



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 022**

51 Int. Cl.:
C07K 19/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 14/195 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04819218 .1**
96 Fecha de presentación : **25.11.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1694709**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.08.2006**

54 Título: **Inmunotoxinas anti-CD64-ETA'recombinantes.**

30 Prioridad: **26.11.2003 EP 03027161**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.05.2011

73 Titular/es: **Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung
der Angewandten Forschung e.V.
Hansastraße 27C
80686 München, DE**

72 Inventor/es: **Huhn, Michael;
Fischer, Rainer;
Tur, Mehmet Kemal;
Thepen, Theo y
Barth, Stefan**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 358 022 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

Inmunotoxinas anti-CD64-ETA' recombinantes

Campo Técnico

5 La presente invención se refiere, en general, al tratamiento de enfermedades que implican CD64 y, más específicamente, a la preparación y uso de complejos recombinantes que contienen ligandos específicos de CD64, que inducen la internalización del complejo después de la unión, y también a agentes citotóxicos para alterar la función, expresión génica o viabilidad de una célula de un modo terapéutico.

Antecedentes de la invención

10 Los medicamentos disponibles actualmente para el tratamiento de una amplia diversidad de enfermedades, tales como agentes quimioterapéuticos, corticoesteroides y agentes inmunosupresores inespecíficos, tienen la desventaja de inducir potencialmente cierta lesión general, debido a su no especificidad relativa. Se ha intentado moderar esto mediante diversos conceptos terapéuticos. Una estrategia alternativa es el uso de agentes inmunoterapéuticos para aumentar la especificidad de los
15 medicamentos. Esta estrategia se ha descrito especialmente para el tratamiento de tumores.

Si el agente inmunoterapéutico es una inmunotoxina, entonces un anticuerpo monoclonal (Acmo) o un fragmento de anticuerpo, que tiene una afinidad específica, por ejemplo, por marcadores de superficie de células tumorales, se acopla a un reactivo citotóxico. Como reactivos citotóxicos se han usado toxinas y radiactividad. Se consiguió un efecto terapéutico directo sobre las células diana con anticuerpos unidos a elementos radiactivos o toxinas para formar los denominados radioinmunoconjugados o inmunotoxinas (IT). Cuando se usaron Acmo anti-linfocitos B marcados radiactivamente con linfomas de linfocitos B se observaron regresiones del tumor e incluso remisiones completas (1). Por el contrario, los resultados con Acmo contra tumores sólidos fueron más bien desilusionantes. El tamaño relativamente grande de las IT usadas en estos estudios parece interferir
20 con su capacidad de penetrar en los tumores y convierte las mismas en productos terapéuticos ineficaces. La baja tasa de penetración en tumor planteó un problema desafiante particular para tumores mal vascularizados. Para obtener una mejor penetración tisular y en tumor y en general propiedades de difusión mejoradas se miniaturizaron las IT. También se especuló que estas IT más pequeñas serían menos inmunógenas debido al tamaño reducido de los determinantes antigénicos (2). Por lo tanto, se conjugaron fragmentos de anticuerpo escindidos proteolíticamente (miniaturizados) con las funciones efectoras que se han mencionado anteriormente (elementos radiactivos o toxinas).

Las técnicas de clonación mejoradas permitieron la preparación de IT completamente recombinantes: regiones codificantes de regiones variables de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina, amplificadas mediante reacción en cadena de la polimerasa, se unieron entre sí mediante un engarce sintético, por ejemplo, (Gly₄Ser)₃. Después, el fragmento de cadena sencilla resultante de genes de región variable (scFv) se fusionó genéticamente con una región codificante de una enzima catalíticamente activa incluyendo proteínas o polipéptidos citotóxicamente activos (3).
35

Los venenos celulares peptídicos que se han usado más frecuentemente hasta la fecha y, por lo tanto, mejor caracterizados, son las toxinas bacterianas toxina de la difteria (DT), exotoxina A de *Pseudomonas* (PE) y la Ricina A procedente de planta (4) El mecanismo de la actividad citotóxica es esencialmente el mismo en todas estas toxinas a pesar de sus diferentes fondos evolutivos. El dominio catalítico inhibe la biosíntesis de la proteína mediante modificación directa del factor de elongación 2 (EF-2), que es importante para la traducción, o mediante la inactivación del sitio de unión a EF-2 en la subunidad 28S-ARNr de ribosomas.
40

En la mayoría de las construcciones empleadas hasta la fecha, la aplicación sistémica de inmunotoxinas da como resultado efectos secundarios más o menos graves. Además del síndrome de la "permeabilidad vascular" también tienen lugar trombocitopenia, hemólisis, insuficiencia renal y náuseas, dependiendo de la construcción empleada y la dosificación aplicada (4). También se observó lesión hepática dependiente de la dosis (5). Además de los efectos secundarios documentados, la inmunogenicidad de las construcciones es uno de los problemas clave de la inmunoterapia. Esto se aplica, en particular, a la defensa humoral contra los dominios catalíticos empleados, tales como ricina (HARA), PE o DT (2). En teoría, todas las estructuras no humanas pueden provocar una respuesta inmune. Por tanto, la administración repetida de inmunotoxinas e inmunoconjugados está limitada. Una consecuencia lógica de estos problemas es el desarrollo de inmunotoxinas humanas.
45

Hasta la fecha, las toxinas humanas usadas en inmunotoxinas se han seleccionado en la mayoría de los casos de ribonucleasas (6). Ya que las ARNasas humanas están presentes en líquidos
50

extracelulares, plasma y tejidos, se consideran menos inmunógenas cuando se usan en inmunotoxinas. La angiogenina (ANG), una proteína de 14 kDa que tiene una homología de secuencia del 64% con la ARNasa A, se aisló por primera vez de un medio acondicionado para células tumorales, donde se descubrió debido a su capacidad de inducir la angiogénesis (7). Se mostró que la actividad de ARNasa específica de ARN-t de la Angiogenina tiene un potencial citotóxico. De acuerdo con esto, las inmunotoxinas conjugadas químicamente mostraron posteriormente una actividad tóxica específica de células. Para evaluar la eficacia de inmunotoxinas basada en ANG se construyeron diferentes conformaciones de ANG con, por ejemplo, factor de crecimiento epidérmico (EGF) o ligando CD30 y se ensayaron exitosamente *in vitro* (8). Otro miembro de la superfamilia de ARNasa es la neurotoxina eosinofílica (EDN). Para la EDN, que tiene un tamaño de 18,4 kDa, solamente se ha descrito la neurotoxicidad directa hasta la fecha. Basándose en la potencia documentada se han construido diferentes inmunotoxinas basadas en EDN y se han ensayado exitosamente *in vitro* (9).

Muy recientemente se mostró que proteasas tales como granzima B o derivados de la misma pueden cumplir eficazmente la función efectora de inmunotoxinas (documento PCT/EP01/04514).

La CD64 es una glucoproteína de superficie celular de 72 kDa que se expresa normalmente en monocitos/macrófagos y células dendríticas (10). Las funciones biológicas medidas por este receptor incluyen producción de superóxido y citocina (TNF- α , IL-1, IL-6), citotoxicidad, endocitosis/fagocitosis y soporte de presentación de antígenos. Este receptor representa una diana apropiada para inmunoterapia de tumores malignos hematológicos debido a que no está presente en células madre, garantizando de este modo la regeneración de células efectoras inmunes positivas a CD64 normales (11).

El objetivo final en el tratamiento de pacientes con cáncer es la eliminación de cada célula tumoral. Los pacientes con leucemia mieloide aguda (AML) tiene un total de 10^{12} a 10^{13} células malignas en el momento del diagnóstico. Por definición se consigue la remisión completa después de la terapia tan pronto como sean detectables menos del 5% de células malignas en la médula ósea. Sin embargo, estos pacientes todavía pueden llevar hasta 10^{10} células malignas en el torrente sanguíneo en ese momento. Estas células residuales mínimas clínicamente no identificables son la causa más común de recidiva (12). A pesar de los avances en la poliquimio- y radioterapia sólo aproximadamente el 20%-30% de los pacientes con AML consiguen la supervivencia sin enfermedad a largo plazo después de la terapia de primera línea. Por tanto, la eliminación de enfermedad residual mínima (MRD) puede mejorar el resultado de pacientes con AML. Las estrategias selectivas, que incluyen terapias basadas en anticuerpos, que dirigen agentes citotóxicos a estas células, pueden ofrecer una herramienta prometedora para la eliminación específica de MRD. Para mejorar la actividad antitumoral de anticuerpos nativos se han conjugado fármacos, isótopos y toxinas con anticuerpos monoclonales (13).

Recientemente, una inmunotoxina anti-CD64 unida químicamente mostró una unión rápida a e internalización eficaz en células de leucemia positivas a CD64 *in vitro* e *in vivo* (14). Los autores documentaron la regresión rápida del tumor de masas tumorales que variaban del 85% a > 90% en un modelo de AML humana en ratones NOD/SCID. El obstáculo principal observado en este y otros experimentos fueron toxicidades inespecíficas, relacionadas principalmente con el síndrome de permeabilidad vascular inducido por toxinas unidas químicamente basadas en Ricina A debido a su unión inespecífica a células epiteliales (13-15).

El problema asociado con inmunotoxinas unidas químicamente usadas actualmente es su toxicidad inespecífica, tamaño y composición, dando como resultado una eficacia reducida del agente terapéutico.

A diferencia de Sera y col., 2001 (15) se desvela que aumentando la valencia del ligando de unión se consigue un aumento significativo en la citotoxicidad *in vivo* de la inmunotoxina en un modelo de ratón de inflamación crónica. Las inmunotoxinas bivalentes también se pueden usar en el campo del tratamiento de enfermedades (malignas), tales como leucemia mieloide aguda, artritis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC); incluyendo, por ejemplo: enfisema, asma intrínseca y extrínseca, enfermedad cutánea que incluye, por ejemplo: dermatitis atópica, erupción polimorfa lumínica, lupus eritematoso sistémico (LES) o enfermedades autoinmunes, por ejemplo: injerto contra huésped, esclerosis múltiple, síndrome de activación de macrófagos, artritis reumatoide, artritis juvenil, enfermedades intestinales; que incluyen, por ejemplo: enfermedad de Crohn, enfermedad intestinal crónica.

R. K. Zhoug en JOURNAL OF HEMATOTHERAPY & STEM CELL RESEARCH 10: 95-105 (2001) desvelan que los blastocitos de pacientes con leucemia mieloide aguda (AML) expresan de forma común CD64, el receptor de alta afinidad para inmunoglobulina G (Fc γ RI). Se construyó una

inmunotoxina (MDX-44) acoplado anticuerpo monoclonal (Acm) anti-CD64 humanizado H22 mediante un engarce bivalente a la cadena de ricina A desglucosilada (RA). Se incubaron líneas celulares de leucemia humana con MDX-44 o H22/sin RA. El efecto de MDX-44 sobre la proliferación de células de leucemia se evaluó mediante incorporación de [³H]timidina. En presencia de interferón- γ (IFN- γ), MDX-44 inhibió significativamente la proliferación de células HL-60, NB4 y U937 CD64⁺ en cultivos de 72 h de un modo dependiente de la dosis. El mecanismo de acción pareció ser la inducción de la apoptosis medida mediante tinción con yoduro de propidio y análisis de citometría de flujo. Sin embargo, las células KG-1a y Daudi CD64⁻ no se vieron afectadas por MDX-44/IFN- γ . La incubación de células HL-60 con MDX-44/IFN- γ dio como resultado una disminución del 99% en unidades formadoras de colonias, mientras que las células formadoras de colonias en médula ósea normal no se suprimieron significativamente por tal tratamiento. Las células del 60% de los pacientes con AML (6/10) se inhibieron por MDX-44/IFN- γ y la inhibición estaba correlacionada con la expresión de CD64 en estas células ($r = 0,65$). En un modelo de AML humana en ratones NOD/SCID, MDX-44/IFN- γ inhibió el 95-98% de la proliferación de células de AML de exudado peritoneal y el 85-90% de masas de leucemia sólidas. El efecto de MDX-44 sobre células AML era dependiente de la activación de células por IFN- γ . MDX-44/IFN- γ puede ser valioso en la terapia de células de AML que expresan CD64 de superficie celular.

S. Barth y col. en APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, abr. 2000, págs. 1572-1579 desvelan una estrategia novedosa para la expresión de ITr funcionales dirigidas al espacio periplásmico de *Escherichia coli*. Las ITr se recuperaron mediante congelación-descongelación de sedimentos de cultivos de agitación de bacterias cultivadas con estrés osmótico (NaCl al 4% más sorbitol 0,5 M) en presencia de solutos compatibles. Los solutos compatibles, tales como glicina betaina e hidroxietoxina son osmolitos de bajo peso molecular que aparecen de forma natural en bacterias halófilas y se sabe que protegen proteínas a elevadas concentraciones salinas. La adición de glicina betaina 10 mM para el cultivo de *E. coli* con estrés osmótico no permitió solamente que las bacterias se desarrollaran en estas condiciones por lo demás inhibitorias, sino que también produjo un microentorno periplásmico para la generación de altas concentraciones de ITr plegadas correctamente. La proteína purificada mediante combinaciones de cromatografía de afinidad por iones metálicos y exclusión de tamaño se estabilizó sustancialmente en presencia de hidroxietoxina 1 M después de varias rondas de congelación-descongelación incluso a concentraciones de proteína muy bajas. Las propiedades de unión y potencia citotóxica de las ITr se confirmaron mediante experimentos competitivos. Esta estrategia novedosa de expresión guiada por solutos compatibles y purificación también puede ser aplicable a la producción periplásmica de alto rendimiento de proteínas recombinantes en diferentes sistemas de expresión.

B. Matthey y col en Gene 229 (1999) 145-153 desvelan el desarrollo de un nuevo sistema de expresión bacteriana para la producción de alto nivel de ITr. Construyeron una serie de vectores basados en pET para la secreción periplásmica dirigida por pelB o producción citoplásmica bajo el control del promotor *lac* de T7. La expresión en *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS permitió una inducción mediante isopropil β -*D*-tiogalactopiranosido (IPTG) estrictamente regulada de la síntesis de proteínas. Se introdujo una agrupación de poli-histidina escindible mediante enterocinasa en este sistema para la purificación mediante cromatografía de afinidad. Se produjo una modificación importante por la inserción de un sitio de clonación múltiple diseñado específicamente. Contiene solamente sitios de reconocimiento de enzimas de restricción raros usados para la clonación de genes de región variable de inmunoglobulina así como sitios de restricción *Sfi*I y *Not*I únicos para la inserción dirigida de fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) disponibles de sistemas de bacteriófagos establecidos. Para este fin delecionaron dos sitios consenso *Sfi*I internos de origen natural en un mutante de delección de la exotoxina A (ETA') de *Pseudomonas aeruginosa*. Cada elemento estructural sencillo del nuevo vector (promotor, secuencia líder, etiqueta de purificación, secuencia de scFv, marcador de selección y gen de toxina) estaba flanqueado por sitios de restricción únicos permitiendo la sustitución direccional simple. La fidelidad de la inducción por IPTG y la expresión de alto nivel se demostraron usando un scFv anti-CD30 (Ki-4) fusionado con ETA'. Estos datos confirman un sistema de vector bacteriano diseñado especialmente para la expresión periplásmica eficaz de toxinas de fusión basadas en ETA'.

El documento WO-A-01/80880 desvela un complejo formado al menos por el componente A y al menos el componente B en el que el componente A lleva una actividad de formación de enlaces para estructuras de superficie celular y el componente B lleva una proteasa, tal como granzima B, como una función efectora.

