



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 364 462**

51 Int. Cl.:
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04700749 .7**
96 Fecha de presentación : **08.01.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1608307**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.12.2005**

54 Título: **Fragmento de anticuerpo capaz de modular la multirresistencia y composiciones y kits y métodos que utilizan el mismo.**

30 Prioridad: **02.04.2003 US 405123**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.09.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.09.2011

73 Titular/es: **TECHNION RESEARCH AND
DEVELOPMENT FOUNDATION, Ltd.
Senate House, Technion City
Haifa 32000, IL**

72 Inventor/es: **Reiter, Yoram y
Haus-Cohen, Maya**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 364 462 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

Fragmento de anticuerpo capaz de modular la multiresistencia y composiciones y kits y métodos que utilizan el mismo

CAMPO Y ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5 La presente descripción se refiere a un fragmento de anticuerpo capaz de fijarse a la glicoproteína P asociada con células multifarmaco-resistentes (MDR). La presente descripción se refiere también a composiciones y métodos que utilizan dicho fragmento de anticuerpo para inhibir la actividad de eflujo de fármaco en las células MDR del cáncer.

10 La quimioterapia del cáncer falla a menudo debido al desarrollo de resistencia adquirida o intrínseca en las células cancerosas a una gran diversidad de fármacos anticáncer, tales como colchicina, vinblastina, vincristina y doxorubicina. Este fenómeno, que se conoce como multiresistencia (MDR), es una barrera importante para la quimioterapia del cáncer.

15 Un mecanismo fundamental de la MDR es la sobreexpresión de una bomba de eflujo dependiente de energía, conocida como el transportador de multifármacos. Esta bomba de eflujo es una glicoproteína P (Pgp) de 170 kDa, codificada por el gen MDR1. La MDR mediada por Pgp juega un papel importante en la resistencia de diversas células tumorales a la quimioterapia; estudios realizados han demostrado una correlación clara entre la expresión de *mdr1* y la falta de respuesta a la quimioterapia (6, 7).

20 Los inhibidores del fenotipo MDR en las células del cáncer pueden modificar o alterar la expresión de la función de eflujo de fármaco de las proteínas transportadoras implicadas en la MDR. Los inhibidores conocidos de la MDR incluyen verapamil (un bloqueador de los canales de calcio y que se utiliza para el tratamiento de la leucemia), ciclosporinas, esteroides, e inhibidores de calmodulina (que aumentan la acumulación intracelular y la acción citotóxica de los fármacos transportados por Pgp). Sin embargo, la mayoría de los fármacos moduladores de la MDR conocidos disponibles actualmente para aplicación clínica tienen importantes efectos secundarios que limitan sustancialmente su valor terapéutico.

25 Recientemente, se han desarrollado anticuerpos monoclonales (Mab) específicos de Pgp como posibles agentes para uso en la inhibición de la MDR. La Patente U.S. No. 4.837.306 describe anticuerpos dirigidos contra la porción C-terminal del dominio intracelular de Pgp. Estos anticuerpos no tienen un efecto inhibitor conocido sobre la actividad de eflujo de fármaco en las células MDR.

Norris Murray D et al (International Journal of Cancer, vol. 65, No 5, 1996, páginas 613-619) se refieren a la implicación de la glicoproteína P MDR1 en la resistencia multifactorial al metotrexato.

30 La Patente U.S. No. 5.766.946 describe un anticuerpo monoclonal denominado MM.17 que reconoce un epítipo localizado en el cuarto bucle extracelular de la Pgp humana. El anticuerpo MM.17 se generó por inmunización de ratones con una variante MDR de un linfoblastoide T humano. No se sabe que este anticuerpo tenga un efecto inhibitor sobre la actividad de eflujo de fármaco en las células MDR.

35 La Patente U.S. No. 6.479.639 describe un anticuerpo monoclonal denominado UIC2 dirigido contra un dominio extracelular de Pgp. El anticuerpo UIC2 se generó por inmunización de ratones con células fibroblastos transfectadas que expresaban Pgp. Se encontró que el Mab UIC2 era capaz de inhibir la actividad de eflujo de fármaco de las células MDR *in vitro*.

40 Los anticuerpos monoclonales denominados HYB-241 y HYB-612 reconocen un epítipo externo de Pgp. Se ha informado que estos Mabs aumentan la acumulación de los fármacos quimioterapéuticos vincristina y actinomicina D en las células tumorales, aumentando de este modo la citotoxicidad [Meyers, M. B. *et al.*, Cancer Res., 49:3209 (1987); O'Brien, J. P. *et al.*, Proc. Amer. Assoc. Cancer Res., 30:Abs 2114 (1989)].

45 Se ha informado que el anticuerpo monoclonal Mab657 reacciona con las células MDR [Cinciarelli, C., *et al.*, Int. J. Cancer, 47:533 (1991)]. Se informó que este anticuerpo aumenta la sensibilidad de las células MDR a la citotoxicidad mediada por los linfocitos de la sangre periférica humana, y no se sabe que tenga un efecto inhibitor sobre la actividad de eflujo de fármaco de Pgp.

