepa, Carmustina (BCNU), Lomustina (CCNU), Nimustina (ACNU), Dacarbazina (DTIC), Procarbazina, Cisplatino y Carboplatino.

Los anticuerpos citotóxicos actúan inhibiendo directamente la síntesis de ADN o ARN y son eficaces durante el todo el ciclo celular. Los antibióticos citotóxicos adecuados incluyen Actinomicina D, Daunorrubicina, Doxorubicina, Epirubicina, Idarubicina, Mitoxantrón, Bleomicina, Mitomicina C, Irinotecán (CPT-11) y Topotecán.

Los antimetabolitos interfieren con enzimas celulares o metabolitos naturales que están implicados en el proceso de la división celular, alterando de este modo la división de la célula. Los antimetabolitos adecuados incluyen Metotrexato, 6-Mercaptopurina, 6-Tioguanina, Pentostatina, Fosfato de Fludarabina, Cladribina, 5-Fluorouracilo, Capecitabina, Citarabina, Gemcitabina e Hidroxiurea.

Los alcaloides vegetales y etopósidos son agentes derivados de plantas. Inhiben la replicación celular impidiendo el ensamblaje de los componentes de la célula que son esenciales para la división celular (por ejemplo, Alcaloides de la Vinca; Etopósido). Los alcaloides y etopósidos adecuados incluyen Vincristina, Vinblastina, Vindesina,

Etopósido (VP16), Tenipósido (VM26).

El grupo de compuestos calificados como "otros" está compuesto principalmente por taxanos (por ejemplo, Paclitaxel, Taxol, Docetaxel, Taxotere) y complejos metálicos (por ejemplo, cisPlatino), e inhibidores de la transducción de señales (STI), inhibidores de funciones enzimáticas específicas, incluyendo, pero sin limitación, inhibidores de la histona desacetilasa, inhibidores de quinasas y proteasas. El inhibidor de la histona desacetilasa (HDAC) puede seleccionarse del grupo que consiste en vorinostat, belinostat, PCI-24781, CHR-3242, JNJ-16241199, MGCD-0103, romidepsina, MS-275, butirato, ácido valproico y combinaciones de los mismos. El inhibidor de quinasas puede seleccionarse del grupo que consiste en imatinib, cedarinib, gefitinib, vandetanib, sarafenib, danatinib, lestaurtinib, enzastaurina, pazopanib, alvocidib, nilotinib, vatalinib, erlotinib, suninib y combinaciones de los mismos. El inhibidor de proteasas puede seleccionarse del grupo que consiste en WX-UK1, bortezomib y combinaciones de los mismos.

Como alternativa, la entidad química que tiene actividad de destrucción celular puede ser una sustancia radiactiva, por ejemplo, Cobalto-60.

La molécula efectora puede estar unida al polipéptido de la invención por un enlace covalente o por un enlace no covalente. Cuando la molécula efectora se une al polipéptido de la invención por un enlace covalente, puede fusionarse a la parte N-terminal o a la C-terminal del polipéptido. Preferentemente, la molécula efectora se fusiona al extremo C-terminal de la segunda secuencia de aminoácidos para formar un polipéptido de fusión. Puede haber uno o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro ó cinco) aminoácidos entre la segunda secuencia de aminoácidos y la secuencia de aminoácidos de la molécula efectora en el polipéptido de fusión.

Más preferentemente, el polipéptido de la invención comprende los aminoácidos 2-606 de la secuencia de aminoácidos SEC ID N°:3, o comprende los aminoácidos 1-606 de la secuencia de aminoácidos SEC ID N°:3, o consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N°:3.

El polipéptido de la invención comprende opcionalmente otro péptido, por ejemplo, un péptido que facilite la purificación, en particular un péptido que sea un epítipo contra el que está disponible un anticuerpo, tal como el péptido FLAG. La purificación, por ejemplo, por medio de cromatografía de afinidad de una proteína de fusión que comprende dicho péptido, es ventajosa, por ejemplo, en el sentido de que puede ser más rápida, más específica y/o más suave. El péptido puede colocarse en el extremo N-terminal de la proteína de fusión, entre el anticuerpo recombinante y la molécula efectora, o en el extremo C-terminal de la proteína de fusión. Preferentemente, se localiza en el extremo N-terminal o en el C-terminal, en particular en el N-terminal. Preferentemente, estas construcciones también contienen un sitio de escisión, de modo que la proteína de fusión puede liberarse de las mismas, por escisión enzimática, por ejemplo, por enteroquinasa o por Factor Xa, o por los procedimientos químicos conocidos en la técnica. Además, estas construcciones pueden comprender un espaciador peptídico que consiste en uno o más, por ejemplo de 1 a 10, en particular aproximadamente 2 aminoácidos, facilitando dicho espaciador la unión del péptido mencionado anteriormente y/o del sitio de escisión al anticuerpo recombinante. El sitio de escisión se coloca de tal modo que la proteína de fusión que comprende el anticuerpo recombinante y la molécula efectora pueda liberarse fácilmente, si se desea, preferentemente *in vitro*. Por ejemplo, en una construcción de proteína que comprende la proteína de fusión denominada scFv(FRP5)-ETA, el péptido FLAG y un sitio de escisión de enteroquinasa se unen a un espaciador y se colocan delante del dominio variable de cadena pesada/cadena ligera de Fv y la proteína de fusión con exotoxina A. Si se desea, el péptido FLAG puede eliminarse por escisión mediante enteroquinasa, preferentemente después de la purificación por afinidad de la proteína, produciendo una proteína de fusión que comprende el anticuerpo de cadena sencilla Fv(FRP5) y la exotoxina A.

Otro aspecto de la presente invención es un polinucleótido que codifica el polipéptido de la invención. El término "polinucleótido o polinucleótidos" se refiere en general a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido que puede ser ADN o ARN no modificado o ADN o ARN modificado. El polinucleótido puede ser ADN mono- o bicatenario, ARN mono- o bicatenario. Como se usa en el presente documento, el término "polinucleótido o polinucleótidos" también incluye ADN o ARN que comprenden una o más bases modificadas y/o bases poco habituales, tales como inosina. Se apreciará que pueden realizarse una diversidad de modificaciones en el ADN y ARN que sirven a muchos fines útiles conocidos por lo expertos en la materia. El término "polinucleótido o polinucleótidos", como se emplea en el presente documento, abarca dichas formas químicamente, enzimáticamente o metabólicamente modificadas de polinucleótidos, así como las formas químicas de ADN y ARN características de virus y células, incluyendo, por ejemplo, células simples y complejas.

Se prefieren polinucleótidos que codifican la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N°: 11. Más preferentemente, el polinucleótido codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N°: 1. Aún más preferentemente, el polinucleótido codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N°: 3. Los polinucleótidos más preferidos comprenden la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC ID N°: 2 o la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC ID N°: 4.

Preferentemente, el polinucleótido de la invención es un polinucleótido aislado. El término polinucleótido "aislado" se refiere a un polinucleótido que está sustancialmente libre de otras secuencias de ácido nucleico, tales como, y sin limitación, otro ADN y ARN cromosómico y extracromosómico. Los polinucleótidos aislados pueden

purificarse a partir de una célula huésped. Pueden usarse procedimientos de purificación de ácido nucleico convencionales conocidos por lo expertos en la materia para obtener polinucleótidos aislados. El término también incluye polinucleótidos recombinantes y polinucleótidos sintetizados químicamente.

5 Otro aspecto más de la invención es un plásmido de un vector que contiene un polinucleótido de acuerdo con la presente invención. Los términos "plásmido" y "vector" se refieren a un elemento extracromosómico que lleva con frecuencia genes que no son parte del metabolismo central de la célula, y habitualmente en forma de fragmentos de ADN bicatenarios circulares. Dichos elementos pueden ser secuencias de replicación autónoma, secuencias de integración en el genoma, secuencias de nucleótidos o fagos, lineales o circulares, de un ADN o ARN mono- o bicatenario, derivadas de cualquier fuente, en las que varias secuencias de nucleótidos se han unido o recombinado en una construcción única que es capaz de introducir un fragmento promotor y una secuencia de ADN para un producto génico seleccionado junto con la secuencia no traducida 3' apropiada en una célula. Habitualmente, el polinucleótido en el plásmido o vector está unido operativamente a una o más secuencias de control de la expresión.