Sumario de la invención

La presente invención desvela un complejo recombinante formado por al menos un componente A, al menos un componente B y al menos un componente complementario C, comprendiendo el

componente A un dominio de unión para el receptor de superficie celular CD64 y el componente B, un dominio de destrucción de células. El dominio de unión del componente A se selecciona entre el grupo de moléculas que se unen activamente, que consiste en anticuerpos o sus derivados o fragmentos, péptidos sintéticos o moléculas de bajo peso molecular, ligandos, moléculas de unión a receptor y sus derivados, mutantes o combinaciones de los mismos que se unen a CD64. Se desvela adicionalmente que el componente A tiene una mayor valencia para CD64 comprendiendo dos o más dominios de unión idénticos y/o diferentes para CD64.

Se desvela adicionalmente que el componente B del complejo altera directamente la función, expresión génica o viabilidad de una célula de un modo terapéutico y más particularmente inactiva moléculas responsables de la biosíntesis de proteínas o activa componentes de la apoptosis inherente de células, induciendo la apoptosis en células definida mediante la unión del componente A. El componente B del dominio de destrucción de células tiene propiedades citotóxicas o es al menos un miembro de enzimas de ribosilación de ADP, tales como la Exotoxina A de *Pseudomonas*, la toxina de Difteria, Cólera o Pertussis, Botulismo o un miembro las proteínas inactivadas de ribosomas tales como Diantina, Saporina, Briodina, Gelonina, Ricina, Abrina, Proteína Antiviral de *Phytolacca americana* (PAP) o Restrictocina, o es un miembro de las ARNasas (Fosfodiesterasas) tales como la ARNasa seminal Bovina, ARNasa A Bovina, ARNasa pancreática Bovina, Angiogenina, Neurotoxina derivada de Eosinófilos (EDN), Proteína Catiónica Eosinofílica (ECP), Onconasa o Lectina de la Rana Toro o es un miembro de las enzimas activadoras de profármaco, tales como Caliqueamicina, Glucosa Oxidasa, Carboxipeptidasa, Fosfatasa Alcalina, Citosinadesaminasa, beta-Glucosidasa, beta-Glucuronidasa, beta-Lactamasa, Nitroreductasa, Timidincinasa o Purina Nucleósido Fosforilasa, o es un miembro de la familia de la catepsina proteasa, o un miembro de las calpaínas, o un miembro de las granzimas o cualquier derivado de las proteínas que se han mencionado anteriormente o una combinación de las mismas. En una realización adicional, el componente complementario C del complejo de la presente invención regula la expresión del gen o los genes que codifican el complejo. El componente C puede permitir la purificación del complejo o sus componentes, respaldar la retirada proteolítica del componente A del componente B o la internalización del componente B en la célula diana o la translocación del componente B a un compartimento subcelular y/o permitir la activación intracelular del componente B.

La presente invención se refiere al complejo monovalente m22(scFv)-ETA' (SEC ID N°: 7) y al complejo bivalente m22(scFv)₂-ETA' (SEC ID N°: 8). Además, las moléculas de ácido nucleico, ADN y/o ARN que codifican cualquiera de dichos complejos o los componentes individuales para la preparación de tal complejo son realizaciones de la presente invención; en particular los ácidos nucleicos con las SEC ID N°: 5 y 6 que codifican el complejo monovalente m22(scFv)-ETA' (SEC ID N°: 7) y el complejo bivalente m22(scFv)₂-ETA' (SEC ID N°: 8), respectivamente. También los vectores que comprenden dichas moléculas de ácido nucleico son realizaciones de la presente invención.

Son realizaciones adicionales células u organismos no humanos que sintetizan dichos complejos, que se pueden obtener mediante la transformación o transfección de células u organismos no humanos con las moléculas de ácido nucleico o vectores de las realizaciones que se han descrito anteriormente. Los organismos o células de acuerdo con la presente invención son procariotas, tales como *E. coli*, *B. subtilis*, *S. carnosus*, *S. coelicolor* o *Marinococcus sp.*, eucariotas inferiores tales como *Saccharomyces sp.*, *Aspergillus sp.*, *Spodoptera sp.* o *P. pastoris*. También es una realización de la presente invención un medicamento que contiene el complejo, moléculas de ácido nucleico, vectores, células/extractos celulares u organismo u organismos unicelulares, tales como procariotas y/o eucariotas inferiores o extractos de cualquiera de los organismos de la presente invención. Una realización adicional es el uso del complejo de la presente invención, de las moléculas de ácido nucleico y/o los vectores para influir en el crecimiento celular y la fisiología de células positivas a CD64; para que las células se pongan en contacto con el complejo y/o las moléculas de ácido nucleico o vectores, opcionalmente en presencia de agentes de transfección/transducción para proteínas o ácidos nucleicos, ya que son bien conocidos por el experto en la materia. Una realización adicional es el uso del complejo, de las moléculas de ácido nucleico que codifican el mismo, de los vectores y/o de las células u organismos para la preparación de un medicamento para el tratamiento de leucemia mieloide aguda, reacciones de inflamación crónica, tales como: enfisema, asma intrínseca y extrínseca, dermatitis atópica, erupción polimorfa lumínica, LES; injerto contra huésped, esclerosis múltiple, síndrome de activación de macrófagos, artritis reumatoide, artritis juvenil; enfermedad de Crohn y enfermedad intestinal crónica. Una realización adicional de la presente invención es un procedimiento para influir en el crecimiento celular y fisiología de células CD64⁺ que comprende las siguientes etapas: (a) poner en contacto las células, tejido aislado u órganos aislados con el complejo; o (b) transfectar las células, tejido aislado u órganos aislados con las moléculas de ácido nucleico. Además, la presente invención comprende un procedimiento para producir el complejo recombinante de la invención que comprende las siguientes etapas: transformar/transfectar células, microorganismos

tales como bacterias, hongos y/o ciliados con las moléculas de ácido nucleico o vectores que codifican el complejo recombinante o componentes del mismo; (b) cultivar las células y/u organismos de la etapa (a) en condiciones adecuadas para la expresión génica y síntesis de proteínas para acumular el complejo recombinante intracelularmente o en el medio de cultivo circundante; y (c) aislar y purificar el complejo recombinante de la etapa (b).

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Clonación de m22(scFv)-ETA' y m22(scFv)₂-ETA'. (a) amplificación por PCR de m22(scFv) (M, escalera de 100 pb; carril 1-4, m22(scFv) (852 pb); C, control negativo) (b) Estructura esquemática de la región codificante de m22(scFv)-ETA' monovalente y de m22(scFv)₂-ETA' bivalente en el vector de expresión de *E. coli* pET27b. El módulo de expresión está compuesto del operador *lac* de T7 inducible por IPTG, el péptido señal de la peptidasa de *Erwinia carotovora*-(*pelB*), una agrupación de His₁₀ escindible por enterocinasa y sintética (*Etiqueta His*), el scFv m22 anti-CD64 y la región codificante de ETA'.

Figura 2: Expresión bacteriana y purificación de las proteínas m22(scFv)-ETA' y m22(scFv)₂-ETA'; (a) proteína m22(scFv)-ETA' después de IMAC y SEC como se documenta después de SDS-PAGE al 10% (p/v) y tinción con Coomassie; 1, m22(scFv)-ETA' (67 kDa); M, Marcador Pre-teñido (Bio-Rad) (b) Inmunotransferencia teñida con el Acmo anti-ETA' TC-1 (la identificación del carril se corresponde con el panel 2a); (c) proteína m22(scFv)₂-ETA' después de NiNTA y SEC como se documenta después de SDS-PAGE, Transferencia de Western y tinción con Coomassie; M, Marcador; 1, m22(scFv)₂-ETA' (~100 kDa).

Figura 3: Comparación de eficacia de inmunotoxinas CD64 en la destrucción *in vivo* de macrófagos inflamatorios dérmicos murinos. Se ilustran la toxina recombinante tanto monovalente como bivalente y el anticuerpo H22 completo unido químicamente a Ricina-A. El eje vertical muestra el porcentaje de destrucción en comparación con sitios inyectados con placebo y el eje horizontal contiene las diferentes concentraciones molares usadas con referencia al resto de toxina.

Figura 4: Propiedades de unión de la inmunotoxina anti-CD64 recombinante m22(scFv)-ETA'. (a) Unión de m22(scFv)-ETA' a membranas de células negativas a CD64 L540Cy y membranas de células obtenidas de AML positivas a CD64 HL-60 documentado por CM-ELISA. (b) Unión de m22(scFv)-ETA' a células positivas a antígeno mediante flujo o con PBS como un control negativo. A. Citometría de células L540Cy. Las células se tiñeron con inmunotoxina purificada teñida con inmunotoxina específica de CD64. B. células HL-60 teñidas con inmunotoxina específica de CD64. (c) Documentación de la actividad de unión específica de m22(scFv)-ETA' usando un CM-ELISA con diferentes diluciones de Acmo m22 para la competición. La unión de m22(scFv)-ETA' se detectó mediante el Acmo anti-His conjugado con peroxidasa. Se presentan los datos de tres experimentos independientes.

Figura 5: (a) Inhibición del crecimiento de líneas celulares obtenidas de AML después de la incubación con el m22(scFv)-ETA' monovalente como se documenta mediante ensayos de viabilidad celular (18). (a) Se trataron HL-60 (CD64⁺) o L540Cy (CD64⁺) y (b) U937 (CD64⁺) o IIA1.6 (CD64⁺) con diversas diluciones de inmunotoxina anti-CD64 recombinante. Se trataron HL-60, U937 (-) o L540Cy, IIA1.6 (---) con m22(scFv)-ETA', y su capacidad de metabolizar el XTT a una sal de formazano soluble en agua (formada mediante actividad de deshidrogenasa mitocondrial) se midió como absorbancia a 450 y 650 nm. Las mediciones se realizaron por triplicado. Los resultados se presentan como porcentaje de células de control no tratadas. (d) y (e) muestran la inhibición del crecimiento de la línea celular mielóide promielocítica aguda HL60 y las líneas celulares de linfoma histiocítico U 937 después de la incubación con el m22(scFv)₂-ETA' bivalente como se documenta mediante ensayos de viabilidad celular (18). En (d) y (e) se trataron HL60 (CD64⁺) o U937 (CD64⁺) con ITr y su capacidad de metabolizar el XTT a una sal de formazano soluble en agua (formada mediante actividad de deshidrogenasa mitocondrial) se midió como absorbancia a 450 y 650 nm (longitud de onda de referencia) en un ensayo de viabilidad celular (18). Las mediciones se realizaron por triplicado. Los resultados se presentan como el porcentaje de células de control no tratadas. La actividad citotóxica de m22(scFv)₂-ETA' (-) sobre células HL60, U397 (----) y células L540Cy (CD64⁺) se usaron como controles negativos (no mostrado, ~100% de viabilidad). Las mediciones se realizaron de nuevo por triplicado. Presentar ecuación en el gráfico U 937; $y = -7,7304\ln(x) + 30,976$; Presentar valor de R cuadrado en el gráfico R² = 0,9941; Presentar ecuación en el gráfico HL 60; $y = -8,2582\ln(x) + 28,482$; Presentar valor de R cuadrado en el gráfico R² = 0,9774; CI₅₀ de m22(scFv)₂-ETA' = HL60 11,715 ng/ml; U937 13,54 ng/ml

Figura 6: Análisis de citometría de flujo de apoptosis inducida en células de AML obtenidas de pacientes nuevas mediante la inmunotoxina anti-CD64 recombinante m22(scFv)-ETA'. (a) Unión de m22(scFv)-ETA' (líneas negras transparentes) a células primarias. Las células se tiñeron con Anexina-

V-FITC y PI simultáneamente. (b) Tratamiento de células de AML tanto CD64⁻ como CD64⁺ derivadas de paciente primario con 100 ng/ml de m22(scFv)-ETA'. Los números en el cuadrante derecho inferior y superior de cada gráfico representan el porcentaje de células en apoptosis temprana (AnnV+/PI-) y apoptosis tardía/necrosis (AnnV+/PI+) respectivamente. Los datos son representativos de tres experimentos separados realizados con estas muestras.

Figura 7: Cebadores usados para la construcción de inmunotoxinas anti-CD64.

Figura 8: Secuencia de ácido nucleico de la construcción monovalente pBM-m22(scFv).

Figura 9: Secuencia de ácido nucleico de la construcción bivalente m22(scFv)₂-ETA'.

Figura 10: Secuencia de aminoácidos de la construcción monovalente m22(scFv)-ETA'.

Figura 11: Secuencia de aminoácidos de la construcción bivalente m22(scFv)₂-ETA'.

Descripción detallada de la invención

El complejo de acuerdo con la invención es el que se menciona en la reivindicación 1.

El alcance de la presente invención está definido por las reivindicaciones y cualquier información que no se incluya en las reivindicaciones se proporciona solamente como información.

15 Definiciones

Como se usa en el presente documento, el término "complejo" se refiere a moléculas lineales con diferentes dominios; dicha molécula puede adoptar una estructura secundaria y terciaria; el término "complejo" también comprende una estructura no lineal de orden superior compuesta de al menos dos moléculas que solamente después de la interacción forman la forma activa del complejo. La interacción puede dar como resultado un enlace covalente entre las al menos dos moléculas y/o las al menos dos moléculas se estabilizan mediante enlaces no covalentes. La interacción puede tener lugar *in vitro*, es decir, en un tubo de ensayo u otro recipiente de laboratorio apropiado, uniéndose químicamente las al menos dos moléculas o partes de las mismas y/o mediante la afinidad natural de las al menos dos moléculas o partes de las mismas entre sí. La interacción también puede tener lugar *in vivo*, es decir, en una célula o en un organismo, por lo que, por ejemplo, las enzimas celulares catalizan la formación de enlaces covalentes y/o enlaces no covalentes.

Como se usa en el presente documento, el término "inmunotoxina" se refiere a moléculas químicas en las que un anticuerpo monoclonal de unión a células o fragmentos del mismo se acoplan químicamente o fusionan genéticamente a toxinas o sus subunidades. La parte de toxina de la inmunotoxina se puede obtener de diversas fuentes, tales como bacterias, hongos, plantas o animales. También se pueden usar toxinas de origen humano o toxinas sintéticas (fármacos). Las inmunotoxinas así como su construcción se han revisado anteriormente y se conocen bien por el experto en la materia.

Como se usa en el presente documento, la expresión "componente A" del complejo representa el dominio de unión a CD64 del complejo de la presente invención. Combinaciones de los mismos; el más preferido es un dominio de unión de una mayor valencia generado mediante la combinación de al menos dos de las moléculas de unión que se han mencionado anteriormente.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanizados, anticuerpos de cadena sencilla y fragmentos de los mismos, tales como Fab, F(ab')₂, Fv y otros fragmentos que conservan la función de unión a antígeno y especificidad del anticuerpo parental.

Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a una composición de anticuerpos que tiene una población de anticuerpos homogénea. La expresión no está limitada con respecto a la especie o fuente del anticuerpo ni está limitada por el modo en el que se prepara. La expresión incluye inmunoglobulinas completas así como fragmentos tales como Fab, F(ab')₂, Fv y otros, que conservan la función de unión a antígeno y especificidad del anticuerpo. Se pueden usar anticuerpos monoclonales de cualquier especie de mamífero en la presente invención. Sin embargo, en la práctica los anticuerpos típicamente serán de origen de rata o murino debido a la disponibilidad de líneas celulares de rata o murinas para su uso en la preparación de las líneas celulares híbridas requeridas o hibridomas para producir anticuerpos monoclonales.

Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpos humanos" significa que las regiones marco conservadas de una inmunoglobulina se obtienen de secuencias de inmunoglobulina humanas.