50 Se generaron los anticuerpos monoclonales MRK-16 y MRK-17 por inmunización de ratones con células MDR de leucemia humana. Ambos anticuerpos reconocen Pgp y son capaces de modular la actividad de eflujo de fármaco en las células MDR *in vitro* e *in vivo* [Hamada H., *et al.*, Cancer Res. PNAS 83:7785 (1986); Pearson, J.W., *et al.*, J. Natl. Cancer Inst. 88:1386 (1991); Tsuruo, T., *et al.*, Jpn. J. Cancer Res. 80:627 (1989)]. Se informó que un anticuerpo quimérico recombinante que combina la región variable de MRK-16 con la porción Fc de anticuerpos

humanos era más efectivo que el Mab MRK-16 parental en lo referente al aumento de la citotoxicidad para las células MDR *in vitro* [Hamada H. et al., Cancer Res. 50:3167 (1990)].

Una limitación sustancial de los anticuerpos arriba descritos se debe al gran tamaño de estas moléculas. Es bien sabido que la eficiencia de suministro de un agente es por regla general inversamente proporcional a su tamaño. Así, las moléculas de anticuerpos grandes arriba descritas no penetrarían y se distribuirían eficientemente en el tejido tumoral, requiriendo altas dosis de administración para alcanzar un efecto terapéutico.

Otro inconveniente importante de los anticuerpos específicos de Pgp disponibles actualmente es el hecho de que Pgp se expresa constitutivamente en los tejidos humanos normales, con inclusión de riñón, hígado, colon, testículos, linfocitos, y la barrera hematoencefálica (27). Una molécula de anticuerpo de gran tamaño podría circular típicamente durante periodos de tiempo prolongados y se aclararía lentamente de la circulación, dando como resultado posibles efectos tóxicos en los tejidos normales que expresan Pgp fisiológicamente.

Además, la mayoría de los anticuerpos específicos de Pgp arriba descritos se seleccionaron para afinidad alta a Pgp. Sin embargo, el uso práctico de anticuerpos específicos de Pgp en terapia puede verse restringido sustancialmente cuando la afinidad de fijación al anticuerpo a Pgp es alta. Esto es debido a efectos tóxicos que podrían ejercerse en los tejidos normales que expresan fisiológicamente Pgp.

Existe por tanto una necesidad generalmente reconocida de, y sería sumamente ventajoso disponer de, un anticuerpo específico de Pgp desprovisto de las limitaciones anteriores.

SUMARIO DE LA INVENCION

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un anticuerpo monocatenario Fv que comprende una región de fijación de antígeno capaz de fijar una porción extracelular de una glicoproteína P, en donde el anticuerpo monocatenario Fv es capaz de inhibir al menos parcialmente la actividad de eflujo de fármaco en las células multifarmaco-resistentes, y en donde dicha región de fijación de antígeno está codificada por una secuencia de ácido nucleico tal como se indica por SEQ ID NO: 2.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica, que comprende, como ingrediente activo, un anticuerpo monocatenario Fv que incluye una región de fijación de antígeno capaz de fijar una porción extracelular de una glicoproteína P, en donde el fragmento de anticuerpo es capaz de inhibir al menos parcialmente la actividad de eflujo de fármaco en las células multifarmaco-resistentes y en donde dicha región de fijación de antígeno está codificada por una secuencia de ácido nucleico como se indica por SEQ ID NO: 2, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

De acuerdo con otro aspecto adicional de la presente invención, se proporciona el uso de dicha composición farmacéutica para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer en el individuo.

De acuerdo con otro aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un kit para diagnosticar células que sobreexpresan glicoproteína P, que comprende un anticuerpo monocatenario Fv que contiene una región de fijación de antígeno capaz de fijar dicha glicoproteína P y en donde dicha región de fijación de antígeno está codificada por una secuencia de ácido nucleico como se indica por SEQ ID NO: 2; y reactivos para detectar dicho fragmento de anticuerpo.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un método *in vitro* de detección de células que sobreexpresan glicoproteína P que comprende: (a) exponer las células a un anticuerpo monocatenario Fv que incluye una región de fijación de antígeno capaz de fijar una porción extracelular de la glicoproteína P y en donde dicha región de fijación de antígeno está codificada por una secuencia de ácido nucleico como se indica por SEQ ID NO: 2; y (b) detectar dicho fragmento de anticuerpo fijado a dicha porción extracelular de dicha glicoproteína P, identificando con ello las células que sobreexpresan glicoproteína P extracelular.

De acuerdo con otro aspecto adicional de la presente invención se proporciona un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo monocatenario Fv que incluye una región de fijación de antígeno capaz de fijar una porción extracelular de una glicoproteína P, en donde el fragmento de anticuerpo es capaz de inhibir al menos parcialmente la actividad de eflujo de fármaco en células multifarmaco-resistentes y en donde dicha región de fijación de antígeno está codificada por una secuencia de ácido nucleico como se indica por SEQ ID NO: 2.