15 La expresión "unido operativamente" se refiere a la asociación de secuencias de ácido nucleico en un solo fragmento de ácido nucleico, de modo que la función de una se ve afectada por la otra. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente a una secuencia codificante cuando es capaz de afectar a la expresión de esa secuencia codificante (es decir, que la secuencia codificante esté bajo el control transcripcional del promotor). Las secuencias codificantes pueden unirse operativamente a secuencias reguladoras en orientación con sentido o antisentido. Un "promotor" es una secuencia de ADN cadena arriba del inicio de la transcripción de un gen e implicada en el reconocimiento y la unión de ARN polimerasa y/o otras proteínas para iniciar la transcripción del gen. Habitualmente, el promotor determina en qué condiciones se expresa el gen. Habitualmente, el promotor usado en el presente documento es heterólogo respecto al polinucleótido de la invención con el que se une operativamente.

25 Los vectores realizan típicamente dos funciones en colaboración con células huésped compatibles. Una función es facilitar la clonación del ácido nucleico que codifica los dominios variables de inmunoglobulina, es decir, producir cantidades utilizables del ácido nucleico (vectores de clonación). La otra función es proporcionar la replicación y la expresión de las construcciones génicas recombinantes en un huésped adecuado, mediante su mantenimiento como un elemento extracromosómico o por integración en el cromosoma huésped (vectores de expresión). Un vector de clonación comprende las construcciones génicas recombinantes que se han descrito anteriormente, un origen de replicación o una secuencia de replicación autónoma, secuencias marcadoras dominantes y, opcionalmente, secuencias señal y sitios de restricción adicionales. Un vector de expresión comprende además secuencias de control de la expresión esenciales para la transcripción y la traducción de los genes recombinantes.

30 Un origen de replicación o una secuencia de replicación autónoma se proporcionan por construcción del vector para que incluya un origen exógeno tal como derivado del virus de los simios 40 (SV40) u otra fuente viral, o mediante los mecanismos cromosómicos de células huésped.

35 Los marcadores permiten la selección de células huésped que contienen el vector. Los marcadores de selección incluyen genes que confieren resistencia a metales pesados tales como cobre o a antibióticos tales como geneticina (G-418), kanamicina o higromicina, o genes que complementan una lesión genética de la célula huésped, tal como la ausencia de timidina quinasa, hipoxantina fosforil transferasa, dihidrofolato reductasa o similares.

40 Las secuencias señal pueden ser, por ejemplo, presecuencias o líderes secretores que dirigen la secreción del anticuerpo recombinante, señales de corte y empalme o similares. Los ejemplos de secuencias señal que dirigen la secreción del anticuerpo recombinante son secuencias derivadas del gen *ompA*, el gen *pelB* (pectato liasa) o el gen *phoA*.

45 Como secuencias de control de la expresión, el ADN de vector comprende un promotor, secuencias necesarias para el inicio y la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm y, opcionalmente, potenciadores y secuencias reguladoras adicionales. Pueden emplearse una amplia diversidad de secuencias promotoras dependiendo de la naturaleza de la célula huésped. Los promotores que son fuertes y al mismo tiempo están bien regulados son los más útiles. Las secuencias para el inicio de la traducción son, por ejemplo, secuencias de Shine-Dalgarno. Las secuencias necesarias para el inicio y la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm están disponibles comúnmente a partir de las regiones 5' y regiones 3' no codificantes, respectivamente, de ADNc eucariotas o virales, por ejemplo, del huésped de expresión. Los potenciadores son secuencias de ADN que estimulan la transcripción de origen viral, por ejemplo, derivadas de virus de los simios, poliomavirus, papilomavirus bovino o virus del sarcoma de Moloney, o de origen genómico, especialmente murino.

55 Son ejemplos de vectores que son adecuados para la replicación y la expresión en una cepa de *E. coli* bacteriófagos, por ejemplo, derivados de bacteriófagos lambda, o plásmidos, tales como, en particular, el plásmido ColE1 y sus derivados, por ejemplo pMB9, pSF2124, pBR317 o pBR322 y plásmidos derivados de pBR322, tales como pUC9, pUCK0, pHRi148 y pLc24. Los vectores adecuados contienen un replicón completo, un gen marcador, secuencias de reconocimiento para endonucleasas de restricción, de modo que el ADN extraño y, si es apropiado, la secuencia de control de la expresión, pueden insertarse en estos sitios y, opcionalmente, secuencias señal y potenciadores.

5 Son promotores microbianos, por ejemplo, el promotor fuerte hacia izquierda PL de bacteriófago lambda, que está controlado por un represor termosensible. También son adecuados promotores de *E. coli* tales como el promotor lac (lactosa) regulado por el represor lac e inducido por isopropil-beta-D-tiogalactósido, el promotor trp (triptófano) regulado por el represor trp e inducido, por ejemplo, por privación de triptófano y el tac (promotor híbrido trp-lac) regulado por el represor lac.

10 Los vectores que son adecuados para la replicación y expresión en levaduras contienen un inicio de la replicación en levaduras y un marcador genético selectivo para levaduras. Un grupo de dichos vectores incluye las denominadas secuencias ars (secuencias de replicación autónoma) como origen de replicación. Estos vectores se retienen extracromosómicamente dentro de la célula de levadura después de la transformación, y se replican de forma autónoma. Además, pueden usarse vectores que contienen todo o parte del ADN plasmídico de 2 μ (2 micrómetros) de *Saccharomyces cerevisiae*. Dichos vectores se integrarán por recombinación en plásmidos de 2 μ ya existentes dentro de la célula, o se replicarán de forma autónoma. Las secuencias de 2 μ son particularmente adecuadas cuando debe conseguirse una alta frecuencia de transformación y un alto número de copias.

15 Son secuencias de control de la expresión que son adecuadas para la expresión en levadura, por ejemplo, las de genes de levadura muy expresados. Por lo tanto, pueden usarse los promotores para el gen de TRP1, el gen de ADHI o ADHII, el gen de fosfatasa ácida (PHO3 o PHO5), el gen del isocitocromo o un promotor implicado en la ruta glucolítica, tales como los promotores de los genes de enolasa, gliceraldehído-3-fosfato quinasa (PGK), hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucoquinasa.

20 Se proporcionan preferentemente vectores adecuados para su replicación y expresión en células de mamífero, con secuencias promotoras derivadas de ADN de origen viral, por ejemplo, de virus de los simios 40 (SV40), virus del sarcoma de Rous (RSV), adenovirus 2, papilomavirus bovino (BPV), papovavirus BK mutante (BKV) o citomegalovirus humano o de ratón (CMV). Como alternativa, los vectores pueden comprender promotores de productos de expresión de mamíferos, tales como actina, colágeno, miosina, etc. o el promotor nativo y secuencias de control que están normalmente asociadas con la secuencia génica deseada, es decir, el promotor de la cadena L o de la cadena H de inmunoglobulina.

30 Los vectores preferidos son adecuados para huéspedes tanto procariontas como eucariotas y se basan en sistemas de replicación viral. Se prefieren particularmente vectores que comprenden promotores de virus de los simios, por ejemplo, pSVgpt o pSVneo, que comprenden además un potenciador, por ejemplo, un potenciador asociado normalmente con las secuencias génicas de inmunoglobulina, en particular el potenciador de la cadena L o H de Ig de ratón.

El ADN recombinante que codifica un anticuerpo recombinante de la invención puede prepararse, por ejemplo, por cultivo de una célula huésped transformada y, opcionalmente, aislamiento del ADN preparado.

35 Otro aspecto de la invención son células huésped que se transforman con y/o contienen el plásmido o el vector de acuerdo con la presente invención. Las células huésped adecuadas incluyen células procariontas y eucariotas (por ejemplo, células de mamífero), células de levadura, células bacterianas (por ejemplo, células de *E. coli*). Son células huésped preferidas células de *E. coli*. Se describen células huésped adecuadas y procedimientos de transformación en la Patente de Estados Unidos N° 5.939.531, y se incorpora en el presente documento en su totalidad por referencia.

40 La presente invención también se refiere a procedimientos de cultivo de las células huésped y a procedimientos para la preparación del polipéptido de la invención. Un aspecto de la invención es un procedimiento para la preparación del polipéptido de la invención, que comprende cultivar una célula huésped descrita en el presente documento en condiciones adecuadas y recuperar el polipéptido. En la Patente de Estados Unidos N° 5.939.531 se describen procedimientos de cultivo de células huésped y procedimientos para producir fragmentos de anticuerpo de cadena sencilla y anticuerpos recombinantes. Estos procedimientos son aplicables a las células huésped de la presente invención y a los polipéptidos de la presente invención cambiando lo que se deba cambiar y se incorporan en el presente documento en su totalidad por referencia.