Como se usa en el presente documento, la expresión "fragmentos de anticuerpo de cadena sencilla" (scFv) se refiere a anticuerpos preparados determinando los dominios de unión (entre cadenas tanto pesadas como ligeras) de un anticuerpo de unión y suministrando un resto de engarce que permite la conservación de la función de unión. Esto forma, en esencia, un anticuerpo radicalmente abreviado, que tiene solamente la parte del dominio variable necesaria para la unión al antígeno. La determinación y construcción de anticuerpos de cadena sencilla se describen en la Patente de Estados Unidos N° 4.946.778 de Ladner y col.

El resto de "toxina", también denominado en el presente documento "dominio de destrucción de células" del complejo es parte del "componente B" de la presente invención y es la Exotoxina A de Pseudomonas.

Como se usa en el presente documento, el término "CD64" se refiere a una molécula de superficie humana como se ha revisado anteriormente de forma extensa. Para fines de inmunización se puede preparar el antígeno CD64 mediante cualquier técnica conocida en la materia.

Los anticuerpos para CD64 humanos se conocen en la técnica. La presente invención también contempla un nuevo uso de derivados recombinantes de tales anticuerpos como se ha detallado anteriormente.

Como alternativa se pueden producir anticuerpos monoclonales anti-CD64 humano usando el antígeno CD64 como un inmunógeno, a condición de que esté disponible un ensayo de exploración que distinga anticuerpos dirigidos contra otros antígenos presentes en la composición inmunógena. También se pueden usar fracciones de células o de membrana que contienen la molécula de interés como inmunógenos para conservar las restricciones conformacionales proporcionadas por un entorno de membrana. La inmunización de animales con células completas o fracciones de las mismas habitualmente produce una fuerte respuesta inmune, que genera anticuerpos para un gran número de diferentes moléculas. Esta amplia respuesta inmune impide el uso de células CD64⁺ en combinación con el antígeno CD64 purificado en la exploración posterior para la producción de anticuerpos específicos mediante clones de hibridoma obtenidos de células de bazo o linfocitos de ratón.

A continuación se exponen técnicas generales para generar sueros policlonales y anticuerpos monoclonales:

a) Sueros Policlonales

Se pueden preparar sueros policlonales mediante procedimientos convencionales. En general, una solución que contiene el antígeno CD64 se usa en primer lugar para inmunizar un animal adecuado, preferentemente un ratón, rata, conejo o cabra. Se prefieren los conejos y las cabras para la preparación de sueros policlonales debido al volumen de suero obtenible y la disponibilidad de anticuerpos anti-conejo y anti-cabra marcados. La inmunización se realiza generalmente mezclando o emulsionando la solución que contiene antígenos en solución salina, preferentemente en un adyuvante tal como el adyuvante completo de Freund e inyectando la mezcla o emulsión por vía parenteral (generalmente por vía subcutánea o por vía intramuscular). Típicamente es suficiente una dosis de 50-200 µg/inyección. La inmunización generalmente se refuerza 2-6 semanas más tarde con una o más inyecciones de la proteína en solución salina, usando preferentemente adyuvante incompleto de Freund. Se pueden generar como alternativa anticuerpos mediante inmunización *in vitro* usando procedimientos conocidos en la técnica, que para los fines de la presente invención se considera equivalente a la inmunización *in vivo*.

Los antisueros policlonales se obtienen extrayendo sangre del animal inmunizado a un recipiente de vidrio o plástico, incubando la sangre a 25°C durante una hora, seguido de incubación a 4°C durante 2-18 horas. El suero se recupera mediante centrifugación (por ejemplo, 1000 g durante 10 minutos). Se pueden obtener aproximadamente 20-50 ml por extracción de sangre de los conejos.

b) Anticuerpos Monoclonales

Se preparan anticuerpos monoclonales usando el procedimiento de Kohler y Milstein, Nature (1975) 256: 495-96 o una modificación del mismo. Típicamente se inmuniza un ratón o una rata como se ha descrito anteriormente. Sin embargo, en lugar de extraer sangre del animal para extraer el suero se extrae el bazo (y opcionalmente varios ganglios linfáticos grandes) y se disocia en células individuales. Si se desea, las células del bazo se pueden explorar (después de la retirada de células no específicamente adherentes) aplicando una suspensión celular a una placa o pocillo revestido con el antígeno proteico. Los linfocitos B que expresan inmunoglobulina unida a membrana específica para el antígeno se unen a la placa y no se eliminan mediante enjuagado con el resto de la suspensión. Los linfocitos B resultantes o todas las células del bazo disociadas después se inducen para fusionarse

con células de mieloma para formar hibridomas y se cultivan en un medio selectivo (por ejemplo, medio de hipoxantina, aminopterina, timidina, "HAT"). Los hibridomas resultantes se siembran mediante dilución limitante y se ensayan para la producción de anticuerpos que se unen específicamente al antígeno de superficie celular inmunizante deseado (y que no se une a antígenos no relacionados). Después los hibridomas secretantes de Acm seleccionados se cultivan *in vitro* (por ejemplo, en matraces de cultivo tisular o reactores de fibra hueca) o *in vivo* (como ascitis en ratones).

Como se usa en la presente invención, el término "recombinante" se refiere a fusiones de la parte de anticuerpo con la parte de toxina mediante medios recombinantes tales como mediante la producción de anticuerpos de cadena sencilla que se expresan recombinantemente como parte de una cadena polipeptídica más larga que también contiene una parte de toxina. La inmunotoxina recombinante producida de este modo se puede aislar mediante cualquier técnica conocida en el campo de la tecnología de expresión de ADN recombinante adecuada para este fin.

Como se usa en el presente documento, el término "vector" puede comprender un plásmido, un cósmido, un fago, fagémido, derivados de los mismos o un virus. Un "vector" se puede usar de forma circular o linealizada; un "vector" se puede usar como ADN o ARN.

Como se usa en el presente documento, el término "organismo" se refiere a procariotas y eucariotas, unicelulares y multicelulares. "Eucariota" de acuerdo con la presente invención incluye eucariotas inferiores, tales como hongos, vertebrados tales como mamíferos (humanos y no humanos, incluyendo roedores, etc.), aves y peces, invertebrados tales como gusanos e insectos, plantas, etc. "Célula eucariota" de acuerdo con la presente invención se refiere a células y cultivo celular obtenidos de los anteriores organismos, incluyendo células madre.

Para expresar el complejo recombinante, el polipéptido de fusión de anticuerpo de cadena sencilla-resto de toxina (también denominado "inmunotoxina recombinante") de la presente invención en bacterias tales como *E. coli*, o en levaduras tal como en *S. cerevisiae*, huéspedes invertebrados tales como células de insecto, células de Ovario de Hámster Chino (CHO), COS, BHK, 293T y MDCK se realizan las siguientes etapas:

Transformación o transfección de un huésped celular apropiado con un vector recombinante, en el que se ha insertado una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión bajo el control de los elementos reguladores apropiados, particularmente un promotor reconocido por las polimerasas del huésped celular y, en el caso de un huésped procariota, un sitio de unión a ribosoma (RBS) apropiado, que permite la expresión en dicho huésped celular de dicha secuencia de nucleótidos.

Como se usa en el presente documento, se tiene que entender que la expresión "destrucción de células que expresan CD64" implica una inhibición de la síntesis de proteína o inducción de apoptosis dando como resultado la eliminación o muerte de estas células; se pueden emplear diversos mecanismos moleculares; por ejemplo, se pueden usar mecanismos que alteran la función de una célula, los que alteran el patrón de expresión génica de una célula o los que afectan directamente a la viabilidad de una célula.

Como se usa en el presente documento, la expresión "células que expresan CD64" se refiere a células con CD64 como antígeno de superficie. CD64 se expresa principalmente en monocitos, macrófagos y células presentadoras de antígenos (APC). Se puede considerar cualquier tipo de célula que exprese CD64 para el tratamiento con las inmunotoxinas recombinantes o composiciones que comprendan las mismas de la presente invención.

La invención también se refiere a moléculas de ácido nucleico o vectores que codifican el complejo de acuerdo con la invención o componentes individuales para preparar el complejo.

También se reivindican células y/u organismos que sintetizan los complejos completos de acuerdo con la invención o componentes individuales de los mismos después de transformarse o transfectarse con las moléculas de ácido nucleico o vectores de acuerdo con la invención.

Los organismos de acuerdo con la invención son de origen procariota, especialmente *E. coli*, *B. subtilis*, *S. carnosus*, *S. coelicolor*, *Marinococcus sp.* o eucariotas inferiores, especialmente *Saccharomyces sp.*, *Aspergillus sp.*, *Spodoptera sp.*, *P. pastoris*.

La invención también se refiere a medicamentos que comprenden un complejo de acuerdo con la invención; la invención se refiere además a medicamentos que comprenden un ácido nucleico que codifica dicho complejo o células y/o extractos celulares que comprenden el ácido nucleico y/o dicho complejo. Típicamente los complejos, ácidos nucleicos, células o extractos celulares de acuerdo con la invención se administran en formas de dosificación fisiológicamente aceptables. Éstas incluyen, por

ejemplo, tampones Tris, NaCl, fosfato y todos los sistemas de tampón aprobados, que incluyen especialmente sistemas de tampón que se caracterizan por la adición de estabilizadores de proteína aprobados. La administración se realiza, en particular, mediante administración parenteral, intravenosa, subcutánea, intramuscular, intratumoral, transnasal y mediante aplicación a través de la mucosa.

5

La dosificación de los complejos de acuerdo con la invención a administrarse tiene que establecerse para cada aplicación en cada enfermedad a tratar de forma reciente mediante estudios clínicos de fase I (estudios de escalado de dosis).

10

Los ácidos nucleicos o vectores que codifican un complejo de acuerdo con la invención se administran ventajosamente en formas de dosificación fisiológicamente aceptables. Éstas incluyen, por ejemplo, tampones Tris, NaCl, fosfato y todos los sistemas de tampón aprobados, que incluyen especialmente sistemas de tampón que se caracterizan por la adición de estabilizadores aprobados para los ácidos nucleicos y/o vectores a usar. La administración se realiza, en particular, mediante administración parenteral, intravenosa, subcutánea, intramuscular, intratumoral, transnasal y mediante aplicación a través de la mucosa.

15

El complejo de acuerdo con la invención, las moléculas de ácido nucleico que codifican el complejo o componentes del mismo, células y/o extractos celulares que comprenden el complejo y/o ácidos nucleicos que codifican el complejo o componentes del mismo se pueden usar para la preparación de un medicamento para tratar leucemia mieloide aguda y reacciones de inflamación crónica. En particular, dicho medicamento es útil para el tratamiento de reacciones de inflamación crónica, tales como enfisema, asma intrínseca y extrínseca; dermatitis atópica, erupción polimorfa lumínica, LES, injerto contra huésped, esclerosis múltiple, síndrome de activación de macrófagos, artritis reumatoide, artritis juvenil, enfermedad de Crohn y enfermedad intestinal crónica, etc.

20

Ejemplos

25

Procedimientos

Cepas bacterianas, oligonucleótidos y plásmidos

30

Se usó *E. coli* XL1-blue (supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyr A46 thi relA1 lacF^r[pro AB+ lacI^q lacZΔM15 Tn10(tet^r)] para la propagación de plásmidos y *E. coli* BL21 Star™ (DE3) (F ompT hsdSB(rB^mB^b) gal dcm rne131 DE3) como huésped para la síntesis de inmunotoxinas recombinantes. Se sintetizaron oligonucleótidos sintéticos por MWG Biotech (Ebersberg, Alemania). El vector de expresión bacteriano pBM1.1 se obtiene del plásmido pET27b (Novagen, Madison, EE.UU.) y se usa para la fusión N-terminal de ligandos de Sfi I/Not I al mutante de delección modificado de Exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* (20). Se prepararon plásmidos mediante el procedimiento de lisis alcalina y se purificaron usando los kits de preparación de plásmidos de Qiagen (Hilden, Alemania). Se separaron los fragmentos de restricción o productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa horizontal y se extrajeron con QIAquick (Qiagen). Todos los procedimientos de clonación convencionales se realizaron como se describe por Sambrook y col. (17).

35

Muestras de pacientes y líneas celulares

40

Se obtuvieron muestras de sangre periférica heparinizadas de un paciente adulto con AML después del consentimiento informado y con la aprobación del comité de ética de investigación clínica de la Universidad de Aachen. Se aislaron células mononucleares (MNC) mediante centrifugación en gradiente de baja densidad < 1,007 g/ml) usando el medio de separación Ficoll-Paque PLUS™ (Amersham Biosciences, Freiburg, Alemania). Todas las líneas celulares que incluían las líneas celulares obtenidas de AML CD64⁺ HL-60 (proporcionada por T. Thepen, Utrecht, Países Bajos) y U937 (DSMZ; Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares) y L540Cy (16) y IIA1.6 CD64- (proporcionado por T. Thepen) se cultivaron en medio completo (RPMI 1640) complementado con suero fetal bovino (FCS) inactivado por calor al 10% (v/v) 50 µg/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin y L-glutamina 2 mM. Todas las células se cultivaron a 37°C en una atmósfera de aire de CO₂ al 5% (16).

45

50

Construcción y expresión de m22(scFv)-ETA¹ y m22(scFv)₂-ETA¹

55

El gen de m22(scFv) se amplificó del plásmido que lleva m22 (proporcionado amablemente por T. Thepen) mediante PCR usando el cebador oligonucleotídico m22(scFv)Inverso: 5'-ATG-GCT-CAG-GGT-GCG-GCC-CAG-CCG-GCC-ATG-GCC-CAG-GTG-CAG-CTG-GTG-G (SEC ID N°: 1); letras en negrita: sitio consenso de Sfi I; en cursiva: región 5' de m22(scFv); y el cebador oligonucleotídico m22(scFv)Directo: 5'-GAG-TCA- TTC-TCG-ACT-TGC-GGC-CGC- TTT-GAT-CTC-CAG-CTT-GGT-CC

G (SEC ID N°: 2); letras en negrita: sitio consenso de Not I; en cursiva: región 3' de m22(scFv). Después de la digestión con Sfi I/Not I el fragmento de PCR se clonó en el vector de expresión bacteriano pBM1.1 (16) y se digirió con las mismas enzimas de restricción. La construcción monovalente (scFv) resultante pBM-m22(scFv) (SEC ID N°: 5) se verificó mediante análisis de secuencia de ADN. Para la construcción de la inmunotoxina m22(scFv)₂-ETA' bivalente (SEC ID N°: 6), el m22(scFv) se amplificó mediante PCR con el cebador m22(inverso): 5'- GAG-CCC-AAG-CTT-ATG-GCC-CAG-GTG-CAG-CTG-GTG G (SEC ID N°: 3); letras en negrita: sitio consenso de HindIII; en cursiva: región 5' de m22(scFv); y con el cebador m22Directo: 5'-GCA-ACT-GCG-GCC-GGC-TGG-GCC-gcc-ggc-tgg-gcc-gac-gag-cca-ccq-cca-ccT-TTG-ATC-TCC-AGC-TTG-GTC-CCT-TG G (SEC ID N°: 4); letras en negrita: sitio consenso de Sfi I; letras subrayadas: región de engarce; en cursiva: región 5' de m22(scFv). Después de la digestión con HindIII/SfiI el fragmento de PCR se clonó en pBM-m22(scFv), se digirió con los mismos sitios de restricción para obtener la construcción bivalente m22(scFv)₂-ETA' (SEC ID N°: 6). Después de la transformación en BL21 Star™ (DE3), las proteínas de fusión m22(scFv)-ETA (SEC ID N°: 7) y m22(scFv)₂-ETA' (SEC ID N°: 8) se expresaron periplásmicamente con estrés osmótico en presencia de solutos compatibles, como se describe por Barth y col, (16). En resumen (la siguiente sección "Expresión periplásmica y purificación del m22(scFv)₂-ETA' recombinante" proporciona una descripción más detallada del procedimiento), se recogieron bacterias transformadas 15 h después de la inducción mediante IPTG. El sedimento bacteriano se resuspendió en tampón de sonicación (Tris/HCl 75 mM (pH 8), NaCl 300 mM, 1 cápsula de inhibidores de proteasa/50 ml (Complete™, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania), DTT 5 mM, EDTA 10 mM, glicerol al 10% (v/v)) a 4°C y se sonicó 6 veces durante 30 s a 200 W. Las proteínas de fusión m22(scFv)-ETA' (SEC ID N°: 7) se enriquecieron mediante IMAC (cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados) usando columnas de Sepharose quelante de níquel-nitriloacético (Qiagen) y SEC (cromatografía de exclusión por tamaño) con Bio-Prep SE-100/17 (Biorad, München, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La proteína recombinante se eluyó con PBS (pH 7,4) y NaCl 1 M, se analizó mediante electroforesis en gel de dodecilsulfato sódico/poliacrilamida (SDS-PAGE), se cuantificó mediante densitometría (Densitómetro GS-700 Imaging; Biorad) después de tinción con Coomassie en comparación con patrones de BSA (figuras 2a y 2b) y se verificó mediante ensayos de Bradford (Biorad).