De acuerdo con otro aspecto adicional de la presente invención se proporciona un constructo de ácido nucleico que comprende un polinucleótido aislado que incluye una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo monocatenario Fv que incluye una región de fijación de antígeno capaz de fijar una porción extracelular de una glicopro-

teína P, en donde el fragmento de anticuerpo es capaz de inhibir al menos parcialmente la actividad de eflujo de fármaco en las células multifarmaco-resistentes y en donde dicha región de fijación de antígeno está codificada por una secuencia de ácido nucleico como se indica por SEQ ID NO: 2.

- 5 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención se proporciona una célula que comprende un constructo de ácido nucleico que incluye un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo monocatenario Fv que incluye una región de fijación de antígeno capaz de fijar una porción extracelular de una glicoproteína P, en donde el fragmento de anticuerpo es capaz de inhibir al menos parcialmente la actividad de eflujo de fármaco en células multifarmaco-resistentes y en donde dicha región de fijación de antígeno está codificada por una secuencia de ácido nucleico como se indica por SEQ ID NO: 2.
- 10 De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el fragmento de anticuerpo de la presente invención incluye una región de fijación de antígeno capaz de fijar una porción extracelular de un polipéptido de 170 kDa expresado por el gen *mdr1*, estando dirigida preferiblemente la región de fijación de antígeno contra un epítipo localizado en un primer bucle de la porción extracelular de la glicoproteína P, comprendiendo el epítipo más preferiblemente la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1.
- 15 De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el fragmento de anticuerpo de la presente invención es capaz de inhibir al menos parcialmente la actividad de eflujo de fármaco en las células multifarmaco-resistentes del cáncer, preferentemente células de cáncer humanas.
- 20 De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la composición farmacéutica de la presente invención incluye adicionalmente un fármaco quimioterapéutico, preferiblemente un fármaco quimioterapéutico que es tóxico para las células del cáncer.
- De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el kit de la presente invención incluye adicionalmente material de empaquetado que identifica el fragmento de anticuerpo para uso en el diagnóstico de células que sobreexpresan glicoproteína P extracelular.
- 25 De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el kit de la presente invención incluye el fragmento de anticuerpo de la presente invención marcado con un resto detectable, seleccionándose el resto detectable preferiblemente del grupo constituido por un resto cromógeno, un resto fluorógeno, un resto fotoemisor y un resto radiactivo.
- 30 De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el método de detección de células de un individuo que sobreexpresa glicoproteína P comprende adicionalmente una muestra biológica del individuo.
- De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el método de detección de células que sobreexpresan glicoproteína P incluye exponer las células al fragmento de anticuerpo de la presente invención que está marcado con un resto detectable, seleccionándose preferiblemente el resto detectable del grupo constituido por un resto cromógeno, un resto fluorógeno, un resto fotoemisor y un resto radiactivo.
- 35 De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el polinucleótido aislado de la presente invención es como se indica en SEQ ID NO: 2.
- De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el constructo de ácido nucleico de la presente invención incluye adicionalmente un promotor para regular la expresión de dicho polinucleótido.
- 40 La presente invención aborda satisfactoriamente los inconvenientes de las configuraciones conocidas actualmente proporcionando un anticuerpo monocatenario Fv, una composición farmacéutica, un polinucleótido, un constructo de ácido nucleico, un kit y métodos de utilización de los mismos. El anticuerpo monocatenario Fv incluye una región de fijación de antígeno capaz de fijar una porción extracelular de una glicoproteína P, inhibiendo con ello al menos parcialmente la actividad de eflujo de fármaco en las células multifarmaco-resistentes y en donde dicha región de fijación de antígeno está codificada por una secuencia de ácido nucleico como se indica por SEQ ID NO: 2.
- 45

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- La invención se describe en esta memoria, únicamente por vía de ejemplo, con referencia a los dibujos que se adjuntan. Haciendo ahora referencia específica a los dibujos en detalle, se pone de relieve que las particularidades expuestas se citan a modo de ejemplo y para propósitos de exposición ilustrativa de las realizaciones preferidas de la presente invención únicamente, y se presentan a fin de proporcionar lo que se cree es la descripción más útil y de
- 50

más fácil comprensión de los principios y aspectos conceptuales de la invención. A este respecto, no se hace intento alguno de mostrar detalles estructurales de la invención con mayor detalle del que es necesario para una comprensión fundamental de la invención, haciendo la descripción tomada junto con los dibujos, evidente para los expertos en la técnica el modo en que las diversas formas de la invención pueden materializarse en la práctica.

5 En los dibujos:

FIGs. 1a-d demuestran la especificidad y las propiedades de fijación de A2 monocatenario Fv purificado (scFv). La Figura 1a es una fotografía de un análisis SDS-PAGE que presenta una banda simple de A2 scFv en las pistas central y derecha, mientras que la pista izquierda muestra bandas de patrones de tamaño molecular. La Figura 1b es un gráfico de barras de un ELISA de A2 scFv que se fija a péptido biotinilado diana derivado de Pgp (que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; Pgp), o a péptido biotinilado no-diana (PRP), o a estreptavidina (streptA). El gráfico muestra que A2 scFv reaccionaba con el péptido derivado de Pgp diana de una manera dependiente de la dosis. A2 scFv no reaccionaba con el péptido no-diana o con estreptavidina. La Figura 1c es un gráfico de un ELISA que presenta una curva dosis-respuesta de la fijación de A2 scFv a un péptido biotinilado diana derivado de Pgp. La concentración de A2 scFv requerida para fijación del 50% se interpoló como aprox. 150 nM. La Figura 1d es un gráfico de un radioinmunoensayo de competición. El gráfico está basado en la utilización de una cantidad constante de A2 scFv marcado con [¹²⁵I] y una cantidad creciente de un scFv A2 sin marcar (como competidor). La concentración requerida para inhibición de la fijación del 50% de A2 scFv se interpoló como aprox. 130 nM.