50 Otro aspecto de la invención es el uso de un polipéptido de acuerdo con la invención o de un polinucleótido de acuerdo con la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno que implique una actividad y/o expresión anormal de ErbB2 (por ejemplo, cáncer, tumores). Dichos trastornos incluyen, pero sin limitación, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, carcinoma de células escamosas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer pulmonar no microcítico, cáncer de páncreas, cáncer gástrico, cáncer de glándulas salivares, tumores parotídeos, melanoma, carcinoma cervical, cáncer de páncreas, cáncer de colon y colorrectal, cáncer de vejiga, meduloblastoma, cáncer de riñón, cáncer de hígado y cáncer de estómago. El trastorno también puede ser metástasis y/o enfermedad mínima residual.

55 Por lo tanto, la invención también se refiere a composiciones farmacéuticas (por ejemplo, para tratar tumores que sobreexpresen el receptor del factor de crecimiento c-erbB-2) que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de acuerdo con la invención y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. Se prefieren composiciones farmacéuticas para aplicación parenteral. Son composiciones para aplicación intramuscular,

subcutánea o intravenosa, por ejemplo, soluciones o suspensiones acuosas isotónicas, opcionalmente preparadas poco antes del uso a partir de preparaciones liofilizadas o concentradas. Las suspensiones en aceite contienen como componente oleoso los aceites vegetales, sintéticos o semisintéticos habituales con fines de inyección. Las composiciones farmacéuticas pueden esterilizarse y contener adyuvantes, por ejemplo, para conservar, estabilizar, humedecer, emulsionar o solubilizar los ingredientes, sales para la regulación de la presión osmótica, tampones y/o compuestos que regulan la viscosidad, por ejemplo, carboxicelulosa sódica, carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, dextrano, polivinilpirrolidina o gelatina.

Las composiciones farmacéuticas de la invención contienen de aproximadamente el 0,001% a aproximadamente el 50% de principios activos. Pueden estar en forma unitaria de dosificación, tal como ampollas o viales listos para usar, o también en forma sólida liofilizada.

En general, la dosis terapéuticamente eficaz para mamíferos está entre aproximadamente 0,1 y 100 µg de un polipéptido de la invención por kg de peso corporal, más preferentemente entre 1 y 50 µg y, aún más preferentemente, entre 5 y 25 µg, dependiendo del tipo de polipéptido, del estado del paciente y del modo de aplicación. El modo de administración específico y la dosificación apropiada se seleccionarán por el médico adjunto teniendo en cuenta las particularidades del paciente, el estado de la enfermedad, el tipo de tumor tratado y similares. Las composiciones farmacéuticas de la invención se preparan por procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, por procedimientos de mezcla, disolución, confección o liofilización convencionales. Las composiciones farmacéuticas para inyección se procesan, se rellenan en ampollas o viales y se sellan en condiciones asépticas de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica.

En una realización, el polipéptido se administra en combinación con otra terapia anticancerosa. Se incorporan en el presente documento todas las terapias anticancerosas denominadas "segundo agente terapéutico" en el documento WO 03/024442 A2.

En otro aspecto más, la invención se refiere a un procedimiento para mejorar la producción de un anticuerpo recombinante de cadena sencilla dirigido contra el dominio extracelular de la tirosina quinasa receptora ErbB2, que comprende impedir el inicio de la traducción del codón nº 92 de la SEC ID N°: 9. Esto puede conseguirse modificando uno o más nucleótidos en las posiciones 262-270 de la SEC ID N°: 10 de modo que ya no se produzca el inicio de la traducción interno en el codón nº 92 (Met 92). Los nucleótidos pueden sustituirse sin cambiar la secuencia de aminoácidos codificada.

Se indican tres ejemplos no limitantes de la secuencia de nucleótidos de las posiciones 262-270 en lo siguiente:

	posición de nucleótido								
	262	263	264	265	266	267	268	269	270
(1)	A	A	A	A	G	T	G	A	A
(2)	A	A	A	T	C	T	G	A	A
(3)	A	A	A	T	C	C	G	A	A

Como alternativa, estos restos aminoacídicos Lys, Ser o Glu pueden sustituirse por otros aminoácidos químicamente similares o no relacionados, de origen natural o generados artificialmente, y pueden estar codificados por nucleótidos que estén químicamente modificados.

Otra posibilidad es (como se ha descrito anteriormente en el presente documento), sustituir la M92 en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 9 con un aminoácido diferente. Preferentemente, el aminoácido diferente es serina. Otra posibilidad más es (como se ha descrito anteriormente en el presente documento) delecionar la M92 en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°:9 sin sustituirla por un aminoácido diferente. Esta realización está representada por la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N°: 12.

Figuras

Figura 1: Visión de conjunto de variaciones del anticuerpo-toxina scFv(FRP5)-ETA y características de secuencia específicas. **(A)** Construcciones para la expresión bacteriana de derivados de scFv(FRP5)-ETA. Todos los casetes de expresión están bajo el control del promotor tac inducible por IPTG y codifican el scFv(FRP5) específico de ErbB2 fusionado con la exotoxina A (ETA) de *Pseudomonas aeruginosa* (restos 252-613 de la toxina de tipo silvestre). El plásmido pSW220-5 lleva secuencias que codifican una etiqueta FLAG (F) N-terminal y dos grupos His₆ (H). En pSES212 y pSES213, la etiqueta FLAG y los

grupos His₆ están deletados. El pSES213 lleva una mutación dentro de la secuencia de scFv(FRP5) que cambia la Metionina (M) en la posición 92 a Serina (S). De otro modo, pSES213 es idéntico a pSES212. **(B)** Representación de secuencias de proteína (SEC ID N°: 9) y ADN (SEC ID N°: 10) parciales de scFv(FRP5)-ETA en los plásmidos pSES212 y pSES213. Se indica el cambio de un codón de inicio interno potencial en la posición de codón 92 de ATG a TCG. Está subrayada una secuencia con una similitud moderada con una secuencia de Shine-Dalgarno.

5

10

15

20

25

Figura 2: Expresión y actividad antitumoral biológica de variaciones del anticuerpo-toxina scFv(FRP5)-ETA. **(A)** Análisis de SDS-PAGE de preparaciones de proteína de scFv(FRP5)-ETA (220-5), scFv(FRP5)-ETA (212) y scFv(FRP5-M92S)-ETA (213). Estos derivados de scFv(FRP5)-ETA se expresaron en *E. coli* DH5 α transformadas con los plásmidos de expresión pSW220-5, pSES212 o pSES213. Se aislaron cuerpos de inclusión, se desnaturalizaron y se renaturalizaron. Se separaron muestras de proteína mediante SDS-PAGE y las proteínas se detectaron mediante tinción con Coomassie. Se indican las bandas correspondientes a las proteínas scFv(FRP5)-ETA y scFv(FRP5-M92S)-ETA de longitud completa (fecha en blanco). Están presentes los productos de degradación principales en muestras expresadas a partir de los plásmidos pSW220-5 y pSES212 (fecha oscura). En la preparación de scFv(FRP5-M92S)-ETA (213) este subproducto no deseado está ausente. **(B)** Actividades biológicas de scFv(FRP5)-ETA (220-5) y scFv(FRP5-M92S)-ETA (213). Se incubaron células de carcinoma renal murino Renca-lacZ/ErbB2 transfectadas de forma estable con ADNc de *c-erbB2* humano (panel izquierdo) y células de control Renca-lacZ negativas para ErbB2 (panel derecho) durante 48 h con scFv(FRP5)-ETA (220-5) o scFv(FRP5-M92S)-ETA (213) en muestras por triplicado a las concentraciones indicadas. Se determinó la viabilidad de las células supervivientes midiendo la absorbancia a 590 nm en un ensayo de metabolización de MTT. Se usaron células tratadas con PBS como control. Las barras de error indican la desviación típica de la media. **(C)** Actividad de scFv(FRP5-M92S)-ETA(213) respecto a la actividad de scFv(FRP5)-ETA (220-5). Se proporcionan las proporciones para scFv(FRP5-M92S)-ETA (213) respecto a scFv(FRP5)-ETA (220-5) de los valores de A₅₉₀ medidos en (B) para células diana positivas para antígeno y negativas para antígeno a las concentraciones de proteína indicadas.