30 Expresión periplásmica y purificación del m22(scFv)₂-ETA' recombinante

Expresión Periplásmica y Purificación del m22(scFv)₂-ETA' recombinante. Se expresaron IT recombinantes (ITr) bajo el control del promotor lac de T7 inducible mediante IPTG en E. coli BL21 (DE3) como se ha descrito recientemente (1). En resumen se cultivaron bacterias durante una noche a 26°C en Terrific Broth (30) que contenía 50 µg/ml de kanamicina y ZnCl₂ 0,5 mM. El cultivo se diluyó 35 30 veces en 200 ml del mismo medio. A una A₆₀₀ de 2 se complementó con sorbitol 0,5 M, NaCl al 4% y glicina betaína 10 mM y se incubó a 26°C durante 30-60 min adicionales. La expresión de ITr se indujo mediante la adición de IPTG 2 mM a 26°C. Más tarde (15 h), las células se recogieron mediante centrifugación a 3.700 g durante 10 min a 4°C. Para todas las demás etapas, los tubos se mantuvieron en hielo. El sedimento bacteriano se centrifugó y se determinó su peso húmedo. Las células se congelaron a -196°C. Después de la descongelación, las células se resuspendieron en Tris-HCl 75 mM (pH 8), NaCl 300 mM, 1 cápsula de inhibidores de proteasa/50 ml (Compleat, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania), DTT 5 mM, EDTA 10 mM y glicerol al 10% (v/v) y se sonicaron seis 6 veces durante 30 s a 200 W. La fracción periplásmica se recuperó después de centrifugación a 21.000 g durante 5 min a 4°C y se transfirió a PBS (pH 8), NaCl 300 mM y glicerol al 10% usando columnas de precipitación salina PD10 (Pharmacia, Freiburg, Alemania). La ITr se purificó parcialmente mediante cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados que contenía Sepharose quelante de níquel-ácido nitriloacético (Qiagen) en una Äkta FPLC (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). La proteína unida se eluyó con imidazol PBS 500 mM (pH 8), NaCl 1 M y glicerol al 10%. Las fracciones que contenían el m22(scFv)₂-ETA' bivalente se combinaron, concentraron mediante ultrafiltración y se purificaron finalmente usando SEC con columnas HI-Prep 26/60 Sephacryl S100 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) en la estación de trabajo Äkta FPLC. La proteína se eluyó con PBS (pH 7,4), se analizó mediante SDS-PAGE, se cuantificó después de la tinción con Coomassie en comparación con patrones de BSA (figura 2 c) y se verificó mediante ensayos de Bradford (Bio-Rad).

SDS-PAGE y Análisis de Transferencia de Western

55 Se realizaron SDS-PAGE y transferencia de Western como se ha descrito (16). Se detectó m22(scFv)-ETA' (SEC ID N°: 7) mediante el Acmo anti-ETA' TC-1 (20) (proporcionado amablemente por O. R. Galloway, Columbus, Ohio). Se tiñó el anticuerpo unido con un Acmo anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma Chemical Co., Deisenhofen, Alemania) y una solución de Tris-HCl (pH 8,0) y 0,2 mg/ml de naftol-AS-Bi-fosfato (Sigma Chemical Co.) más 1 mg/ml de Fast-Red (Serva, Heidelberg, Alemania).

ELISA de membrana celular (CM)

Se determinó la actividad de unión de las proteínas de fusión m22(scFv)-ETA' (SEC ID N°: 7) y m22(scFv)₂-ETA' (SEC ID N°: 8) mediante CM-ELISA usando membranas biológicamente activas de células tumorales como se describe por Tur y col. (19) (Placas de ELISA Maxisorp (Nalgen Nunc International, Roskilde, Dinamarca) se revistieron con 100 µl (aproximadamente 0,9 mg de proteína/ml) de fracciones de membrana preparadas recientemente de líneas celulares CD64⁺ HL-60/U-937 y L-540Cy como control en tampón bicarbonato 0,02 M (pH 9,6) durante una noche a 4°C. Las placas se lavaron cinco veces con PBS (pH 7,4) que contenía Tween 20 (TPBS) al 0,2% y se bloquearon con 200 µl de BSA al 2% en PBS (PBSA). Después de incubación durante una noche a 4°C, las placas se lavaron cinco veces con TPBS y 2-10 µg/ml de m22(scFv)-ETA' (SEC ID N°: 7) diluido con BSA al 0,5% y Tween 20 al 0,05% en PBS se añadió a las placas y se incubó a temperatura ambiente TA (23°C) durante 1 h. Después de esto, las placas se lavaron y se detectó la unión de la inmunotoxina recombinante con el Acmo anti-ETA' TC-1 y fragmentos F(ab')₂ de IgG de cabra anti-ratón acoplada a peroxidasa (Boehringer, Ingelheim, Alemania) de acuerdo con las recombinaciones del fabricante. Los anticuerpos unidos se visualizaron después de la adición de 100 µl de solución de ácido 2',2'-azino-bis(3-etilbenziazolina-6-sulfónico) (ABTS®) (Roche Molecular Biochemical's, Mannheim, Alemania) midiendo la extinción a 415 nm con un Lector de ELISA (MWG Biotech).

Especificidad de Unión

La especificidad de unión de las inmunotoxinas recombinantes se ensayó mediante CM-ELISA siguiendo el protocolo que se ha descrito anteriormente usando el Acmo m22 para la competición (Acris, Bad Nauheim, Alemania). En resumen se revistieron placas de ELISA Maxisorp con fracciones de membrana de células HL-60 positivas a CD64. Después del bloqueo, las placas se incubaron con una concentración fija (~35 µg/ml) de inmunotoxina recombinante m22(scFv)-ETA' (SEC ID N°: 7). Se realizaron experimentos de competición en presencia o ausencia de diferentes concentraciones (100 ng - 10 µg/ml) del Acmo m22. Se detectó la unión de m22(scFv)-ETA' (SEC ID N°: 7) usando anti-His-Peroxidasa (Roche Molecular Biochemical's) después de la adición de ABTS.

Análisis de citometría de flujo

Se evaluó la actividad de unión celular de m22(scFv)-ETA' (SEC ID N°: 7) y m22(scFv)₂-ETA' (SEC ID N°: 8) expresados en *E. coli* BL21 Star™ (DE3) usando un instrumento de citometría de flujo FACSCalibur y software CellQuest (Becton Dickinson, Heidelberg, Alemania). Las células se tiñeron con inmunotoxina scFv como se ha descrito (25). En resumen se recogieron diez mil acontecimientos por cada muestra y se realizaron análisis de células intactas usando ventanas de dispersión apropiadas para excluir restos celulares y agregados. Se incubaron 5 x 10⁵ células durante 1 h en hielo con 50 µl del extracto de proteína bacteriana m22(scFv)-ETA' (SEC ID N°: 7) a una concentración de 30-40 µg/ml. Las células se lavaron con tampón PBA que contenía BSA al 0,2% p/v y azida sódica al 0,05% p/v y después se incubaron durante 30 min con Acmo anti-TC-1 diluido 1:2 en tampón PBA. Las células se lavaron e incubaron con IgG de cabra anti-ratón marcado con fluoresceína-iso-tiocianato (FITC) (DAKO Diagnostica, Hamburg, Alemania) durante 1 h a 4°C. Después de un lavado final, las células se trataron con 2 µl de yoduro de propidio 6,25 mg/ml y posteriormente se analizaron mediante FACS.

Ensayo de proliferación celular colorimétrico

Se determinó el efecto citotóxico de m22(scFv)-ETA' (SEC ID N°: 7) sobre líneas celulares diana mediante medición de la metabolización de la sal de amarillo de tetrazolio (XTT) hasta un colorante de formazano naranja soluble en agua como se publicó por (25). Se distribuyeron diversas diluciones de la toxina recombinante en alícuotas de 100 µl en placas de 96 pocillos. Se añadieron 2-4 x 10⁴ células diana en alícuotas de 100 µl de medio completo y las placas se incubaron durante 48 h a 37°C. Después de esto, los cultivos celulares se pulsaron con 100 µl de medio de cultivo fresco complementado con XTT/PMS (concentraciones finales de 0,3 mg y 0,383 ng respectivamente) durante 4 h. Las absorbancias espectrofotométricas de las muestras se midieron a 450 y 650 nm (longitud de onda de referencia) con un lector de ELISA (MWG Biotech). La concentración requerida para conseguir una reducción del 50% de la síntesis de proteína (CI₅₀) con respecto a las células de control no tratadas y controles positivos tratados con Triton X al 1% se calculó gráficamente mediante diagramas generados mediante Excel. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

Ensayo de citometría de flujo de la apoptosis

Se aislaron células mononucleares de muestras de sangre de pacientes mediante centrifugación en Ficoll-Paque. Se confirmó la expresión de CD64 de superficie celular mediante citometría de flujo

usando la inmunotoxina m22(scFv)-ETA' como se ha descrito anteriormente. Se sembraron aproximadamente 5×10^5 células mononucleares/pocillo en placas de 12 pocillos de fondo plano en RPMI 1640 complementado con FCS al 10% por triplicado. Se añadieron 10 ng/ml de inmunotoxina a cada pocillo y las células se cultivaron durante 18 h a 37°C y una atmósfera de aire de CO₂ al 5%. Se detectaron las células apoptóticas usando un kit de detección de apoptosis de anexina V-FITC I (BD Pharmingen, Heidelberg, Alemania). En resumen, las células enteras se tiñeron simultáneamente con Anexina V (AnnV) conjugada con FITC y PI en PBS de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se analizaron diez mil células mediante citometría de flujo y se recontaron las subpoblaciones AnnV-/PI-, AnnV+/PI-, AnnV+/PI+ y AnnV-/PI+. Las células apoptóticas tempranas se expusieron a fosfatidilserina pero las membranas celulares intactas se unieron a Anexina V-FITC pero excluyeron PI. Por tanto, se ha encontrado que las cuatro poblaciones de AnnV-/PI-, AnnV+/PI-, AnnV+/PI+ y AnnV-/PI+ se corresponden con células vivas, células apoptóticas tempranas, células apoptóticas tardías/necróticas y células necróticas, respectivamente.

Inducción de inflamación cutánea, inyecciones de inmunotoxina y biopsias

En todos los experimentos se usaron ratones FVB/N transgénicos que expresaban FcγRI humano. Para inducir la inflamación cutánea crónica se afeitó un área de 1,5 por 1,0 cm en ambos flancos de los ratones y se aplicó diariamente el irritante lauril sulfato sódico (SLS) (al 5% en solución salina) por vía epicutánea durante diez días consecutivos. Los animales se anestesiaron con 20 μl de una mezcla 4:3 de Aescoket (Aesculaap, Gent, Bélgica) y Rompun (Bayer, Leverkusen, Alemania), inyectada por vía intramuscular. Se administraron inyecciones intradérmicas (10 μl; 10:1 en solución salina; el intervalo M en la figura 3 se refiere al resto de toxina) con las muestras de ensayo en diferentes concentraciones. Para fines de control se administraron inyecciones de solución salina idénticas por vía contralateral. Los animales se sacrificaron y se tomaron biopsias con troquel de 3 mm, se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C antes de su uso.

Tinción de CD64 inmunohistoquímica

Las biopsias se cortaron en secciones de 6 μm en un microtomo de congelación y se montaron en portaobjetos revestidos. Después del secado durante una noche, las secciones se fijaron durante 10 min con acetona seca y se secaron al aire. Los portaobjetos se incubaron con 10.1 (Serotec 1:40) conjugado con FITC en PBS suero de ratón normal (NMS) al 2% durante 45 min. Los portaobjetos se lavaron tres veces durante 5 min con PBS, Tween al 0,05%, después de lo cual anti FITC de oveja conjugado con fosfatasa alcalina (AP) (Boehringer Mannheim, 1:400) en PBS (suero AB Humano al 1%, NMS al 1% durante 30 min). Después del lavado dos veces en PBS/Tween y una vez en Tris-HCl (0,1 M, pH 8,5) se demostró actividad de AP usando naftol AS-BI fosfato (sal sódica, 50 mg/100 ml; Sigma) como sustrato y nueva fucsina (10 mg/100 ml; Merck, Whitehouse Station, N. J.) como cromógeno disuelto en Tris-HCl 0,1 M, pH 8,5, dando como resultado una tinción rosa/rojo. Se inhibió la actividad de AP endógena mediante la adición de levamisol (35 mg/100 ml, Sigma) a la mezcla de reacción. Los portaobjetos se sometieron a tinción de contraste ligeramente con hematoxilina. Las secciones se puntuaron para células positivas por dos observadores independientes y se calculó el porcentaje de la destrucción en comparación con los sitios no inyectados.

Resultados

Construcción y expresión de m22(scFv)-ETA' y m22(scFv)₂-ETA'

Se insertaron direccionalmente m22(scFv) (figura 1a) y m22(scFv)₂ amplificados mediante PCR en pBM1.1 resistente a kanamicina que contenía un operador *lac* inducible por IPTG, un péptido señal de *pe/B* seguido de una etiqueta His₁₀ escindible por enterocinasa y ETA' modificada (figura 1b). El dominio la deleciónado de la Exotoxina de *Pseudomonas* responsable del reconocimiento celular no específico se sustituyó de este modo por m22(scFv) o m22(scFv)₂' específico de CD64. La clonación exitosa se verificó mediante análisis de secuencia.

Después de la transformación se cultivaron *E. coli* BL21 Star™ (DE3) en condiciones de estrés osmótico en presencia de solutos compatibles. La inmunotoxina recombinante se dirigió al espacio periplásmico y el m22(scFv)-ETA' (SEC ID N°: 7) (M_r 67.000) o m22(scFv)₂-ETA' (SEC ID N°: 8) (M_r 106.000) funcional se purificó directamente mediante combinaciones de IMAC y SEC hasta una pureza de >90%. Al menos 1 mg de proteína purificada se preparó rutinariamente a partir de 1 l de cultivos de agitación bacterianos (figura 2a y 2c). Se secretó inmunotoxina recombinante intacta al compartimento periplásmico, como se visualiza mediante inmunotransferencia usando TC-1, un anticuerpo monoclonal específico de ETA' (figura 2b).

Propiedades de unión de inmunotoxina específica de CD64

- La fusión de las regiones codificantes de scFv a las secuencias codificantes de ETA' truncadas no afectó a la actividad de unión del formato de anticuerpo VH/VL. La inmunotoxina anti-CD64 recombinante purificada siempre se unía a fracciones de membrana celular de AML pero no a membranas de L540Cy negativas a CD64 y células intactas correspondientes medido por CM-ELISA (figura 4a) y citometría de flujo (figura 3b), respectivamente. La especificidad de CD64 se documentó mediante experimentos competitivos de CM-ELISA: la unión de m22(scFv)-ETA' frente a fracciones de membrana de HL-60 positivas a CD64 se inhibió ~70% por 10 µg/ml del Acmo m22 (figura 4c).