FIGs. 2a-h demuestran la capacidad y selectividad de la fijación de A2 scFv a células tumorales que exhiben multi-resistencia (MDR) y que sobreexpresan glicoproteína P (Pgp). La Figura 2a es un gráfico que presenta un análisis de inmunofluorescencia en citómetro de flujo de A2 scFv que reacciona con células del carcinoma de ovario humano 2780 farmaco-sensibles. El gráfico muestra que el tratamiento con A2 scFv no tenía efecto alguno sobre la intensidad de fluorescencia, lo que indicaba una fijación nula anticuerpo-célula. La Figura 2b es un gráfico que presenta un análisis de inmunofluorescencia en citómetro de flujo de la reacción de A2 scFv con células MDR y que sobreexpresan Pgp de carcinoma de ovario 2780^{ADR}. El gráfico muestra que el tratamiento con A2 scFv daba como resultado un aumento de 10 veces en la intensidad de fluorescencia, lo que indicaba una fijación fuerte anticuerpo-célula. La Figura 2c es un gráfico que presenta un análisis de inmunofluorescencia en citómetro de flujo de la reacción de A2 scFv con las células del carcinoma humano KB3-1 farmaco-sensibles. El gráfico muestra que el tratamiento con A2 scFv no tenía efecto alguno sobre la intensidad de fluorescencia, lo que indicaba una fijación nula anticuerpo-célula. La Figura 2d es un gráfico que presenta un análisis de inmunofluorescencia en citómetro de flujo de la reacción de A2 scFv con células MDR y células que sobreexpresan Pgp de carcinoma humano KBV-1 (derivadas de las células del carcinoma humano KB3-1 farmaco-sensibles). El gráfico muestra que el tratamiento con A2 scFv daba como resultado un aumento sustancial en la intensidad de fluorescencia, indicando una fijación fuerte anticuerpo-célula. La Figura 2e es una microfotografía que ilustra la tinción inmuno-histoquímica de las células MDR y que sobreexpresan Pgp del carcinoma de ovario 2780^{ADR} (derivadas de la línea de células de carcinoma de ovario 2780 farmaco-sensible), tratadas con A2 scFv. La microfotografía muestra células teñidas, indicando una reacción positiva anticuerpo-célula. La Figura 2f es una microfotografía que muestra la tinción inmuno-histoquímica de células 2780 farmaco-sensibles tratadas con A2 scFv. Las células se mantuvieron sin teñir, indicando la inexistencia de reacción anticuerpo-célula. La Figura 2g es una microfotografía que ilustra la tinción inmuno-histoquímica de células MDR y que sobreexpresan Pgp del carcinoma humano KB3-1 (derivadas de la línea de células de carcinoma humano KBV-1 farmaco-sensibles) tratadas con A2 scFv. La microfotografía muestra células teñidas, indicando una reacción anticuerpo-célula positiva. La Figura 2h es una microfotografía que ilustra la tinción inmuno-histoquímica de células de carcinoma humano KBV-1 farmaco-sensibles (la línea parental de la línea de células MDR y que sobreexpresan Pgp del carcinoma humano KB3-1) tratadas con A2 scFv. Las células se mantuvieron sin teñir, indicando la inexistencia de reacción anticuerpo-célula.

Las FIGs. 3a-e demuestran el efecto de A2 scFv sobre la actividad de eflujo de fármaco en las células MDR. La Figura 3a es un gráfico de barras que presenta los datos obtenidos por un ensayo fluorométrico que compara la tasa de acumulación de calceína en (i) células de carcinoma de ovario humano 2780 farmaco-sensibles (representadas por barras negras), y en (ii) células MDR y que sobreexpresan Pgp de carcinoma de ovario 2780^{ADR} (representadas por barras grises). El gráfico muestra una disminución de 5 y 10 veces en la intensidad de fluorescencia, indicando una disminución en la absorción de calceína, después de 5 ó 15 minutos de incubación, respectivamente. La Figura 3b es un gráfico que presenta un ensayo de citometría de flujo que compara la acumulación de calceína en (i) células de carcinoma de ovario humano 2780 farmaco-sensibles, y en (ii) células MDR y que sobreexpresan Pgp de carcinoma de ovario humano 2780^{ADR}. El gráfico muestra que las células 2780^{ADR} exhibían una intensidad media de fluorescencia sustancialmente menor, indicando un nivel sustancialmente inferior de la absorción de calceína por las células MDR, en comparación con la absorción de calceína por las células 2780 farmaco-sensibles. La Figura 3c es un gráfico de barras que demuestra el efecto de A2 scFv sobre la acumulación de calceína en las células 2780^{ADR} MDR y que sobreexpresan Pgp, en un ensayo fluorométrico. El gráfico muestra un efecto positivo dosis-respuesta