Ejemplos

Ejemplo 1

30

Clonación Molecular de Construcciones de Expresión Modificadas

Procedimiento

Construcción de vectores de expresión de scFv(FRP5)-ETA

35

40

45

50

El plásmido pSW220-5 se ha descrito anteriormente (7). Contiene secuencias que codifican una etiqueta FLAG N-terminal, un primer grupo His₆, el scFv(FRP5) específico de ErbB2, un segundo grupo His₆ y la exotoxina A de *Pseudomonas* truncada (restos 252-613 de la toxina de tipo silvestre) en una sola fase de lectura abierta. El plásmido pSES211 (no publicado; suministrado por Topo Target Alemania AG) contiene una fase de lectura abierta para scFv(FRP5)-ETA originariamente derivada de pSW220-5 y que todavía incluye el primer grupo His₆ N-terminal, pero carece la etiqueta FLAG N-terminal y del grupo His₆ interno entre las secuencias de scFv(FRP5) y exotoxina A. El plásmido pSES212 se obtuvo por delección del grupo His₆ N-terminal restante de pSES211. El plásmido se generó por PCR usando los cebadores oligonucleotídicos 5'*NdeI*-scFv(FRP5) 5'-CGATTAGCATATGCAGGTACAACACTGCAGCAGTCAGGACC-3' (SEC ID N°: 5) y 3' *XbaI*-scFv(FRP5) 5'-GCTGCCGCCCTCTAGAGCTTTGATCTC-3' (SEC ID N°: 6) (BioSpring, Frankfurt, Alemania) y el plásmido pSES211 como molde. En esta reacción, la secuencia del fragmento de scFv(FRP5) se amplificó sin las secuencias codificantes para el grupo His₆ N-terminal. El producto de PCR se subclonó en el vector pCR2.1 por clonación TA (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania). El plásmido resultante se digirió con *NdeI* y *XhoI*, y el fragmento scFv(FRP5) resultante se insertó en pSES211 digerido con las mismas enzimas, produciendo el plásmido pSES212. La mutación de Met₉₂ a Ser se introdujo en el plásmido pSES212 por mutagénesis dirigida mediante PCR usando los cebadores oligonucleotídicos pSES212_M92S_con sentido 5'-CCTCAAAGTGAAGACTCGGCTA-CATATTTCTGTGC-3' (SEC ID N°: 7) y pSES212_M92S_antisentido 5'-GCACAGAAATAT-GTAGCCGAGTCTTCACTTTTGAGG-3' (SEC ID N°: 8) (BioSpring) y el plásmido pSES212 como molde, produciendo el plásmido pSES213. Las secuencias de ADN de todos los vectores de expresión se verificaron mediante secuenciación de ADN.

Resultados

55

Como base para la modificación de la región codificante de scFv(FRP5)-ETA se usó el plásmido de expresión pSES212 (no publicado). La región codificante de scFv(FRP5)-ETA dentro de pSES212 carece de las secuencias que codifican la etiqueta FLAG N-terminal y los dos grupos His₆ presentes en la región correspondiente de pSW220-5 (véase la Figura 1A). Además, la cadena principal del vector, fuera de la secuencia de scFv(FRP5)-ETA de pSES212 es diferente de la de pSW220-5. Estas diferencias no son relevantes en el contexto de la presente invención. Como se muestra en la Figura 2A (carril izquierdo y del medio), el subproducto de scFv(FRP5)-ETA truncado se está produciendo

5 en la misma medida por expresión usando los vectores de expresión pSES212 o pSW220-5. Mediante análisis de secuencia los inventores identificaron un codón ATG interno (un codón de inicio AUG interno potencial a nivel del ARNm) dentro de la región flanqueante 3 de la cadena pesada del anticuerpo scFv(FRP5) cerca de la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) en las posiciones de nucleótidos (nt) 274-276 de la fase de lectura abierta, correspondientes al codón 92 de scFv(FRP5)-ETA en pSES212 (véase la Figura 1 B). Este codón de inicio potencial también está precedido por una secuencia con una similitud moderada con una secuencia de Shine-Dalgarno en las posiciones de nt 262-270 (Figura 1 B; subrayada).

10 Para ensayar si la modificación de este codón de ATG/AUG interno puede evitar la producción del subproducto no deseado, los inventores generaron el plásmido de expresión modificado pSES213. El pSES213 lleva una mutación que cambia el ATG en la posición de codón 92 a TCG, que da como resultado una Serina (Ser; S) en lugar de Metionina (Met; M), como el resto aminoacídico codificado por este codón (véase la Figura 1). De otro modo, el pSES213 es idéntico al pSES212. Se seleccionó Serina para la sustitución de la Metionina porque está presente en la posición equivalente en otras cadenas pesadas de anticuerpos murinos del subgrupo V (13). Además, la Ser y la Met tienen puntos isoeléctricos similares y una longitud similar de sus cadenas laterales.

15 En otra realización de la invención, la modificación del codón 92 de tal modo que esté codificado cualquier aminoácido distinto de Met, o la delección del codón 92 y/o la mutación de la secuencia de los nt 262-270 de tal modo ya no presente similitud con una secuencia de Shine-Dalgarno, o que ya no actúe como una secuencia de Shine-Dalgarno, puede resolver el problema de una forma similar.

Ejemplo 2

20 Expresión de derivados de scFv(FRP5)-ETA en *E. coli*

Procedimiento

Expresión de derivados de scFv(FRP5)-ETA en *E. coli*, preparación de cuerpos de inclusión, solubilización y plegamiento

25 Se transformaron *E. coli* DH5 α con los plásmidos de expresión pSW220-5, pSES212 o pSES213. Se cultivaron cultivos de expresión de un litro (LB, glucosa al 0,5%, kanamicina 50 μ g/ml en el caso de pSES212 o pSES213, o ampicilina 100 μ g/ml en el caso de pSW220-5) a 37°C hasta una DO₆₀₀ de 0,8. Los cultivos se indujeron por adición de IPTG 0,5 mM durante 3 horas. Las células se recogieron por centrifugación (7500 g, 10 min), se resuspendieron en PBS, y se lisaron en una celda de presión francesa. Se recogieron cuerpos de inclusión por centrifugación (10000 g, 10 min, 4°C) y se lavaron por resuspendieron en tampón de lavado (urea 2 M, Tritón X-100 al 2%, NaCl 500 mM en PBS, pH 8) y posterior centrifugación (10000 g, 10 min, 4°C). Se resuspendieron cuerpos de inclusión purificados en tampón de solubilización (urea 8 M, NaCl 500 mM en PBS, pH 8). Después de la centrifugación, las fracciones de sobrenadante se dializaron contra PBS, pH 7,4. Se eliminaron los precipitados por centrifugación (40000 g, 30 min, 4°C) y posterior filtración a través de un filtro de 0,22 μ m. Las proteínas se almacenaron en alícuotas a -80°C.

Resultados

35 Para la producción de derivados de scFv(FRP5)-ETA, se transformaron *E. coli* DH5 α con pSW220-5, pSES212 y pSES213 y se seleccionaron en LB_{Kan} (para pSES212 y pSES213) o placas de agar de LB_{AMP} (para pSW220-5). Se inocularon cultivos de expresión de volumen de 1 l con colonias individuales y se cultivaron y se indujeron como se describe en la sección de Materiales y Procedimientos a continuación. Se resuspendieron sedimentos celulares de estos cultivos en PBS y se lisaron en una celda de presión francesa. Las proteínas scFv (FRP5)-ETA estaban principalmente presentes en las fracciones insolubles de estos lisados (no se muestran los datos). Se recogieron cuerpos de inclusión por centrifugación y se lavaron con tampón que contenía urea 2 M y Tritón X-100 al 2%, antes de su desnaturalización con tampón que contenía urea 8 M. Después de la centrifugación, las fracciones de sobrenadante se renaturalizaron por diálisis contra PBS, y las proteínas renaturalizadas parcialmente purificadas se analizaron mediante SDS-PAGE y posterior tinción con Coomassie (véase la Figura 2A). Las proteínas se indican como scFv(FRP5)-ETA o scFv(FRP5-M92S)-ETA, seguidas del nombre del vector de expresión entre paréntesis [scFv(FRP5)-ETA(220-5), scFv(FRP5)-ETA(212), scFv(FRP5-M92S)-ETA (213)]. Para cada cultivo de expresión, se obtuvieron rendimientos comparables de aproximadamente 30-50 mg de proteína soluble renaturalizada. Como se muestra en la Figura 2A, las preparaciones de proteína scFv(FRP5)-ETA (220-5) y scFv(FRP5)-ETA (212) obtenidas contienen un subproducto principal (flecha rellena), que migra en el SDS-PAGE directamente por debajo de la banda del producto de longitud completa (flecha en blanco). Al contrario, la preparación de scFv(FRP5-M92S)-ETA (213) aislada después del mismísimo protocolo no contenía este subproducto no deseado.

Estos datos demuestran que el intercambio del codón 92 de ATG a TCG, y el resto aminoacídico correspondiente de Metionina a Serina es sorprendentemente necesario y suficiente para evitar completamente la generación del subproducto.