Actividad citotóxica *in vitro*

- Para caracterizar la actividad citotóxica de la inmunotoxina anti-CD64 recombinante *in vitro* los presentes inventores evaluaron la proliferación de diferentes células diana después de la incubación con diferentes cantidades de m22(scFv)-ETA' (SEC ID N°: 7). La inhibición del crecimiento de líneas celulares procedentes de AML HL-60 y U937 se documentó mediante un ensayo colorimétrico basado en XTT. Se observaron efectos tóxicos frente a células CD64⁺ con una CI₅₀ mediana calculada de 11,6 ng/ml en células HL-60 (figura 5a) y 12,9 ng/ml en células U937, respectivamente (figura 5b). La línea celular obtenida de Hodgkin negativa a CD64 L540Cy no se vio afectada por las concentraciones de proteína recombinante de hasta 10 µg/ml. Se realizaron experimentos análogos con la proteína bivalente m22(scFv)₂-ETA (figura 5d y 5e). La CI₅₀ en células HL-60 se determinó que era 11,715 ng/ml y en células U937, 13,54 ng/ml.

20 Análisis de la apoptosis en células de AML primarias

- Los efectos de m22(scFv)-ETA' sobre la inducción de la apoptosis en una población preparada recientemente de células de mieloma agudo de un paciente se examinaron mediante citometría de flujo. El inmunofenotipado mostró ~90% de células leucémicas. La expresión de CD64 en las células primarias se verificó directamente con m22(scFv)-GFP y en una estrategia de tipo sándwich con 22(scFv)-ETA' (figura 5a). Dos análisis de citometría de flujo con color usando Anexina V-FITC y PI (figura 5b) distinguieron cuatro poblaciones, células viables (cuadrante izquierdo inferior), apoptóticas tempranas (cuadrante derecho inferior), apoptóticas tardías/necróticas (cuadrante derecho superior) y necróticas (cuadrante izquierdo superior). Las células leucémicas negativas a CD64 obtenidas de paciente primarias tratadas con m22(scFv)-ETA' durante 18 horas permanecieron en su mayor parte viables (~90%). Las células de AML CD64⁺ obtenidas de paciente primarias tratadas con la inmunotoxina recombinante después de la incubación durante 18 horas mostraron poblaciones de células viables (~44%), apoptóticas tempranas (~41%) y apoptóticas tardías/necróticas (~15%).

Actividad citotóxica *in vivo*

- Para establecer la eficacia *in vivo* de inmunotoxinas anti-CD64 recombinantes se ensayó la capacidad de eliminar macrófagos activados de la piel en un modelo de ratón transgénico hCD64. La inflamación crónica se indujo mediante la aplicación epicutánea del irritante lauril sulfato sódico (al 5% en PBS), dando como resultado una inflamación cutánea crónica local. Las muestras de ensayo se inyectaron por vía intracutánea y se determinó la eficacia mediante tinción inmunohistoquímica para células que expresan CD64 en biopsias, tomadas de sitios cutáneos tratados después de 24 horas y comparación con sitios tratados con placebo. Se ensayaron dos inmunotoxinas anti-CD64 recombinantes, monovalente (m22(scFv)-ETA') (SEC ID N°: 7) y bivalente (m22(scFv)₂-ETA') (SEC ID N°: 8) y la eficacia expresada como el porcentaje de destrucción de células que expresan CD64 en comparación con placebo se comparó con una toxina unida químicamente basada en Ricina A (H22-Ricina A) y una toxina de ETA unida químicamente (M22-ETA), tabla 1. La inmunotoxina anti-CD64 recombinante bivalente mostró un aumento significativo en la destrucción de células que expresan CD64 *in vivo*, en comparación con la versión monovalente y con una curva de dosis respuesta similar en comparación con las inmunotoxinas unidas químicamente.

Tabla 1: eficacia como % de destrucción de células que expresan CD64 en comparación con placebo.

Concentración (M) de Toxina	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹
H22-Ricina A	99	91	79
M22-ETA	90	82	68
m22(scFv) ₂ -ETA'	97	88	74
m22(scFv)-ETA'	36	30	10

Referencias

- 5 1. Kaminski, M. S. , Zasadny, K. R., Francis, I. R., Fenner, M. C., Ross, C. W., Milik, A. W., Estes, J., Tuck, M., Regan, D., Fisher, S., Glenn, S. D. y Wahl, R. L. Iodine-131-anti-B1 radioimmunotherapy for B-cell lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 14: 1974-1981, 1996.
2. Pennel, C. A. y Erickson, H. A. Designing immunotoxins for cancer therapy. *Immunol Res.* 25: 177-191, 2002.
- 10 3. Chaudhary, V. K., Gallo, M. G., FitzGerald, D. J. y Pastan, I. A. Recombinant single chain immunotoxin composed of anti-Tac variable regions and a truncated diphtheria toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 9491-9494, 1990.
4. Brinkmann, U., Keppler- Hafkemeyer, A. y Hafkemeyer, P. Recombinant immunotoxins for cancer therapy. *Expert Opin. Biol. Ther.* 1: 693-702, 2001.
- 15 5. Frankel, A. E., Tagge, E. P. y Willingham, M. C. Clinical trials of targeted toxins. *Semin. Cancer Biol.* 6: 307-317, 1995.
6. Youle, R. J., Newton, D., Wu, Y. N., Gadina, M. y Rybak, S. M. Cytotoxic ribonucleases and chimeras in cancer therapy. *Crit. Rev. Ther. Drug carrier Syst* 10: 1-28, 1993.
- 20 7. Fett, J. W., Strydom, D. J., Lobb, R. R., Aldermann, E. M., Bethune, J. L., Riordan, J. F. y Vallee, B. L. isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells. *Biochemistry* 24: 5480-5486, 1985.
8. Huhn, M., Sasse, S., Tur, M. K., Matthey, B., schinkothe, T., Rybak, S. M., Barth, S. y Engert, A. Human angiogenin fused to human CD30 ligand (Ang-CD30L) exhibits specific cytotoxicity against CD30-positive lymphoma. *Cancer Res.* 61: 8737-8742, 2001.
- 25 9. Newton, D. L. y Rybak, S. M. Preparation and preclinical characterization of of RNase-based immunofusion proteins. *Methods Mol. Biol.* 160: 387-406, 2001.
10. Fossati, G., Bucknall, R. C. y Edwards, S. W. Fcγ receptors in autoimmune diseases. *Eur. J. Clin. Invest.* 31: 821-831, 2001.
11. Menendez, P., del Canizo, M. C. y Orfao, A. Immunophenotypic characteristics of PB-mobilised CD34+ hematopoietic progenitor cells. *J. Biol. Regul. Homeost. Af'gents* 15: 53-61, 2001.
- 30 12. Liu Yin, J. A., Minimal residual disease in acute myeloid leukaemia. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 15: 119-135, 2002.
13. Carter, P. Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nat. Rev. Cancer* 1: 118-129, 2001.
- 35 14. Zhong, R. K., van de Winkel, J. G., Thepen, T., Schultz, L. D. y Ball, E. D. Cytotoxicity of anti-CD64-ricin a chain immunotoxin against human acute myeloid leukaemia cells in vitro and in SCID mice. *J. Hemather. Stem Cell Res.* 10: 95-105, 2001.
15. Bera, T. K., Williams-Gould, J., Beers, R., Chowdhury, P. y Pastan, I. Bivalent disulfide-stabilized fragment variable immunotoxin directed against mesotheliomas and ovarian cancer. *Mol. Cancer Ther.* 1: 79-84, 2001.
- 40 16. 16Barth S., Huhn M., Wels W., Diehl V., Engert A. Construction and /in vitro/ evaluation of

RFT5(scFv)-ETA', a new recombinant single-chain immunotoxin with specific cytotoxicity toward CD25+ Hodgkin-derived cell lines. *Int. J. Molec. Med.* 1: 249-256 (1998).

17. Sambrook, J., Fritsch, E. y Maniatis, T. (eds.). *Molecular Cloning. A laboratory manual.*
- 5 18. Jost, L. M., Kirkwood, J. M. y Whiteside, T. L. Improved short- and long-term XTT-based colorimetric cellular cytotoxicity assay for melanoma and other tumor cells. *J. Immunol. Methods*, 147: 153-165, 1992.
19. Tur M. K., Huhn M., Sasse S., Engert A., Barth S. - Selection of scFv phages on intact cells under low pH conditions leads to a significant loss of insert-free phages. *BioTechniques* 30 (2): 404-413 (2001).
- 10 20. McGowan J. L., Kessler S. P., Anderson D. C., Galloway D. R. Immunochemical analysis of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. Analysis of the His426 determinant. *J. Biol. Chem.* 266(8): 4911-4916 (1991).

REIVINDICACIONES

1. Un complejo recombinante que tiene al menos un componente A, al menos un componente B, comprendiendo el componente A dos o más dominios de unión para el receptor de superficie celular CD64 y siendo el componente B un dominio de destrucción de células en el que el complejo es el
- 5 complejo recombinante monovalente m22(scFv)₂-ETA' (SEC ID N°: 8) o el complejo bivalente m22(scFv)₂-ETA' (SEC ID N°: 8).
2. Moléculas de ácido nucleico que codifican el complejo recombinante diseñado de acuerdo con la reivindicación 1 para el complejo completo.
3. Vectores que comprenden una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 2.
- 10 4. Células diferentes de las células madre embrionarias humanas u organismos no humanos que sintetizan el complejo recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, que se pueden obtener transformando o transfectando las mismas con moléculas de ácido nucleico de la reivindicación 2 o vectores de acuerdo con la reivindicación 3.
- 15 5. Los organismos o células de acuerdo con la reivindicación 4, en los que los organismos son procariotas, tales como *E. coli*, *B. subtilis*, *S. carnosus*, *S. coelicolor* o *Marinococcus sp.*, eucariotas inferiores, tales como *Saccharomyces sp.*, *Aspergillus sp.*, *Spodoptera sp.* o *P. pastoris*.
- 20 6. Medicamento que comprende un complejo de acuerdo con la reivindicación 1, moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 2, vectores de acuerdo con la reivindicación 3, células aisladas y/o extractos de las mismas de acuerdo con la reivindicación 4 ó 5, organismo unicelular, tal como procariotas y eucariotas inferiores o extractos de los organismos de acuerdo con las reivindicaciones 4 ó 5.
7. Uso del complejo de acuerdo con la reivindicación 1 y/o de las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 2 y/o los vectores de acuerdo con la reivindicación 3 en la fabricación de un medicamento para influir en el crecimiento celular y la fisiología de células CD64⁺.
- 25 8. Uso del complejo de acuerdo con la reivindicación 1, o de las moléculas de ácido nucleico que codifican el mismo de acuerdo con la reivindicación 2, o de los vectores de acuerdo con la reivindicación 3 y/o de células u organismos de acuerdo con la reivindicación 4 ó 5, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de leucemia mieloide aguda, reacciones de inflamación crónica, tales como enfisema, asma intrínseca y extrínseca, dermatitis atópica, erupción polimorfa lumínica, LES, injerto contra huésped, esclerosis múltiple, síndrome de activación de macrófagos, artritis reumatoide, artritis juvenil, enfermedad de Crohn y enfermedad intestinal crónica.
- 30 9. Un procedimiento para producir el complejo recombinante de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende las siguientes etapas:
- 35 (a) transformar/transfectar células diferentes de células madre embrionarias humanas, microorganismos tales como bacterias, hongos y/o ciliados con las moléculas de ácido nucleico o vectores de acuerdo con la reivindicación 2 y/o 3;
- (b) cultivar las células, microorganismos y/u organismos de la etapa (a) en condiciones adecuadas para la expresión génica y síntesis proteica para acumular el complejo recombinante intracelularmente o en el medio de cultivo circundante; y
- 40 (c) aislar y purificar el complejo recombinante de la etapa (b).