de A2 scFv, administrado antes de la adición de calceína, sobre la absorción de calceína por las células 2780^{ADR}. La Figura 3d es un gráfico que muestra el efecto de A2 scFv sobre la absorción de calceína por las células 2780^{ADR} MDR y que sobreexpresan Pgp. El A2 scFv se administró a las células antes de la adición de calceína. El gráfico muestra un valor medio sustancialmente mayor (4-5 veces) de la intensidad de fluorescencia, indicando un aumento sustancial en la absorción de calceína por las células MDR tratadas con A2 scFv, en comparación con las células no tratadas con A2 scFv. La Figura 3e es un gráfico de barras que ilustra la especificidad de scFv. El gráfico presenta datos obtenidos por un ensayo fluorométrico y muestra que la administración de A2 scFv a las células 2780^{ADR}, seguida por la adición de calceína, aumentaba sustancialmente la intensidad de fluorescencia de las células, indicando una absorción incrementada de calceína en las células. En comparación, la administración de un scFv G1 no-diana (aislado contra un antígeno tumoral de melanoma) a las células 2780^{ADR} no aumentaba la absorción de calceína en las células.

Las FIGs. 4a-e demuestran el efecto de A2 scFv sobre la actividad de eflujo de fármaco en diversas líneas de células MDR y sus líneas de células parentales farmaco-sensibles. La Figura 4a es un gráfico de barras que presenta datos obtenidos por un ensayo fluorométrico que compara la absorción de calceína en una línea de células EMT^{R1} MDR de roedor (CHO). El gráfico muestra que las células tratadas con A2 scFv, seguido por adición de calceína, exhibían niveles de fluorescencia sustancialmente mayores, lo cual es indicativo de una mayor absorción de calceína en las células, en comparación con el control sin tratar (negativo). El efecto de A2 scFv era similar al efecto de verapamil, un modulador MDR de referencia, utilizado como control positivo. La Figura 4b es un gráfico de barras que presenta los datos obtenidos por un ensayo fluorométrico que compara la absorción de calceína en una línea de células MDR epidermoides humanas KB-V1. El gráfico muestra que las células tratadas con A2 scFv, seguido por la adición de calceína, exhibían niveles de fluorescencia sustancialmente mayores, lo cual es indicativo de una mayor absorción de calceína en las células, en comparación con el control sin tratar (negativo). El efecto de A2 scFv era similar al efecto de verapamil, un modulador MDR de referencia utilizado como control positivo. La Figura 4c es un gráfico de barras que presenta datos obtenidos por un ensayo fluorométrico que compara la absorción de calceína en una línea de células 2780 farmaco-sensibles (la línea parental de 2780^{ADR}). El gráfico muestra una intensidad de fluorescencia similar observada en las células tratadas con A2 scFv, control sin tratar (negativo), o control de verapamil (positivo), indicando así la ausencia de efecto ejercido por A2 scFv sobre la absorción de calceína en las células farmaco-sensibles. La Figura 4d es un gráfico de barras que presenta datos obtenidos por un ensayo fluorométrico que compara la absorción de calceína en una línea de células epidermoides humanas KB3-1 farmaco-sensibles (la línea parental de KBV-1). El gráfico muestra una intensidad de fluorescencia similar observada en células tratadas por A2 scFv, control sin tratar (negativo), o control de verapamil (positivo), indicando así la ausencia de efecto ejercido por A2 scFv sobre la absorción de calceína en las células farmaco-sensibles. La Figura 4e es un gráfico de barras que presenta datos obtenidos por un ensayo fluorométrico que compara la absorción de calceína en una línea de células A8 de roedor (CHO) farmaco-sensibles (la línea parental de EMT^{R1}). El gráfico muestra una intensidad de fluorescencia similar observada en las células tratadas por A2 scFv, control sin tratar (negativo), o control de verapamil (positivo), indicando así la ausencia de efecto ejercido por A2 scFv sobre la absorción de calceína en las células farmaco-sensibles.

FIG. 5 es un gráfico que presenta la absorción de calceína en células 2780^{ADR} tratadas con diversas concentraciones de A2 scFv. El gráfico muestra una curva dosis-respuesta de intensidad de fluorescencia, indicativa de absorción de calceína. Las concentraciones estimadas de saturación (CI₁₀₀) y CI₅₀ son 0,1 y 0,065 mg A2 scFv por ml, respectivamente (o 4 y 2,6 µM, respectivamente).

FIG. 6 es un gráfico de barras que presenta el efecto de A2 scFv sobre la viabilidad de las células 2780^{ADR} tratadas con diversas concentraciones de doxorubicina. La viabilidad de las células se determinó por incorporación de [³H]-leucina en las proteínas celulares. El gráfico muestra que el tratamiento de las células con A2 scFv, antes de la adición de doxorubicina, daba como resultado una pérdida sustancial de viabilidad de las células, en comparación con las células sin tratar con A2 scFv.