55 Ejemplo 3

Actividad biológica de scFv(FRP5-M92S)-ETA

Procedimiento

Células y Condiciones de Cultivo

Se mantuvieron células de carcinoma renal murino que expresaban de forma estable β -galactosidasa de *E. coli* (Renca-lacZ), o β -galactosidasa y ErbB2 humana (Renca-lacZ/ErbB2) (8) se mantuvieron en medio RPMI 1640 complementado con FBS inactivado por calor al 10%, glutamina 2 mM, penicilina 100 unidades/ml, estreptomycin 100 μ g/ml, Zeocina 0,25 mg/ml (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) y G418 0,48 mg/ml (Renca-lacZ/ErbB2).

Ensayo de viabilidad celular

Se sembraron células en placas de 96 pocillos a una densidad de $1,5 \times 10^4$ células/pocillo en medio de cultivo normal. Se añadieron diferentes concentraciones de proteínas de fusión de scFv(FRP5)-ETA o diluyente a muestras por triplicado, y las células se incubaron durante 48 h a 37°C en CO₂ al 5% y aire humidificado al 95%. Se añadió una alícuota de 10 μ l de MMT 10 mg/ml (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) (Sigma, Deisenhofen, Alemania) en PBS a cada pocillo y las células se incubaron durante otras 3 h. Las células se lisaron por adición de 90 μ l de SDS al 20% en dimetil formamida al 50%, pH 4,7. Después de la solubilización, se cuantificó el desarrollo de color debido a la formación del metabolito de formazán marrón por determinación de la absorbancia a 590 nm en un lector de microplacas. Las muestras sin células sirvieron como blanco.

Resultados

Se evaluó la selectividad y la eficacia de la destrucción de células tumorales mediante derivados de scFv(FRP5)-ETA en ensayos de metabolización de MTT usando células de carcinoma renal murino Renca-lacZ/ErbB2 que expresan ErbB2 humana y células Renca-lacZ negativas para ErbB2 como control (8). Se usó proteína scFv(FRP5)-ETA (220-5) expresada y purificada en paralelo con proteína scFv(FRP5-M92S)-ETA (213) como patrón para ensayar las actividades citotóxicas. Las células diana se incubaron con concentraciones crecientes de las proteínas de fusión durante 48 h. Después de la lisis celular y de la solubilización, se cuantificó la viabilidad celular determinando la absorbancia a 590 nm en un lector de microplacas (Figura 2B). Las muestras sin células sirvieron como blanco. A las concentraciones ensayadas de hasta 10 μ g/ml, las proteínas de fusión de scFv(FRP5)-ETA y scFv(FRP5-M92S)-ETA no tenían efectos sobre la supervivencia de células Renca-lacZ negativas para ErbB2 (Figura 2B). Por el contrario, las proteínas de fusión scFv(FRP5)-ETA y scFv(FRP5-M92S)-ETA destruyeron las células Renca-lacZ/ErbB2 positivas para ErbB2 igual de bien y de una forma dependiente de la concentración (Figura 2B). La Figura 2C representa la actividad de scFv(FRP5-M92S)-ETA respecto a la de scFv(FRP5)-ETA a las diferentes concentraciones ensayadas. Un valor próximo a 1,00 indica que no hay diferencias significativas. Los valores obtenidos demuestran que el scFv(FRP5-M92S)-ETA no es significativamente diferente en sus actividades biológicas del scFv(FRP5)-ETA.

Estos datos demuestran que el intercambio del codón 92 de ATG a TCG y del resto aminoacídico correspondiente de Metionina a Serina sorprendentemente no afecta a las actividades biológicas de scFv(FRP5)-ETA. La actividad antitumoral de scFv(FRP5-M92S)-ETA es indistinguible de la de scFv(FRP5)-ETA. La selectividad por células tumorales que expresan ErbB2 también se conserva.

Las diversas realizaciones de la presente invención descrita en el presente documento pueden combinarse entre sí.

Referencias

1. Wels W, Harwerth IM, Mueller M, Groner B, Hynes NE. Selective inhibition of tumor cell growth by a recombinant single-chain antibody-toxin specific for the erbB-2 receptor. *Cancer Res* 1992; 52: 6310-7.
2. Spyridonidis A, Schmidt M, Bernhardt W, y col. Purging of mammary carcinoma cells during ex vivo culture of CD34+ hematopoietic progenitor cells with recombinant immunotoxins. *Blood* 1998; 91: 1820-7.
3. Schmidt M, McWatters A, White RA, y col. Synergistic interaction between an anti-p185HER-2 Pseudomonas exotoxin fusion protein [scFv(FRP5)-ETA] and ionizing radiation for inhibiting growth of ovarian cancer cells that overexpress HER-2. *Gynecol Oncol* 2001; 80: 145-55.
4. Wels W, Beerli R, Hellmann P, y col. EGF receptor and p185erbB-2-specific single-chain antibody toxins differ in their cell-killing activity on tumor cells expressing both receptor proteins. *Int J Cancer* 1995; 60: 137-44.
5. Azemar M, Schmidt M, Arlt F, y col. Recombinant antibody toxins specific for ErbB2 and EGF receptor inhibit the in vitro growth of human head and neck cancer cells and cause rapid tumor regression in vivo. *Int J Cancer* 2000; 86: 269-75.
6. Wang L, Liu B, Schmidt M, Lu Y, Wels W, Fan Z. Antitumor effect of an HER2-specific antibody-toxin fusion protein on human prostate cancer cells. *Prostate* 2001; 47: 21-8.

7. Altenschmidt U, Schmidt M, Groner B, Wels W. Targeted therapy of schwannoma cells in immunocompetent rats with an erbB2-specific antibody-toxin. *Int J Cancer* 1997; 73: 117-24.
8. Maurer-Gebhard M, Schmidt M, Azemar M, y col. Systemic treatment with a recombinant erbB-2 receptor-specific tumor toxin efficiently reduces pulmonary metastases in mice injected with genetically modified carcinoma cells. *Cancer Res* 1998; 58: 2661-6.
9. Azemar M, Djahansouzi S, Jäger E, y col. Regression of cutaneous tumor lesions in patients intratumorally injected with a recombinant single-chain antibody-toxin targeted to ErbB2/HER2. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 82: 155-64.
10. von Minckwitz G, Harder S, Hövelmann S, y col. Phase I clinical study of the recombinant antibody-toxin scFv(FRP5)-ETA specific for the ErbB2/HER2 receptor in patients with advanced solid malignomas. *Breast Canc* 2005; 7: R617-R26.
11. Wels W, Harwerth IM, Zwickl M, Hardman N, Groner B, Hynes NE. Construction, bacterial expression characterization of a bifunctional single-chain antibody-phosphatase fusion protein targeted to the human erbB-2 receptor. *Biotechnology (N Y)* 1992; 10: 1128-32.
12. Harwerth IM, Wels W, Marte BM, Hynes NE. Monoclonal antibodies against the extracellular domain of the erbB-2 receptor function as partial ligand agonists. *J Biol Chem* 1992; 267: 15160-7.
13. Kabat EA, Wu TT, Perry HM, Gottesman KS, Foeller C Sequences of proteins of immunological interest, 5ª edición, Vol. 1. Washington: U.S. Department of Health and Human Services, 1991.

20 **Secuencias**

SEC ID Nº: 1

Secuencia de aminoácidos del fragmento de anticuerpo scFv(FRP5) optimizado



La posición de aminoácido 92 que se ha optimizado de un resto de Metionina a un resto de Serina está recuadrada

Subrayado: Engarce (aa 121 - 135)

```

1  MQVQLQOSGPELKKPGETVKI SCKASGYPFTNYGMNWVKQAPGQGLKWMG
51  WINTSTGESTFADDFKGRFDFSLETSANTAYLQINNLKSEDSATYFCARW
101  EVYHGYVVPYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQLTQSHKFLSTSV
151  GDRVSITCKASQDVYNAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASSRYTGVPSRFTGS
201  GSGPDFTFTISSVQAEDLAVYFCQQHFRTPPFTFGSGTKLEIK
    
```

SEC ID Nº: 2

Secuencia de nucleótidos que codifica el fragmento de anticuerpo scFv(FRP5) optimizado