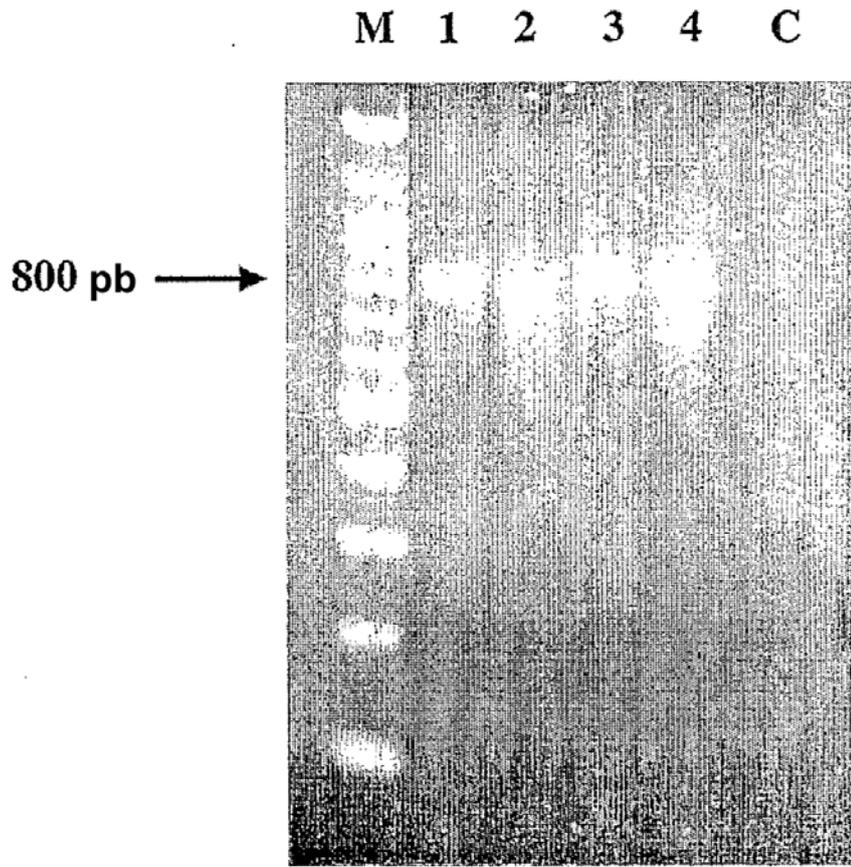


Fig.1a

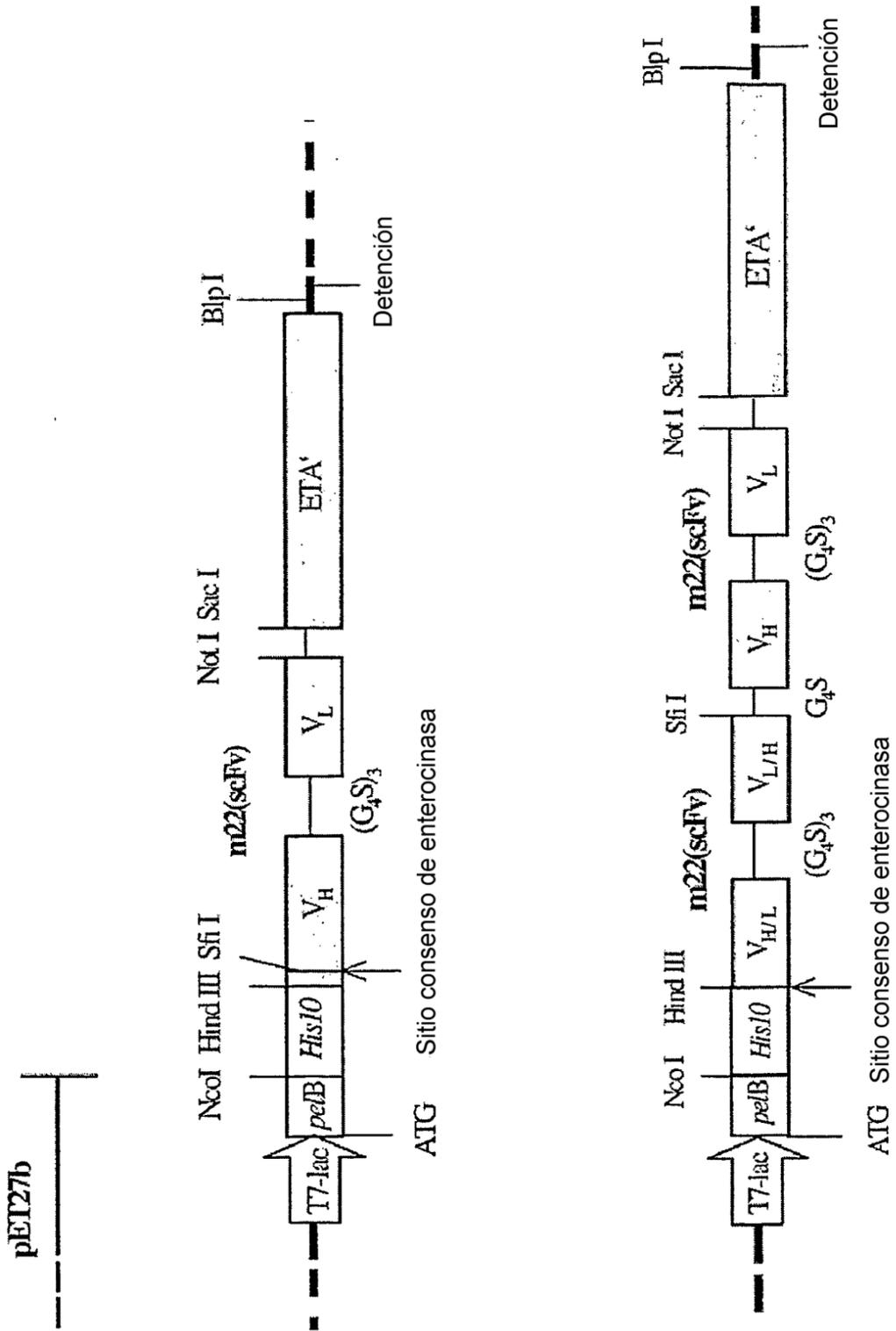


Fig.1b

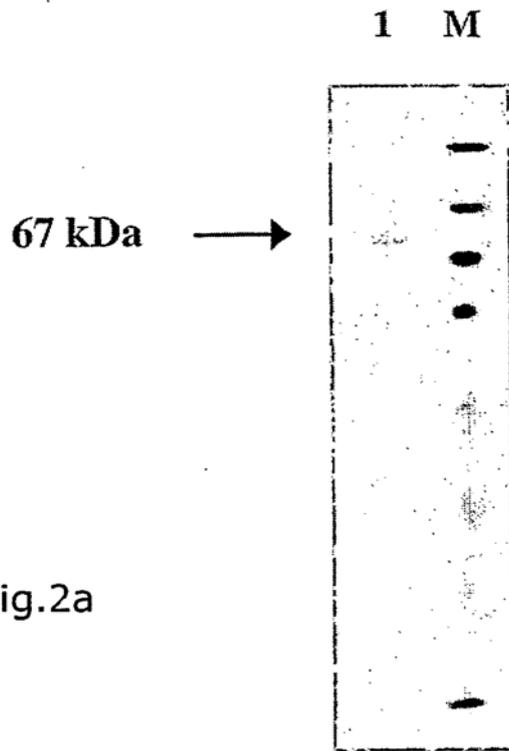


Fig.2a

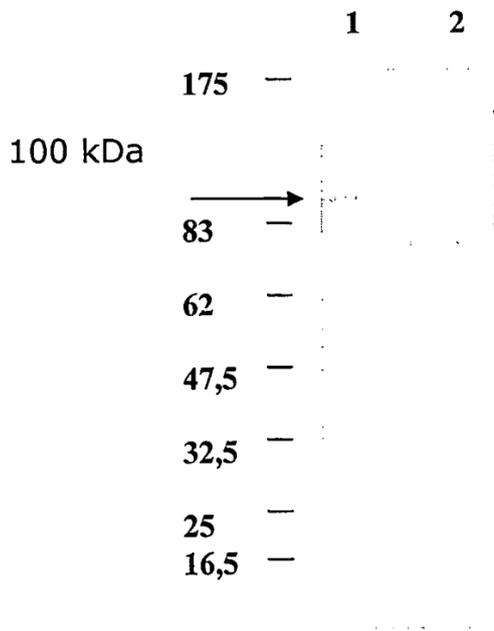
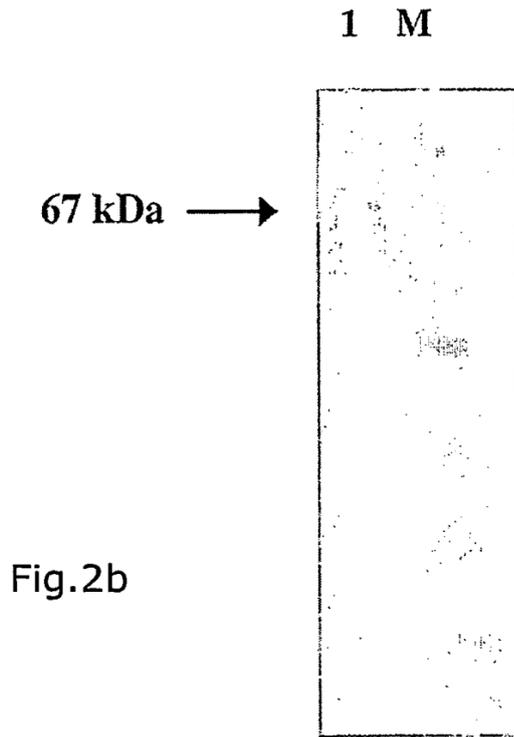


Fig.2c

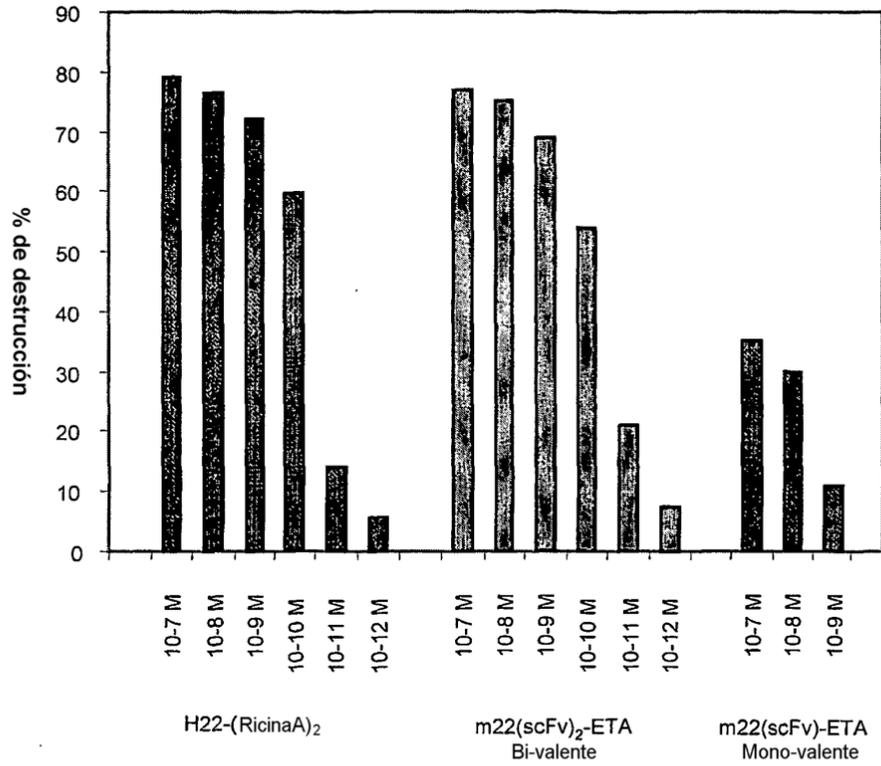


Fig.3

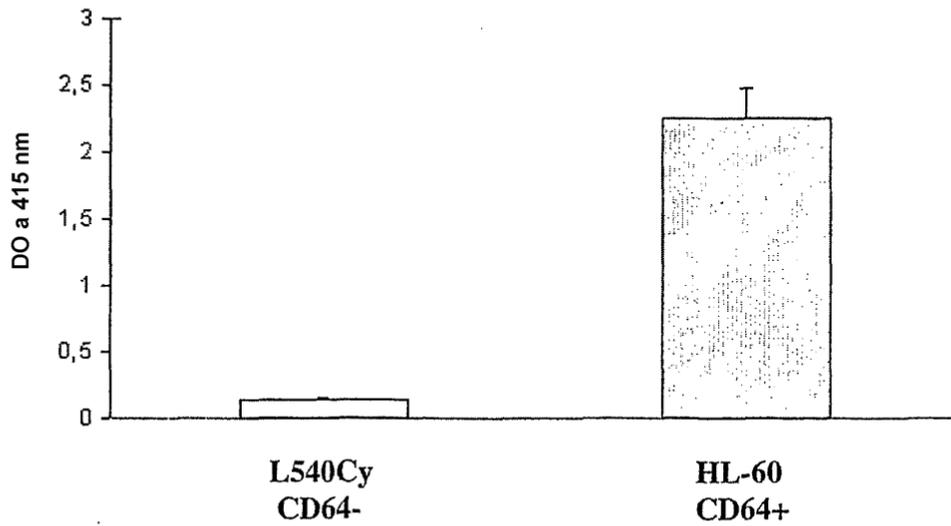


Fig.4a

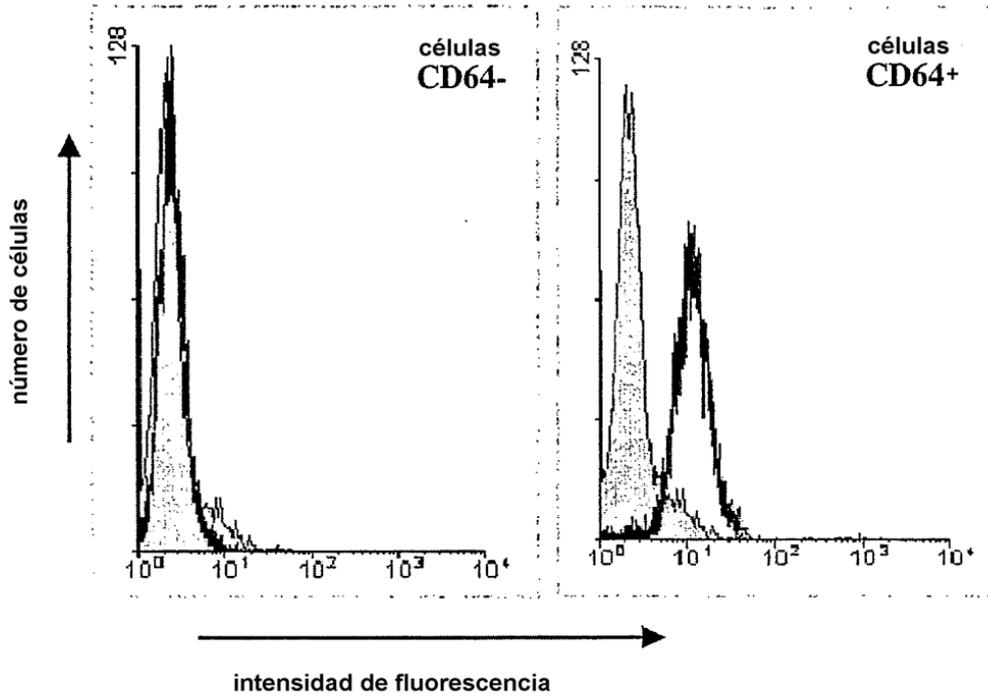
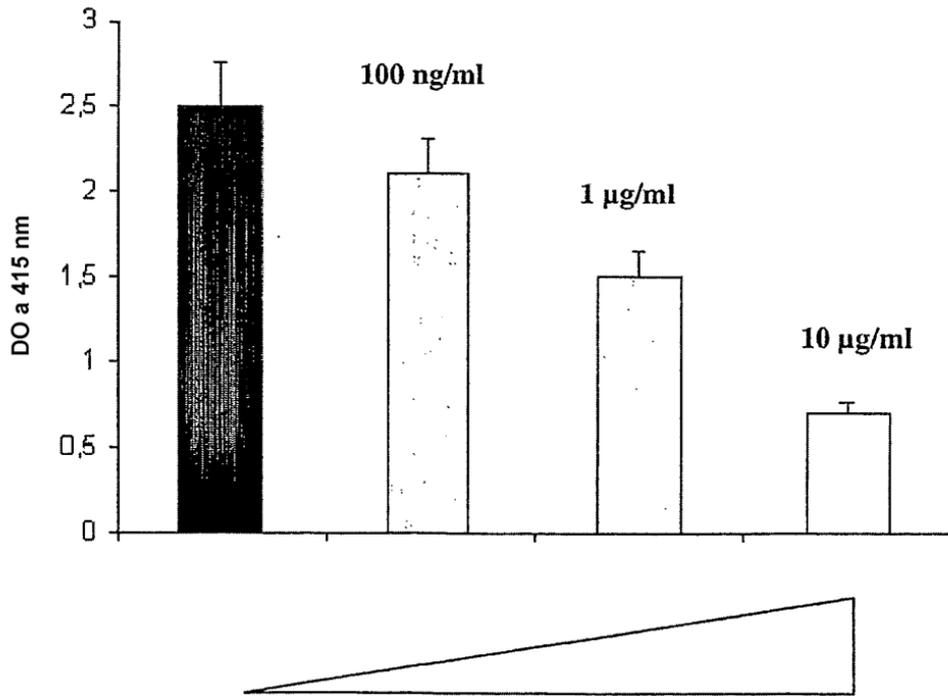