DESCRIPCIÓN DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

La presente descripción se refiere a un fragmento de anticuerpo que incluye un sitio de fijación de antígeno capaz de fijar la glicoproteína P (Pgp) extracelular, y como tal, puede ser utilizado para inhibir la actividad de eflujo de fármaco en las células multifarmaco-resistentes (MDR), o en la detección de las células MDR.

Como se indica en esta memoria, el término "glicoproteína P" se refiere a una proteína trans-membranal de 170 kDa codificada por el gen *mdr1* humano, que funciona como una bomba biológica dependiente de energía en las células multifarmaco-resistentes.

Como se utiliza en esta memoria, la expresión "multirresistencia" se refiere a la resistencia de algunas células, tales como las células de cáncer que sobreexpresan Pgp, a los fármacos citotóxicos.

5 Como se utiliza en esta memoria, la expresión "fragmento de anticuerpo" se refiere a cualquier porción activa de una molécula de anticuerpo nativa. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero sin carácter limitante, un Fv, un Fv monocatenario, un Fab, un F(ab')₂ o un Fab'. Un fragmento de anticuerpo puede producirse enzimática o químicamente a partir de un anticuerpo intacto, o puede producirse por síntesis. Alternativamente, un fragmento de anticuerpo puede expresarse a partir de una secuencia de polinucleótido que codifica la secuencia del fragmento de anticuerpo.

Como se utiliza en esta memoria, el término "Fv" se refiere a un polipéptido que comprende un dominio variable de cadena ligera (V_L) y un dominio variable de cadena pesada (V_H) de una molécula de anticuerpo que se mantienen unidos por interacciones no covalentes. Un Fv incluye la región de fijación de antígeno de la molécula de anticuerpo.

10 Como se utiliza en esta memoria, la expresión "Fv monocatenario" (scFv) se refiere a un Fv en el cual los dominios V_L y V_H están conectados preferiblemente por un enlazador polipeptídico. El scFv es el fragmento de anticuerpo más pequeño que lleva el sitio completo de fijación de antígeno.

Como se utiliza en esta memoria, el término "Fab" se refiere al polipéptido que comprende un fragmento de anticuerpo que es esencialmente equivalente al obtenido por digestión del anticuerpo con la enzima papaína.

15 Como se utiliza en esta memoria, el término "F(ab')₂" se refiere al polipéptido que comprende un fragmento de anticuerpo que es esencialmente equivalente al obtenido por digestión del anticuerpo con la enzima pepsina a pH 4,0-4,5.

20 Como se utiliza en esta memoria, el término "Fab'" se refiere al polipéptido que comprende un fragmento de anticuerpo que es esencialmente equivalente al obtenido por reducción del puente o puentes disulfuro que unen las dos piezas de cadena pesada de un F(ab')₂.

25 Varios anticuerpos monoclonales (Mab) específicos de Pgp que son capaces de fijar Pgp y soslayar con ello la actividad de eflujo de fármaco en las células MDR han sido descritos en la técnica anterior [U.S. Pat. Núms. 4,837,306, 5,766,946 y 6,479,639; Meyers, M. B. *et al.*, *Cancer Res.*, 49:3209 (1987); O'Brien, J. P. *et al.*, *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.*, 30:Abs 2114 (1989); Cinciarelli, C., *et al.*, *Int. J. Cancer*, 47:533 (1991) Hamada H., *et al.*, *Cancer Res. PNAS* 83:7785 (1986); Pearson, J.W., *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.* 88:1386 (1991); Tsuruo, T., *et al.*, *Jpn. J. Cancer Res.* 80:627 (1989); Hamada H. *et al.*, *Cancer Res.* 50:3167 (1990)]. Sin embargo, hasta ahora, el uso terapéutico práctico de tales Mabs anti-Pgp se ha visto impedido principalmente por el gran tamaño de estas moléculas, que limita la movilidad y la penetración tisular de las mismas [Yokota *et al.*, *Cancer Res.* 52: 3402-3408 (1992)]. Además de las limitaciones de penetración tisular y movilidad, estas grandes moléculas Mab resultarían lentas en lo que se refiere a aclaramiento de la circulación corporal, y por consiguiente podrían deteriorar potencialmente un tejido distinto de la diana (12). Adicionalmente, estos Mabs que exhiben típicamente afinidad alta a Pgp pueden ser también tóxicos para las células normales que expresan Pgp fisiológicamente (27).

30 Un modo de soslayar estas limitaciones consiste en utilizar un fragmento de anticuerpo. Ventajosamente, el fragmento de anticuerpo tendría un tamaño molecular pequeño, y sin embargo una especificidad alta y afinidad moderada para Pgp, y por tanto podría ser muy eficiente en la inhibición de la actividad de eflujo de fármaco en las células MDR pero desprovisto sin embargo de las limitaciones arriba mencionadas.

35 El posible uso de un fragmento de anticuerpo para superar las deficiencias de una molécula de anticuerpo monoclonal (Mab) fue ilustrado por Schodin y Kranz [*J. Biolog. Chem.* 268:25722-25727 (1993)]. Se encontró que si bien los anticuerpos monoclonales inhibían eficazmente la activación de las células T *in vitro*, causaban también efectos secundarios indeseables sustanciales cuando se utilizaban *in vivo*. Estos efectos secundarios se soslayaron eficazmente reemplazando el Mab con un scFv de tamaño pequeño.