TCG

Los nucleótidos que codifican la posición de aminoácido 92 optimizada, que codifican aquí el aminoácido Serina, están recuadrados

```

1 ATGCAGGTACAACCTGCAGCAGTCAGGACCTGAACTGAAGAAGCCTGGAGA
51 GACAGTCAAGATCTCCTGCAAGGCCCTCTGGGTATCCTTTCACAAACTATG
101 GAATGAACTGGGTGAAGCAGGCTCCAGGACAGGGTTTAAAGTGGATGGGC
151 TGGATTAACACCTCCACTGGAGAGTCAACATTTGCTGATGACTTCAAGGG
201 ACGGTTTACTTCTCTTTGGAAACCTCTGCCAACACTGCCTATTTGCAGA
251 TCAACAACCTCAAAAAGTGAAGACTCGGCTACATATTTCTGTGCAAGATGG
301 GAGGTTTACCACGGCTACGTTCCCTTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCAC
351 CGTTTCTCTGGCGGTGGCGGTTCTGGTGGCGGTGGCTCCGGCGGTGGCG
401 GTTCTGACATCCAGCTGACCCAGTCTCACAAATTCCTGTCCACTTCAGTA
451 GGAGACAGGGTCAGCATCACCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGTATAATGC
501 TGTTGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAACTTCTGATTT
551 ACTCGGCATCCTCCCGGTACACTGGAGTCCCTTCTCGCTTCACTGGCAGT
601 GGCTCTGGGCCGGATTTCACTTTACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGA
651 CCTGGCAGTTTATTTCTGTGTCAGCAACATTTTCGTACTCCATTTCACGTTTCG
701 GCTCGGGGACAAAATTGGAGATCAAA
    
```

SEC ID Nº: 3

5 Secuencia de aminoácidos de scFv(FRP5)-ETA (213)

S

La posición de aminoácido 92 que se ha optimizado de un resto de Metionina a un resto de Serina está recuadrada

Negrita Dominio de anticuerpo (aa 2-242)

Subrayado Engarce (aa 121-135)

En cursiva Dominio de ETA (aa 245-606 en esta secuencia, correspondientes a los aa 252-613 de la secuencia de tipo silvestre de ETA;)

```

1 MQVQLQQSGPELKKPGETVVKISCKASGYPFITNYGMNWKQAPGQGLKWMG
51 WINTSTGESTFADDFKGRFDFSLETSANTAYLQINNLKSEDSSATYFCARW
101 EVYHGYPYWGQGTTVTVSSGGGSGGGGSDIQLTQSHKFLSTSV
151 GDRVSITKASQDVYNAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASSRYTGVPSRFTGS
201 GSGPDFFTTISSSVQAEDLAVYFCQQHFRTPFTFGSGTKLEIKALEGGSLA
251 ALTAHQACHLPLETFTRHRQPRGWEQLEQCGYPVQRLVALYLAARLSWNQ
301 VDQVIRNALASPGSGDLGEAIREQPEQARLALTLAAESERFVRQGTGN
351 DEAGAASADVVSLTCPVAAAGCAGPADSGDALLERNYPTGAEFLGDGGDV
401 SFSTRGTQNWTVERLLQAHRQLEERGYVFVGYHGTFLEAAQSIVFGGVRA
451 RSQDLDAIWRGFYIAGDPALAYGYAQDQEPDARGRIRNGALLRVYVPRSS
501 LPGFYRTGLTLAPEAAGEVERLIGHPLPLRLDAITGPEEEGGRLETILG
551 WPLAERTVVIPSAIPTDPRNVGGDLDPSSIPDKEQAISALPDYASQPGKP
601 PREDLK* 606
    
```

SEC ID Nº: 4

Secuencia de nucleótidos que codifica scFv(FRP5)-ETA (213)

TCG

Los nucleótidos que codifican la posición de aminoácido 92 optimizada, que codifican aquí

el aminoácido Serina, están recuadrados

1 ATGCAGGTACAACTGCAGCAGTCAGGACCTGAACTGAAGAAGCCTGGAGA
 51 GACAGTCAAGATCTCCTGCAAGGCCTCTGGGTATCCTTTCACAAACTATG
 101 GAATGAACTGGGTGAAGCAGGCTCCAGGACAGGGTTTAAAGTGGATGGGC
 151 TGGATTAACACCTCCACTGGAGAGTCAACATTTGCTGATGACTTCAAGGG
 201 ACGGTTTGACTTCTCTTTGGAAACCTCTGCCAACACTGCCTATTTGCAGA
 251 TCAACAACCTCAAAAGTGAAGAC**TCG**GCTACATATTTCTGTGCAAGATGG
 301 GAGGTTTACCACGGCTACGTTTCCTTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCAC
 351 CGTTTCCCTCTGGCGGTGGCGGTTCTGGTGGCGGTGGCTCCGGCGGTGGCG
 401 GTTCTGACATCCAGCTGACCCAGTCTCACAAATTCCTGTCCACTTCAGTA
 451 GGAGACAGGGTCAGCATCACCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGTATAATGC
 501 TGTTGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAACTTCTGATTT
 551 ACTCGGCATCCTCCCGGTACACTGGAGTCCCTTCTCGCTTCACTGGCAGT
 601 GGCTCTGGGCCGGATTTCACTTTCACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGA
 651 CCTGGCAGTTTATTTCTGTGCAACATTTTCGTACTCCATTACGTT**CG**
 701 GCTCGGGGACAAAATGGAGATCAAAGCTCTAGAGGGCGGCAGCCTGGCC
 751 GCGCTGACCGCGCACCCAGGCTGCCACCTGCCGCTGGAGACTTTCACCCG
 801 TCATCGCCAGCCGCGCGGCTGGGAACA**ACTGGAGCAGTGC**GGCTATCCGG
 851 TGCAGCGGCTGGT**CGCCCTCTACCTGGCGGCG**CGACTGTCATGGAA**CCAG**
 901 GTCGACCAGGTGATCCGCAACGCCCTGGCCAGCCCCGGCAGCGGCGGCGA

951 CCTGGGCGAAGCGATCCGCGAGCAGCCGGAGCAGGCCCGTCTGGCCCTGA
 1001 CCCTGGCCGCGCCGAGAGCGAGCGCTTCGTCCGGCAGGGCACC**GGCAAC**
 1051 GACGAGGCCGGCGCGGCCAGCGCCGACGTGGTGAGCCTGACCTGCCCGGT
 1101 CGCCGCCGGTGAATGCGCGGGCCCCGGCGGACAGCGGCGACGCCCTGCTGG
 1151 AGCGCAACTATCCCACTGGCGCGGAGTTCCTCGGCGACGGTGGCGACGTC
 1201 AGCTTCAGCACCCGCGGCACGCAGA**ACTGGACGGTGGAGCGGCTGCTCCA**
 1251 GCGCACCCGCCAACTGGAGGAGCGCGGCTATGTGTT**CGT**CGGCTACCACG
 1301 GCACCTTCCCTCGAAGCGGGCGAAAGCATCGTCTT**CGGCGGGT**GCGCGCG
 1351 CGCAGCCAGGATCTCGACCGATCTGGCGCGGTTTCTATATCGCCGGCGA
 1401 TCCGGCGCTGGCCTACGGCTACGCCAGGACCAGGAACCCGACGCGCGCG
 1451 GCCGGATCCGCAACGGTGCCTGCTGCGGGTCTATGTG**CCGCGCTCGAGC**
 1501 CTGCCGGGCTTCTACCGCACCGGCCTGACCCTGGCCGCGCCGGAGGGCGGC
 1551 GGGCGAGGTCGAACGGCTGATCGGCCATCCGCTGCCGCTGCGCCTGGAGC
 1601 CCATCACCGGCCCCGAGGAGGAAGGCGGGCGCCTGGAGACCATTCTCGGC
 1651 TGGCCGCTGGCCGAGCGCACCGTGGTGATTCCTCGGCGATCCCCACCGA
 1701 CCCGCGCAACGTGCGCGGCGACCTCGACCCGTCCAGCATCCCCGACAAGG
 1751 AACAGGCGATCAGCGCCCTGCCGACTACGCCAGCCAGCCCCGGCAAACCG
 1801 CCGCGCGAGGACCTGAAG**TAA 1821**

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Topo Target Alemania AG
- 5 <120> Secuencia de ADN y proteína optimizada de un anticuerpo para mejorar la calidad y el rendimiento de proteínas de fusión con anticuerpos expresadas en bacterias
- <130> zemab
- 10 <160> 12
- <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- 15 <211> 242
- <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- <220>
- 20 <223> fragmento de anticuerpo scFv(FRP5) optimizado con M92S
- <400> 1

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

Ile Lys

<210> 2

5

<211> 726

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia codificante del fragmento de anticuerpo scFv(FRP5) optimizado

<400> 2

```

atgcaggtag aactgcagca gtcaggacct gaactgaaga agcctggaga gacagtcaag    60
atctcctgca aggcctctgg gtatcctttc acaaactatg gaatgaactg ggtgaagcag    120
gctccaggac agggtttaaa gtggatgggc tggattaaca cctccactgg agagtcaaca    180
tttgctgatg acttcaaggg acggtttgac ttctctttgg aaacctctgc caaactgcc    240
tatttgcaga tcaacaacct caaaagtga gactcggcta catatttctg tgcaagatgg    300
gaggtttacc acggctacgt tccttactgg ggccaagggg ccacggtcac cgtttctctt    360
ggcggtgggc gttctggtgg cggtggtctc ggcggtgggc gttctgacat ccagctgacc    420
cagtctcaca aattcctgtc cacttcagta ggagacaggg tcagcatcac ctgcaaggcc    480
agtcaggatg tgtataatgc tgttgcctgg tatcaacaga aaccaggaca atctcctaaa    540
cttctgattt actcggcatc ctcccggtag actggagtcc cttctcgctt cactggcagt    600
ggctctgggc cggatttcac tttcaccatc agcagtgtgc aggctgaaga cctggcagtt    660
tatttctgtc agcaacattt tcgtactcca ttcacgttcg gctcggggac aaaattggag    720
atcaaa                                         726
    
```