Fig.4b



[c] acmo m22

Fig.4c

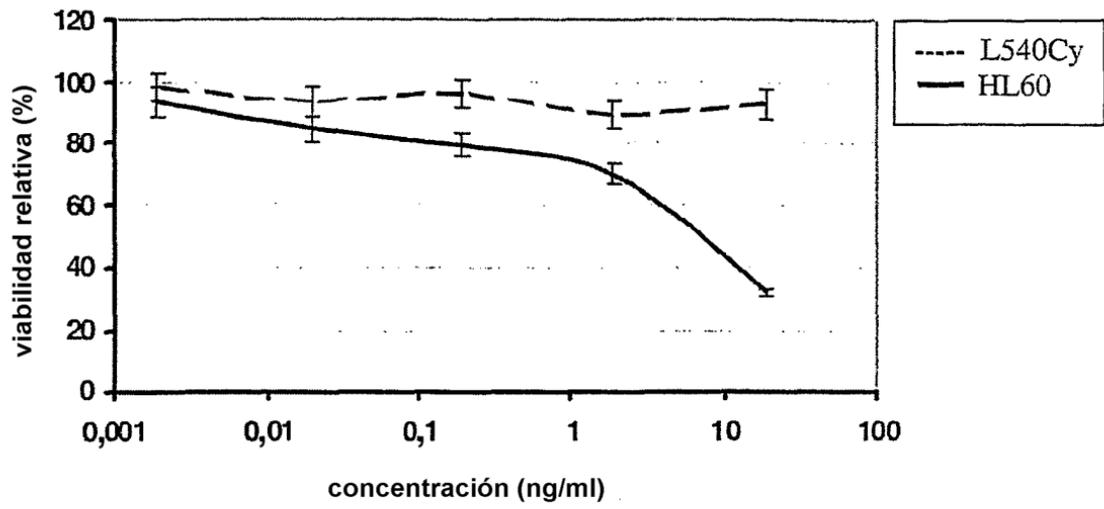


Fig.5a

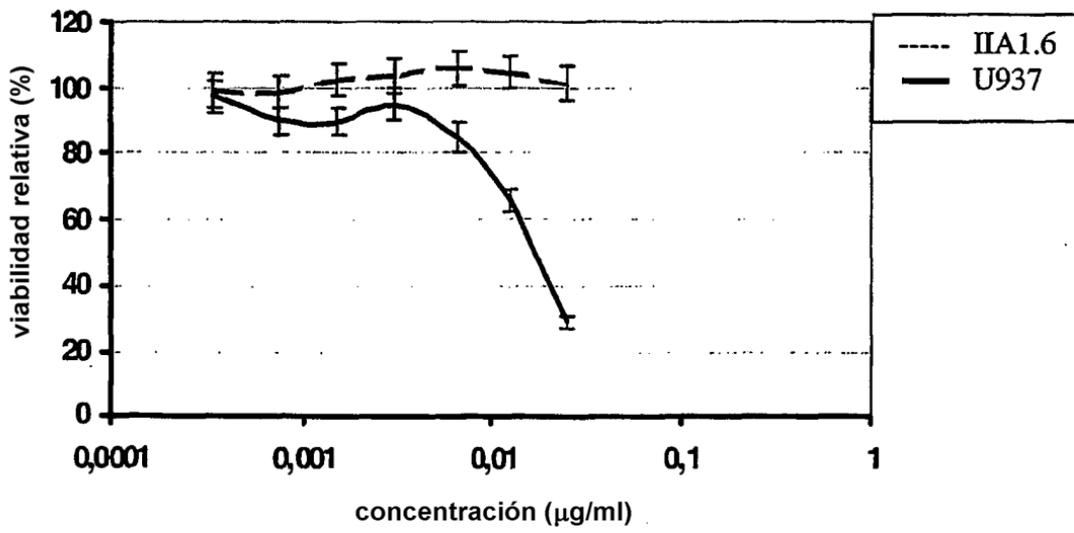


Fig.5b

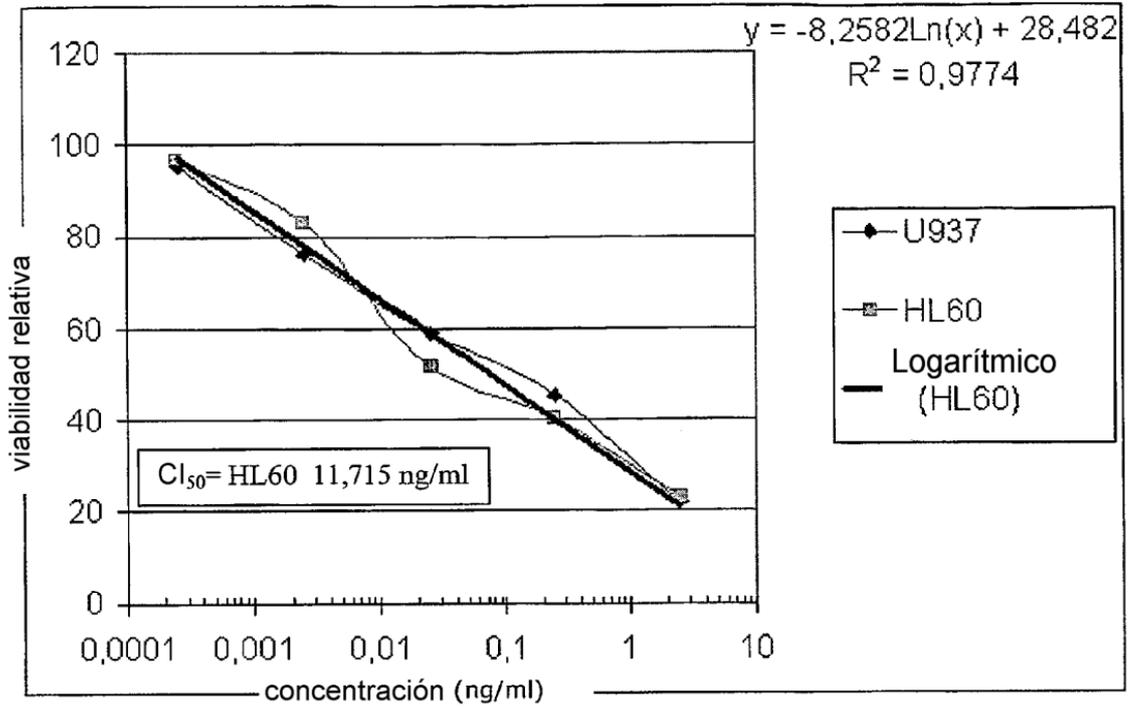


Fig.5c

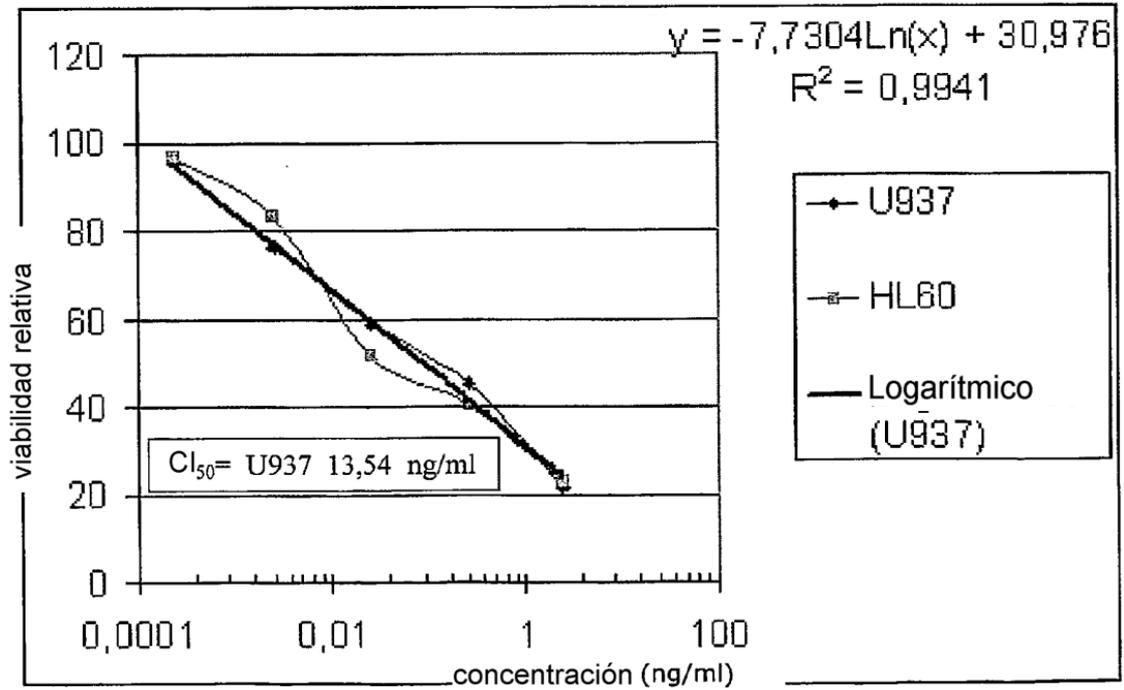


Fig.5d

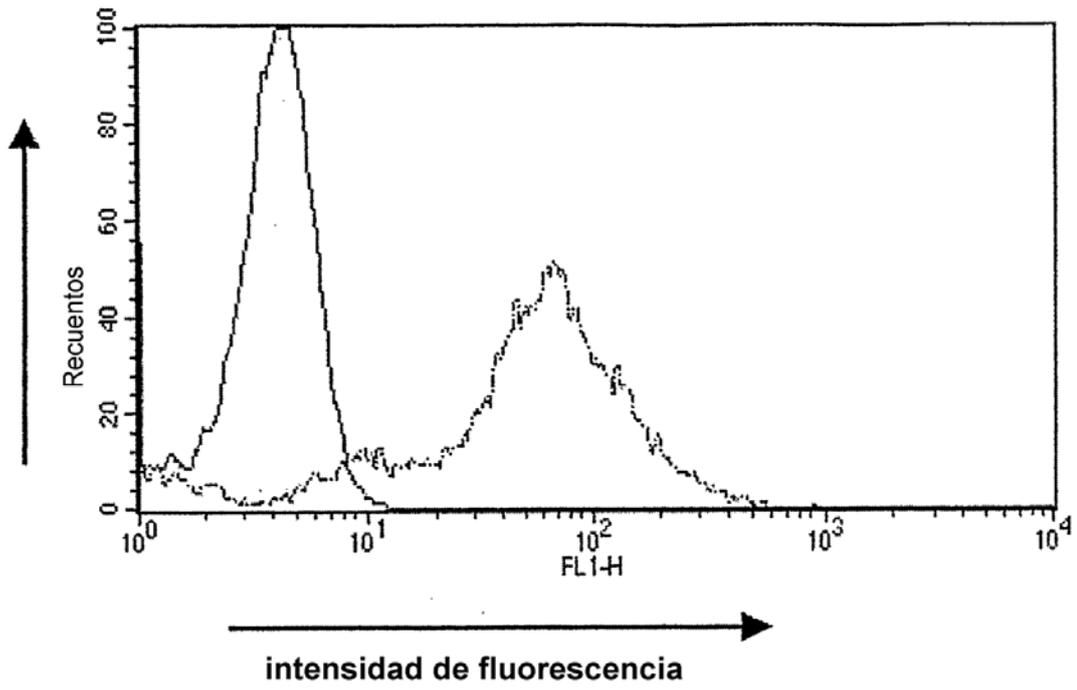


Fig.6a

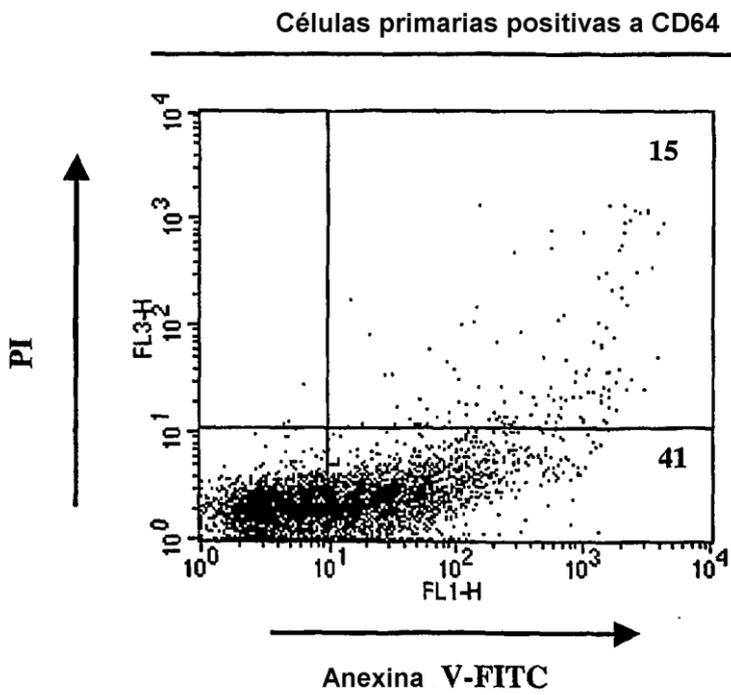
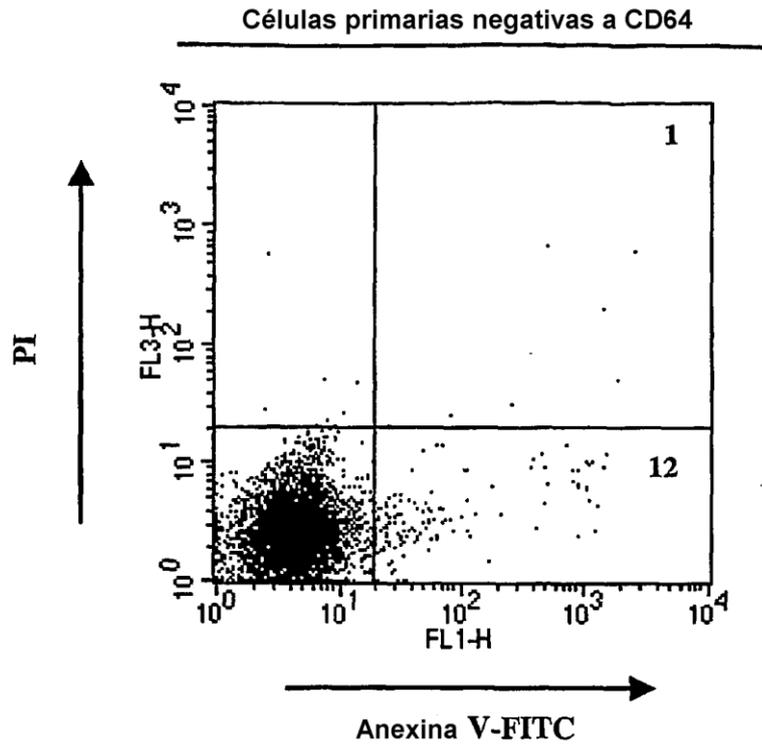


Fig.6b

Fig. 7

m22 (scFv) Inverso: 5' atggctcagg gtgcggccca gccggccatg gcccaggtgc agctgggtgg 3'

m22 (scFv) Directo: 5' gagtcattct cgacttgccg ccgctttgat ctccagcttg gtcc 3'

m22 (inverso: 5' gagcccaagc ttatggccca ggtgcagctg gtg 3'

m22 Directo: 5' gcaactgcgg ccggctgggc ccgccgctgg gccgacgagc caccgccacc
tttgatctcc agcttggctcc cttgg 3'