40 La Patente No. 6.479.639 describe un Mab específico de Pgp y la posibilidad de utilización de porciones del mismo en terapia. La misma describe adicionalmente métodos enzimáticos, químicos y de ingeniería genética conocidos en la técnica, que podrían utilizarse para generar fragmentos de anticuerpo. Sin embargo, la descripción de la patente no proporciona ejemplo alguno de un fragmento real derivado de Mab o la metodología específica para generar el mismo.

El hecho de que un fragmento de anticuerpo capaz de fijar específicamente Pgp y capaz también de modular la actividad de las células MDR no se describe en éste o en ningún otro documento de la técnica anterior indica que la generación de fragmentos funcionales de anticuerpo a partir de secuencias Mab existentes no es trivial.

50 Esta indicación está respaldada por un estudio reciente conducido por Niv y colaboradores (19). Este estudio generó y caracterizó un Mab específico de Pgp, denominado "9F11", y un scFv derivado de este Mab. Ambas moléculas, el Mab 9F11 completo así como su derivado scFv, tenían específicamente como diana Pgp extracelular en las células

MDR. Sin embargo, mientras que el Mab 9F11 entero era capaz también de inhibir la actividad de eflujo de fármaco en las células MDR, su derivado scFv no lo era (datos no publicados).

Por consiguiente, la mera sugerencia de la Patente U.S. No. 6.479.639 de que pueden utilizarse secuencias Mab para generar un fragmento de anticuerpo respectivo sin demostración real de que dicho fragmento de anticuerpo pudiera ser activo en la inhibición de la actividad de eflujo de fármaco en las células MDR no proporciona a un especialista con experiencia ordinaria motivación suficiente para generar dichas secuencias de fragmentos de anticuerpo, dado que no puede asegurarse un grado de éxito razonable.

La presente descripción proporciona un nuevo fragmento de anticuerpo específico de Pgp que es capaz de inhibir eficazmente la actividad de eflujo de fármaco en las células multifármaco-resistentes.

Así pues, de acuerdo con un aspecto de la presente descripción, se proporciona un fragmento de anticuerpo que incluye una región de fijación de antígeno capaz de fijar una porción extracelular de glicoproteína P (Pgp), y que es capaz también de inhibir al menos parcialmente la actividad de eflujo de fármaco en células multifármaco-resistentes.

Preferiblemente, el fragmento de anticuerpo está dirigido a la Pgp de 170 kDa expresada por el gen *mdr1* humano. Aunque pueden considerarse potencialmente como diana varias regiones de esta proteína, el fragmento de anticuerpo de la presente descripción está dirigido preferiblemente a un epítipo localizado en el primer bucle extracelular del polipéptido Pgp de 170 kDa que es expresado por el gen *mdr1* humano. Muy preferiblemente, el fragmento de anticuerpo está dirigido a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

El fragmento de anticuerpo de la presente descripción puede generarse utilizando técnicas de presentación de fago tales como las descritas en las referencias siguientes: U.S. Pat. Núms. 5,698,426; 5,658,727; 5,223,409; 5,403,484; 5,580,717; 5,427,908; 5,750,753; 5,821,047; 5,571,698; 5,427,908; 5,516,637; 5,780,225; 5,658,727; 5,733,743 y 5,969,108; y la solicitud PCT No. PCT/GB91/01134; las publicaciones PCT WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y Hoogenboom *et al.* Immunotechnology 4:1-20 (1998); Brinkman *et al.*, J. Immunol. Methods 182:41-50 (1995); Ames *et al.*, J. Immunol. Methods 184:177-186 (1995); Kettleborough *et al.*, Eur. J. Immunol. 24:952-958 (1994); Persic *et al.*, Gene 187 9-18 (1997); y Burton *et al.*, Advances in Immunology 57:191-280 (1994).

De acuerdo con ello, puede utilizarse un antígeno diana para inmunizar un animal hospedador utilizando procedimientos de inmunización bien conocidos en la técnica. Preferiblemente, el antígeno diana se deriva de glicoproteína P (Pgp), derivándose más preferiblemente el antígeno diana de la Pgp de 170 kDa expresada por el gen *mdr1* humano. Muy preferiblemente, el antígeno diana se deriva del primer bucle de la Pgp de 170 kDa, e incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

Después de la inmunización, el mRNA de las células B puede extraerse de bazo, linfocitos de sangre periférica, médula ósea o amígdala del animal inmunizado. El mRNA puede utilizarse luego para construir una biblioteca de fragmentos de anticuerpo de presentación de fago, empleando metodología tal como la descrita por Hoogenboom *et al.* [Immunotechnology 4:1-20(1998)]; Kand *et al.* [Proc. Natl. Acad. Sci. 88:4363 (1991)]; Barbas *et al.* [Proc. Natl. Acad. Sci. 88:7978 (1991)], Garrard *et al.* [Biotechnology 9:1373-1377 (1991)]; Hoogenboom *et al.* [Nucleic Acids Res. 19:4133-4137 (1991)]; y Sharon *et al.* [Combinational Chemistry & High Throughput Screening 3:185-196 (2000)].