5

<210> 3

<211> 606

<212> PRT

10

<213> secuencia artificial

<220>

<223> scFv(FRP5)-ETA (213)

15

<400> 3

```

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

Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Pro Phe Thr Asn
          20           25           30
    
```

Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp
 35 40 45
 Met Gly Trp Ile Asn Thr Ser Thr Gly Glu Ser Thr Phe Ala Asp Asp
 50 55 60
 Phe Lys Gly Arg Phe Asp Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Asn Thr Ala
 65 70 75 80
 Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Ser Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Phe
 85 90 95
 Cys Ala Arg Trp Glu Val Tyr His Gly Tyr Val Pro Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 115 120 125
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser His Lys
 130 135 140
 Phe Leu Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala
 145 150 155 160
 Ser Gln Asp Val Tyr Asn Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 165 170 175
 Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Ser Arg Tyr Thr Gly
 180 185 190
 Val Pro Ser Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Pro Asp Phe Thr Phe
 195 200 205
 Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln
 210 215 220
 Gln His Phe Arg Thr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu
 225 230 235 240
 Ile Lys Ala Leu Glu Gly Gly Ser Leu Ala Ala Leu Thr Ala His Gln
 245 250 255
 Ala Cys His Leu Pro Leu Glu Thr Phe Thr Arg His Arg Gln Pro Arg
 260 265 270
 Gly Trp Glu Gln Leu Glu Gln Cys Gly Tyr Pro Val Gln Arg Leu Val
 275 280 285
 Ala Leu Tyr Leu Ala Ala Arg Leu Ser Trp Asn Gln Val Asp Gln Val
 290 295 300
 Ile Arg Asn Ala Leu Ala Ser Pro Gly Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu
 305 310 315 320

Ala Ile Arg Glu Gln Pro Glu Gln Ala Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala
 325 330 335

Ala Ala Glu Ser Glu Arg Phe Val Arg Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu
 340 345 350

Ala Gly Ala Ala Ser Ala Asp Val Val Ser Leu Thr Cys Pro Val Ala
 355 360 365

Ala Gly Glu Cys Ala Gly Pro Ala Asp Ser Gly Asp Ala Leu Leu Glu
 370 375 380

Arg Asn Tyr Pro Thr Gly Ala Glu Phe Leu Gly Asp Gly Gly Asp Val
 385 390 400

Ser Phe Ser Thr Arg Gly Thr Gln Asn Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu
 405 410 415

Gln Ala His Arg Gln Leu Glu Glu Arg Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr
 420 425 430

His Gly Thr Phe Leu Glu Ala Ala Gln Ser Ile Val Phe Gly Gly Val
 435 440 445

Arg Ala Arg Ser Gln Asp Leu Asp Ala Ile Trp Arg Gly Phe Tyr Ile
 450 455 460

Ala Gly Asp Pro Ala Leu Ala Tyr Gly Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro
 465 470 475 480

Asp Ala Arg Gly Arg Ile Arg Asn Gly Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val
 485 490 495

Pro Arg Ser Ser Leu Pro Gly Phe Tyr Arg Thr Gly Leu Thr Leu Ala
 500 505 510

Ala Pro Glu Ala Ala Gly Glu Val Glu Arg Leu Ile Gly His Pro Leu
 515 520 525

Pro Leu Arg Leu Asp Ala Ile Thr Gly Pro Glu Glu Glu Gly Gly Arg
 530 535 540

Leu Glu Thr Ile Leu Gly Trp Pro Leu Ala Glu Arg Thr Val Val Ile
 545 550 555 560

Pro Ser Ala Ile Pro Thr Asp Pro Arg Asn Val Gly Gly Asp Leu Asp
 565 570 575

Pro Ser Ser Ile Pro Asp Lys Glu Gln Ala Ile Ser Ala Leu Pro Asp
 580 585 590

Tyr Ala Ser Gln Pro Gly Lys Pro Pro Arg Glu Asp Leu Lys
 595 600 605

<210> 4

<211> 1821

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

5

<223> secuencia codificante de scFv(FRP5)-ETA (213)

<400> 4

atgcaggtag aactgcagca gtcaggacct gaactgaaga agcctggaga gacagtcaag 60
 atctcctgca aggcctctgg gtatcctttc acaaactatg gaatgaactg ggtgaagcag 120
 gctccaggac agggtttaaa gtggatgggc tggattaaca cctccactgg agagtcaaca 180
 tttgctgatg acttcaaggg acggtttgac ttctctttgg aaacctctgc caaactgccc 240
 tatttgcaga tcaacaacct caaaagtga gactcggcta catatttctg tgcaagatgg 300
 gaggtttacc acggctacgt tccttactgg ggccaagggg ccacggtcac cgtttctctt 360
 ggcggtggcg gttctgggtg cggtggctcc ggcggtggcg gttctgacat ccagctgacc 420
 cagtctcaca aattcctgtc cacttcagta ggagacaggg tcagcatcac ctgcaaggcc 480
 agtcaggatg tgtataatgc tgttgcctgg tatcaacaga aaccaggaca atctcctaaa 540
 cttctgattt actcggcatc ctcccgttac actggagtcc cttctcgctt cactggcagt 600
 ggctctgggc cggatttcac tttcaccatc agcagtgtgc aggctgaaga cctggcagtt 660
 tatttctgtc agcaacattt tcgtactcca ttcacgttcg gctcggggac aaaattggag 720
 atcaaagctc tagagggcgg cagcctggcc gcgctgaccg cgcaccaggc ctgccacctg 780
 ccgctggaga ctttcacccg tcatcgccag ccgcgcggtt ggaacaact ggagcagtgc 840
 ggctatccgg tgcagcggct ggctgcccctc tacctggcgg cgcgactgtc atggaaccag 900
 gtcgaccagg tgatccgcaa cgccctggcc agccccggca gcggcggcga cctgggcgaa 960
 gcgatccgcy agcagccgga gcaggcccgt ctggcccctga ccctggccgc cgccgagagc 1020
 gagcgcttcg tccggcaggg caccggcaac gacgaggccg gcgcgggccag cgccgacgtg 1080
 gtgagcctga cctgcccggg cgccgcccgg gaatgcgcgg gcccgccgga cagcggcgac 1140
 gccctgctgg agcgcaacta tcccactggc gcggagtcc tcggcgacgg tggcgacgtc 1200
 agcttcagca cccgcgccac gcagaactgg acggtggagc ggctgctcca ggcgcaccgc 1260
 caactggagg agcgcggcta tgtgttcgtc ggctaccacg gcaccttctt cgaagcggcg 1320
 caaagcatcg tcttcggcgg ggtgcgcgcg cgagccagg atctcgacgc gatctggcgc 1380
 ggtttctata tcgccggcga tccggcgctg gcctacggct acgcccagga ccaggaacct 1440
 gacgcgcgcy gccggatccg caacggtgcc ctgctgcggg tctatgtgcc gcgctcgagc 1500
 ctgcccggct tctaccgac cgccctgacc ctggccgcgc cggaggcggc gggcgaggtc 1560
 gaacggctga tcggccatcc gctgcccgtg cgctggagc ccatcaccgg ccccgaggag 1620
 gaaggcgggc gcctggagac cattctcggc tggccgctgg ccgagcgcac cgtggtgatt 1680
 ccctcggcga tccccaccga cccgcgcaac gtcggcgggc acctcgacc gtccagcatc 1740
 cccgacaagg aacaggcgat cagcgccttg ccggactacg ccagccagcc cggcaaaccg 1800

<210> 5

<211> 39

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>
 <223> cebador 5'Ndel-scFv(FRP5)

5 <400> 5
 cgattagcat atgcaggtac aactgcagca gtcaggacc 39

<210> 6
 <211> 27

10 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> cebador 3'Xbal-scFv(FRP5)

15 <400> 6
 gctgccgccc tctagagctt tgatctc 27

<210> 7
 <211> 36

20 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

<220>

25 <223> cebador pSES212_M92S_con sentido

<400> 7
 cctcaaaagt gaagactcgg ctacatatt ctgtgc 36

<210> 8
 <211> 36

30 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

<220>

35 <223> cebador pSES212_M92s_antisentido

<400> 8
 gcacagaaat atgtagccga gtcttcactt ttgagg 36

5 <210> 9
 <211> 99
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

10 <220>
 <223> secuencia de aminoácidos N-terminal de scFv(FRP5) que tiene Met en posición 92