Fig. 8

```

atgaaatacc tgctgccgac cgctgctgct ggtctgctgc tcctcgctgc ccagccggcg 60
atggccatgg gccatcatca tcatcatcat catcatcatc acagcagcgg ccatatcgac 120
gacgacgaca agcatatgaa gottatggcc cagccggcca tggcccaggt gcagctggtg 180
gagagcggtg gaggtggtgt gcaacctggc cggtcctctg gcctgtcctg ctctctgtct 240
ggcttcattt tcagtgacaa ttacatgtat tgggtgagac aggcacctgg aaaaggtctt 300
gagtggggtg caaccattag tgatgggtgt agttacacct actatccaga cagtgtgaag 360
ggaagattta caatatcgag agacaacagc aagaacacat tgttcctgca aatggacagc 420
ctgagaccgg aagacaccgg ggtctatfff tgtgcaagag gctactatag gtacgagggg 480
gctatggact actggggcca agggaccccc gtcaccctga gctcaggagg tggcggctcc 540
ggagtgagg gacgaggagg gggcggatcc gacatccagc tgaccagag cccaagcagc 600
ctgagcgcca gcgtgggtga cagagtgacc atcacctgta agtccagtca aagtgcacac 660
cagctgaccc agagcccaag cagcctgagc gccagcgtgg gtgacagagt gaccatcacc 720
tgtaagtcca gtcaaagtgt tttatacagt tcaaatacaga agaactactt ggctgtgtac 780
cagcagaagc caggtgaaggc tccaaagctg ctgatctact gggcatccac tagggaatct 840
ggtgtgccaa gcagattcag cggtagcggg agcgggtacc acttcacctt caccatcagc 900
agcctccagc cagaggacat cgccacctac tactgccatc aatacctctc ctctgtggagc 960
ttcggccaag ggaccaagct ggagatcaaa gcgcccgag agctcgcttc cggagggtccc 1020
gagggcggca gcctggccgc gctgaccgcg caccaggcct gccacctgcc gctggagact 1080
ttcaccgctc atcgccagcc gcgcggctgg gaacaactgg agcagtgcgg ctatccggtg 1140
cagcggctgg tcgccctcta cctggcggcg cgactgtcat ggaaccaggt cgaccaggtg 1200
atccgcaacg ccctggccag ccccggcagc ggcgggcacc tgggcgaagc gatccgcgag 1260
cagccggagc aggcccgctc cgcgctgacc ctggccgccc ccgagagcga gcgcttcgtc 1320
cggcagggca ccggcaacga cagggcggga gcggccaacg ccgacgtggt gagcctgacc 1380
tgcccggctg ccgcccgtga atgcgcgggc ccggcggaca gcggcgacgc cctgctggag 1440
cgcaactatc cactggcgc ggagtctctc ggcgacggcg gcgacgtcag cttcagcacc 1500
cgcggcacgc agaactggac ggtggagcgg ctgctccagg cgcaccgcca actggaggag 1560
cgcggtatg tgttcgtcgg ctaccacggc accttctctg aagcggcgca aagcatcgtc 1620
ttcggcgggg tgccgcgcgc cagccaggac ctcgacgca tctggcgcgg tttctatatac 1680
gccggcgatc cggcgtggc ctacgcctac gccaggacc aggaaccgga cgcacgcggc 1740
cggatccgca acggtgccct gctgcgggtc tatgtgccgc gctctagcct gccgggcttc 1800
taccgacca gcctgacctt ggccgcgccc gaggcggcgg gcgaggtcga acggctgatc 1860
ggccatccgc tgccgctgcg cctggacgcc atcaccggcc ccgaggagga aggcgggcgc 1920
ctggagacca ttctcggctg gccgctggcc gagcgcaccg tggtgattcc ctcggcgatc 1980
cccaccgacc cgcgcaacgt cggcggcgac ctcgacctgt ccagcatccc cgacaaggaa 2040
caggcaatca gcgccctgcc ggactacgcc agccagcccc gcaaaccgcc gcgcgaggac 2100
ctgaagtaa 2109

```

Fig. 9

```

atgaaatacc  tgctgccgac  cgctgctgct  ggtctgctgc  tcctcgtgctc  ccagccggcg  60
atggccatgg  gccatcatca  tcatcatcat  catcatcatc  atcacagcgg  ccatatcgac  120
gacgacgaca  agcatatgaa  gcttatggcc  acgggtgcagc  tggtaggagag  cggtaggaggt  180
gttgtagaac  ctggccggtc  cctgcgcctg  tcctgctcct  cgtctggctt  cattttcagt  240
gacaattaca  tgtattgggt  gagacaggca  cctggaaaag  gtcttgagtg  ggttgcaacc  300
attagtgatg  gtggtagtta  cacctactat  ccagacagtg  tgaaggaag  atttacaata  360
tcgagagaca  acagcaagaa  cacattgttc  ctgcaaatgg  acagcctgag  acccgaagac  420
accgggtct  atttttgtgc  aagaggctac  tataggtagc  agggggctat  ggactactgg  480
ggccaagggg  ccccggtcac  cgtgagctca  ggaggtggcg  gctccggagg  tggaggcagc  540
ggagggggcg  gatccgacat  ccagctgacc  cagagcccaa  gcagcctgag  cgccagcgtg  600
ggtgacagag  tgacctcac  ctgtaagtcc  agtcaaagtg  acatccagct  gaccagagc  660
ccaagcagcc  tgagcgccag  cgtgggtgac  agagtgacca  tcacctgtaa  gtccagtcaa  720
agtgttttat  acagttcaaa  tcagaagaac  tacttggcct  ggtaccagca  gaagccaggt  780
aaggctccaa  agctgctgat  ctactgggca  tccactaggg  aatctggtgt  gccaagcaga  840
ttcagcggta  gcggtagcgg  taccgacttc  accttcacca  tcagcagcct  ccagccagag  900
gacatcgcca  cctactactg  ccatcaatac  ctctcctcgt  ggacgttcgg  ccaagggacc  960
aagctggaga  tcaaaggtgg  cggtaggctcg  tcggcccagc  cggccatggc  ccaggtgcag  1020
ctggtggaga  gcggtggagg  tgttgtgcaa  cctggccggg  ccctgcgcct  gtctgctcc  1080
tcgtctggct  tcattttcag  tgacaattac  atgtattggg  tgagacaggc  acctggaaaa  1140
ggtcttgagt  gggttgcaac  cattagtgat  ggtggtagtt  acacctacta  tccagacagt  1200
gtgaagggaa  gatttacaat  atcgagagac  aacagcaaga  acacattgtt  ctgcaaatg  1260
gacagcctga  gaccggaaga  caccggggtc  tattttgtg  caagaggcta  ctataggtac  1320
gagggggcta  tggactactg  gggccaaggg  acccgggtca  ccgtgagctc  aggaggtggc  1380
ggctccggag  gtggaggcag  cggagggggc  ggatccgaca  tccagctgac  ccagagccca  1440
agcagcctga  gcgccagcgt  gggtagacaga  gtgacctca  cctgtaagtc  cagtcaaagt  1500
gacatccagc  tgaccagag  cccaagcagc  ctgagcgcca  gcgtgggtga  cagagtgacc  1560
atcacctgta  agtccagtca  aagtgtttta  tacagttcaa  atcagaagaa  ctacttggcc  1620
tggtaccagc  agaagccagg  taaggctcca  aagctgctga  tctactgggc  atccactagg  1680
gaatctgggt  tgccaagcag  attcagcggg  agcggtagcg  gtaccgactt  caccttcaac  1740
atcagcagcc  tccagccaga  ggacatcgcc  acctactact  gccatcaata  cctctcctcg  1800
tggacgttcg  gccaagggac  caagctggag  atcaaagcgg  ccgagagct  cgcttccgga  1860
ggtcccaggg  gcggcagcct  ggccgcgctg  accgcgcacc  aggcctgcca  cctgccgctg  1920
gagactttca  cccgtcatcg  ccagccgcgc  ggctgggaac  aactggagca  gtgcccgtat  1980
ccggtgcagc  ggctggtcgc  cctctacctg  gcggcgcgac  tgtcatggaa  ccaggtcgac  2040
caggtgatcc  gcaacgccct  ggccagcccc  ggcagcggcg  gcgacctggg  cgaagcgatc  2100
cgcgagcagc  cggagcaggc  ccgtctcgcg  ctgacctgg  ccgccgccga  gagcagcgc  2160
ttcgtccggc  agggcaccgg  caacgacgag  gcgggagcgg  ccaacgccga  cgtggtgagc  2220
ctgacctgcc  cggctgccgc  cggatgatgc  gcgggcccgg  cggacagcgg  cgacgcctt  2280
ctggagcga  actatcccac  tggcgcggag  ttctcggcg  acggcggcga  cgtcagctt  2340
agcaaccgcg  gcacgcagaa  ctggacggtg  gageggtgc  tccaggcgca  ccgccaactg  2400
gaggagcgcg  gctatgtgtt  cgtcggctac  cacggcaact  tcctcgaagc  ggcgcaaagc  2460
atcgtcttcg  gcggggtgcg  cgcgcgcagc  caggacctcg  acgcgatctg  gcgcggttt  2520
tatatgccg  gcgatccggc  gctggcctac  gcctacgccc  aggaccagga  accgacgca  2580
cgcggccgga  tccgcaacgg  tgccctgctg  cgggtctatg  tgccgcgctc  tagcctgccc  2640
ggcttctacc  gcaccagcct  gaccctggcc  gcgcgggagg  cggcggggca  ggtcgaacgg  2700
ctgatcggcc  atccgctgcc  gctgcgcctg  gacgccatca  ccggccccga  ggaggaaggc  2760
gggcgcctgg  agaccattct  cggctggccg  ctggccgagc  gcaccgtggt  gattccctcg  2820
gcgatcccca  ccgaccgcg  caacgtcggc  ggcgacctcg  acccgtccag  catccccgac  2880
aaggaacagg  cgatcagcgc  cctgccggac  tacgccagcc  agcccggcaa  accgccgcgc  2940
gaggacctga  agtaa  2955

```

Fig. 10

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
 1 5 10 15
 Ala Gln Pro Ala Met Ala Met Gly His His His His His His His
 20 25 30
 His His Ser Ser Gly His Ile Asp Asp Asp Asp Lys His Met Lys Leu
 35 40 45
 Met Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
 50 55 60
 Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ser Ser
 65 70 75 80
 Gly Phe Ile Phe Ser Asp Asn Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro
 85 90 95
 Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Asp Gly Gly Ser Tyr
 100 105 110
 Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 115 120 125
 Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu
 130 135 140
 Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Tyr Tyr Arg Tyr Glu Gly
 145 150 155 160
 Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Gly
 165 170 175
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile
 180 185 190
 Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
 195 200 205
 Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln
 210 215 220
 Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
 225 230 235 240
 Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr
 245 250 255
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 260 265 270
 Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 275 280 285
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 290 295 300
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Leu Ser Ser Trp Thr
 305 310 315 320

ES 2 358 022 T3

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu Leu Ala
 325 330 335

Ser Gly Gly Pro Glu Gly Gly Ser Leu Ala Ala Leu Thr Ala His Gln
 340 345 350

Ala Cys His Leu Pro Leu Glu Thr Phe Thr Arg His Arg Gln Pro Arg
 355 360 365

Gly Trp Glu Gln Leu Glu Gln Cys Gly Tyr Pro Val Gln Arg Leu Val
 370 375 380

Ala Leu Tyr Leu Ala Ala Arg Leu Ser Trp Asn Gln Val Asp Gln Val
 385 390 395 400

Ile Arg Asn Ala Leu Ala Ser Pro Gly Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu
 405 410 415

Ala Ile Arg Glu Gln Pro Glu Gln Ala Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala
 420 425 430

Ala Ala Glu Ser Glu Arg Phe Val Arg Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu
 435 440 445

Ala Gly Ala Ala Asn Ala Asp Val Val Ser Leu Thr Cys Pro Val Ala
 450 455 460

Ala Gly Glu Cys Ala Gly Pro Ala Asp Ser Gly Asp Ala Leu Leu Glu
 465 470 475 480

Arg Asn Tyr Pro Thr Gly Ala Glu Phe Leu Gly Asp Gly Gly Asp Val
 485 490 495

Ser Phe Ser Thr Arg Gly Thr Gln Asn Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu
 500 505 510

Gln Ala His Arg Gln Leu Glu Glu Arg Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr
 515 520 525

His Gly Thr Phe Leu Glu Ala Ala Gln Ser Ile Val Phe Gly Gly Val
 530 535 540

Arg Ala Arg Ser Gln Asp Leu Asp Ala Ile Trp Arg Gly Phe Tyr Ile
 545 550 555 560

Ala Gly Asp Pro Ala Leu Ala Tyr Ala Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro
 565 570 575

Asp Ala Arg Gly Arg Ile Arg Asn Gly Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val
 580 585 590

Pro Arg Ser Ser Leu Pro Gly Phe Tyr Arg Thr Ser Leu Thr Leu Ala
 595 600 605

Ala Pro Glu Ala Ala Gly Glu Val Glu Arg Leu Ile Gly His Pro Leu
 610 615 620

Fig. 11

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
 1 5 10 15
 Ala Gln Pro Ala Met Ala Met Gly His His His His His His His
 20 25 30
 His His His Ser Gly His Ile Asp Asp Asp Asp Lys His Met Lys Leu
 35 40 45
 Met Ala Thr Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro
 50 55 60
 Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ser Ser Gly Phe Ile Phe Ser
 65 70 75 80
 Asp Asn Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 85 90 95
 Trp Val Ala Thr Ile Ser Asp Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp
 100 105 110
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
 115 120 125
 Leu Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr
 130 135 140
 Phe Cys Ala Arg Gly Tyr Tyr Arg Tyr Glu Gly Ala Met Asp Tyr Trp
 145 150 155 160
 Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 165 170 175
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser
 180 185 190
 Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 195 200 205
 Lys Ser Ser Gln Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
 210 215 220
 Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln
 225 230 235 240
 Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln
 245 250 255
 Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr
 260 265 270
 Arg Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 275 280 285
 Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr
 290 295 300

ES 2 358 022 T3

Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Leu Ser Ser Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr
 305 310 320
 Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Ser Ala Gln Pro Ala Met
 325 330 335

 Ala Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly
 340 345 350

 Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ser Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asp
 355 360 365

 Asn Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 370 375 380

 Val Ala Thr Ile Ser Asp Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser
 385 390 395 400

 Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
 405 410 415

 Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe
 420 425 430

 Cys Ala Arg Gly Tyr Tyr Arg Tyr Glu Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 435 440 445

 Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 450 455 460

 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro
 465 470 475 480

 Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys
 485 490 495

 Ser Ser Gln Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 500 505 510

 Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser
 515 520 525

 Val Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
 530 535 540

 Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
 545 550 555 560

 Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 565 570 575
 Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr
 580 585 590

 Tyr Cys His Gln Tyr Leu Ser Ser Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
 595 600 605

 Leu Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu Leu Ala Ser Gly Gly Pro Glu Gly
 610 615 620

 Gly Ser Leu Ala Ala Leu Thr Ala His Gln Ala Cys His Leu Pro Leu
 625 630 635 640

ES 2 358 022 T3

Glu Thr Phe Thr Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Glu
 645 650 655
 Gln Cys Gly Tyr Pro Val Gln Arg Leu Val Ala Leu Tyr Leu Ala Ala
 660 665 670
 Arg Leu Ser Trp Asn Gln Val Asp Gln Val Ile Arg Asn Ala Leu Ala
 675 680 685
 Ser Pro Gly Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu Ala Ile Arg Glu Gln Pro
 690 695 700
 Glu Gln Ala Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala Ala Ala Glu Ser Glu Arg
 705 710 715 720
 Phe Val Arg Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu Ala Gly Ala Ala Asn Ala
 725 730 735
 Asp Val Val Ser Leu Thr Cys Pro Val Ala Ala Gly Glu Cys Ala Gly
 740 745 750
 Pro Ala Asp Ser Gly Asp Ala Leu Leu Glu Arg Asn Tyr Pro Thr Gly
 755 760 765
 Ala Glu Phe Leu Gly Asp Gly Gly Asp Val Ser Phe Ser Thr Arg Gly
 770 775 780
 Thr Gln Asn Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu Gln Ala His Arg Gln Leu
 785 790 795 800
 Glu Glu Arg Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr His Gly Thr Phe Leu Glu
 805 810 815
 Ala Ala Gln Ser Ile Val Phe Gly Gly Val Arg Ala Arg Ser Gln Asp
 820 825 830
 Leu Asp Ala Ile Trp Arg Gly Phe Tyr Ile Ala Gly Asp Pro Ala Leu
 835 840 845
 Ala Tyr Ala Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro Asp Ala Arg Gly Arg Ile
 850 855 860
 Arg Asn Gly Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val Pro Arg Ser Ser Leu Pro
 865 870 875 880
 Gly Phe Tyr Arg Thr Ser Leu Thr Leu Ala Ala Pro Glu Ala Ala Gly
 885 890 895
 Glu Val Glu Arg Leu Ile Gly His Pro Leu Pro Leu Arg Leu Asp Ala
 900 905 910
 Ile Thr Gly Pro Glu Glu Glu Gly Gly Arg Leu Glu Thr Ile Leu Gly
 915 920 925
 Trp Pro Leu Ala Glu Arg Thr Val Val Ile Pro Ser Ala Ile Pro Thr
 930 935 940
 Asp Pro Arg Asn Val Gly Gly Asp Leu Asp Pro Ser Ser Ile Pro Asp
 945 950 955 960

Lys Glu Gln Ala Ile Ser Ala Leu Pro Asp Tyr Ala Ser Gln Pro Gly
965 970 975

Lys Pro Pro Arg Glu Asp Leu Lys
980