<400> 9

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

20 <210> 10
 <211> 297
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> ADN que codifica la SEC ID N°: 9

25 <400> 10

atgcaggtac aactgcagca gtcaggacct gaactgaaga agcctggaga gacagtcaag 60
atctcctgca aggcctctgg gtatcctttc acaaactatg gaatgaactg ggtgaagcag 120
gctccaggac agggtttaaa gtggatgggc tggattaaca cctccactgg agagtcaaca 180
tttgctgatg acttcaaggg acggtttgac ttctctttgg aaacctctgc caaactgcc 240
tatttgcaga tcaacaacct caaaagtgaa gacatggcta catatttctg tgcaaga 297

- 5 <210> 11
- <211> 242
- <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> fragmento de anticuerpo scFv(FRP5)
- <220>
- <221> MIS_FEATURE
- <222> (92)..(92)
- 15 <223> xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural, o cualquier aminoácido de origen no natural, o cualquier aminoácido modificado, o puede estar ausente, con la condición de que Xaa no sea metionina
- <400> 11

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

<210> 12

<211> 241

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> fragmento de anticuerpo scFv(FRP5) en el que se delecionó la M92

5

<400> 12

Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly
1 5 10 15
Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Pro Phe Thr Asn
20 25 30
Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp
35 40 45

Met Gly Trp Ile Asn Thr Ser Thr Gly Glu Ser Thr Phe Ala Asp Asp
50 55 60

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

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

Ala Arg Trp Glu Val Tyr His Gly Tyr Val Pro Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser His Lys Phe
130 135 140

Leu Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser
145 150 155 160

Gln Asp Val Tyr Asn Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
165 170 175

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Ser Arg Tyr Thr Gly Val
180 185 190

Pro Ser Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Pro Asp Phe Thr Phe Thr
195 200 205

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln
210 215 220

His Phe Arg Thr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile
225 230 235 240

Lys

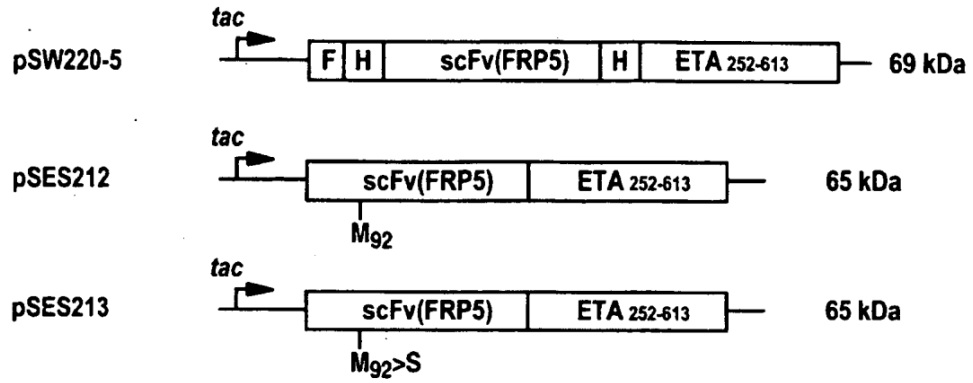
REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido que comprende una primera secuencia de aminoácidos que comprende los aminoácidos 2-120 de la SEC ID N°: 11 y una segunda secuencia de aminoácidos que comprende los aminoácidos 136-242 de la SEC ID N°: 11, en el que dicha primera secuencia de aminoácidos y dicha segunda secuencia de aminoácidos están unidas por un grupo espaciador peptídico.
2. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha primera secuencia de aminoácidos comprende los aminoácidos 2-120 de la SEC ID N°: 1.
3. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que dicha primera secuencia de aminoácidos consiste en los aminoácidos 1-120 de la SEC ID N°: 1.
- 10 4. Un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEC ID N°: 11 y SEC ID N°: 1 y SEC ID N°: 12.
5. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además una molécula efectora.
- 15 6. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la molécula efectora es un polipéptido que tiene actividad de destrucción celular.
7. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el polipéptido que tiene actividad de destrucción celular es una toxina o una variante biológicamente activa de la misma.
8. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la toxina es exotoxina de *Pseudomonas* o una variante biológicamente activa de la misma.
- 20 9. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N°: 3.
10. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la molécula efectora es una entidad química que tiene actividad de destrucción celular.
- 25 11. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la entidad química que tiene actividad de destrucción celular se selecciona del grupo que consiste en fármacos quimioterápicos, compuestos citotóxicos y compuestos citostáticos.
12. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la entidad química que tiene actividad de destrucción celular es una sustancia radiactiva.
13. Un polinucleótido que codifica un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
- 30 14. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 13, que comprende la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC ID N°: 2.
15. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 14, que comprende la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC ID N°: 4.
- 35 16. Un plásmido o un vector que contiene el polinucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, unido operativamente a una o más secuencias de control de la expresión.
17. El plásmido o vector de acuerdo con la reivindicación 16, que contiene además un origen de replicación o una secuencia de replicación autónoma, una o más secuencias marcadoras y, opcionalmente, sitios de restricción adicionales.
18. Una célula huésped transformada con el plásmido o vector de acuerdo con la reivindicación 16 ó 17.
- 40 19. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 18, en la que dicha célula huésped es una célula de *E. coli*.
20. Un procedimiento para la preparación de un anticuerpo de cadena sencilla recombinante o un fragmento del mismo, que comprende cultivar una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 18 ó 19 en condiciones adecuadas y recuperar el anticuerpo de cadena sencilla recombinante o fragmento del mismo.
- 45 21. El uso de un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 o de un polinucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, para la fabricación un medicamento para el tratamiento de un trastorno que implica una actividad y/o expresión anormal de ErbB2.
22. El uso de acuerdo con la reivindicación 21, en el que el trastorno a tratar es un cáncer

- 5 .23. El uso de acuerdo con la reivindicación 22, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, carcinoma de células escamosas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer pulmonar no microcítico, cáncer de páncreas, cáncer gástrico, cáncer de glándulas salivares, tumores parotídeos, melanoma, carcinoma cervical, cáncer de páncreas, cáncer de colon y colorrectal, cáncer de vejiga, meduloblastoma, cáncer de riñón, cáncer de hígado y cáncer de estómago.
24. Un procedimiento para mejorar la producción de un anticuerpo recombinante de cadena sencilla dirigido contra el dominio extracelular de la tirosina quinasa receptora ErbB2, que comprende impedir el inicio de la traducción a partir del codón N° 92 de la SEC ID N°: 10.
- 10 25. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 24, que comprende modificar en un polinucleótido que comprende la SEC ID N°: 10 uno o más nucleótidos en las posiciones 262-270 de la SEC ID N°: 10.
26. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 24, que comprende sustituir el codón N° 92 en la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 10 con un codón que codifique un aminoácido distinto de metionina.
27. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 26, **caracterizado porque** el aminoácido distinto de metionina es serina.
- 15 28. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 24, que comprende delecionar el codón N° 92.

Figura 1

A



B

```

1/1          31/11
ATG CAG GTA CAA CTG CAG CAG TCA GGA CCT GAA CTG AAG AAG CCT GGA GAG ACA GTC AAG
M  Q  V  Q  L  Q  Q  S  G  P  E  L  K  K  P  G  E  T  V  R
61/21
ATC TCC TGC AAG GCC TCT GGG TAT CCT TTC ACA AAC TAT GGA ATG AAC TGG GTG AAG CAG
I  S  C  K  A  S  G  Y  P  F  T  N  Y  G  M  N  W  V  K  Q
121/41
GCT CCA GGA CAG GGT TTA AAG TGG ATG GGC TGG ATT AAC ACC TCC ACT GGA GAG TCA ACA
A  P  G  Q  G  L  K  W  M  G  W  I  N  T  S  T  G  E  S  T
181/61
TTT GCT GAT GAC TTC AAG GGA CGG TTT GAC TTC TCT TTG GAA ACC TCT GCC AAC ACT GCC
F  A  D  D  F  K  G  R  F  D  F  S  L  E  T  S  A  N  T  A
241/81
TAT TTG CAG ATC AAC AAC CTC AAA AGT GAA GAC ATG GCT ACA TAT TTC TGT GCA AGA ...
Y  L  Q  I  N  N  L  K  S  E  D  M  A  T  Y  F  C  A  R  ...
    
```

pSES212 pSES213
 ATG > TCG
 M > S

Figura 2