Fagos recombinantes que poseen propiedades deseables de fijación de anticuerpos pueden seleccionarse por enriquecimiento secuencial de fagos específicos de fijación de diana a partir de un gran exceso de clones no fijadores. Esta selección puede realizarse por varias técnicas opcionales que incluyen lavado en batea sobre antígeno inmovilizado; lavado en batea utilizando elución específica; utilización de antígeno biotinilado; purificación por afinidad en columnas; o lavado en batea directo sobre células. Técnicas de selección adecuadas se describen, por ejemplo, por Pluckthum [The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol 113: Rosenberg y Moors eds. Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994)] y Hoogenboom *et al.* [Immunotechnology 4: 1-20 (1998)].

Después de la selección, los fagos que llevan fragmentos de anticuerpo inespecíficos pueden eliminarse por lavado y los fagos fijados, que llevan fragmentos de anticuerpo específicos de la diana, se eluyen y amplifican por infección de *E. coli*. Una vez que se han aislado los fagos recombinantes, que exhiben el fragmento de anticuerpo específico de la diana, la secuencia de polinucleótidos que codifica el anticuerpo puede recuperarse del paquete de presentación de fago y clonarse en un vector de expresión recombinante utilizando métodos estándar conocidos en la técnica, tales como los descritos por Ausubel *et al.*, eds. [Current Protocols in Molecular Cloning (1989), Greene Publishing y Wiley Interscience, Nueva York, NY].

Un fragmento de anticuerpo generado como se ha descrito arriba puede caracterizarse para especificidad y afinidad a Pgp por cualquier método convencional de inmunoensayo conocido en la técnica con inclusión, pero sin carácter limitante, de los ensayos ELISA, radioinmunoensayos, o ensayos de inmunofluorescencia. El efecto de un fragmento de anticuerpo sobre la inhibición de la actividad de eflujo de fármaco en las células MDR, puede evaluarse por monitorización de la acumulación intracelular o eflujo de fármaco de interés, en presencia o ausencia de un fragmento de anticuerpo. Por ejemplo, Cole *et al.* [Cancer Res. 54:5902-5910 (1994)] describen ensayos de acumulación celular y eflujo que pueden utilizarse para evaluar el eflujo de fármaco y/o toxinas tales como, pero sin carácter limitante, doxorubicina, vincristina, colchicinas, VP-16, vinblastina, verapamil, mitoxantrona, taxol, ciclosporina A, quinidina, progesterona, tamoxifeno, epirrubicina, daunorrubicina, y MX2. Ensayos adicionales de caracterización adecuados incluyen ensayos de citometría de flujo o fluorométricos que aprovechan las propiedades fluorescentes de un fármaco, tal como doxorubicina o daunorrubicina [Patente U.S. No. 5.556.856; Krishan Math. Cell Biol. 33:491-500 (1990)], o alternativamente, basados en tintes fluorescentes tales como rodamina o calceína [Patente U.S. No. 5.403.574; Hollo *et al.*, Biochim. Biophys Acta 1191:384-388 (1994)]. El efecto de un fragmento de anticuerpo sobre la citotoxicidad creciente para las células MDR puede evaluarse por monitorización de la absorción celular de tintes vitales después de un periodo de exposición a una citotoxina, tales como los métodos descritos en la Patente U.S. No. 5.543.423; o por evaluación de la incorporación de [³H]leucina, tal como el método descrito en el Ejemplo 3 de la sección de ejemplos que sigue.

El Ejemplo 1 de la sección de ejemplos que sigue describe el aislamiento de un fragmento de anticuerpo monocatenario (scFv) anti-Pgp.

Resumidamente, la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 se clonó por lotes en un fago filamentoso f88 en fusión a un gen que codificaba una proteína de la cubierta. El fago de presentación recombinante se utilizó luego para inmunizar ratones a fin de generar una respuesta inmune al antígeno diana (SEQ ID NO: 1) utilizando métodos estándar conocidos en la técnica. Después de la inmunización, se extirpó el bazo de los ratones inmunizados y se extrajo el mRNA de las células B esplénicas. El mRNA aislado se utilizó luego para generar y amplificar cDNA utilizando técnicas estándar RT-PCR. Después de la RT-PCR, se utilizaron las secuencias amplificadas para generar una biblioteca de presentación de fago que se cribó utilizando el antígeno diana. Las secuencias de polinucleótidos que codificaban el scFv se aislaron a partir de clones de fago positivos utilizando técnicas moleculares estándar. La secuencia de polinucleótidos aislada (SEQ ID NO: 2) se clonó en un vector de expresión procarionota y se expresó en *E. coli*. El scFv expresado se purificó luego a partir de la fracción periplásmica de estas células, utilizando métodos estándar de purificación (una descripción ulterior de la expresión y purificación de scFv se proporciona más adelante en esta memoria).

Como se ilustra en los Ejemplos 2 y 3 de la sección de ejemplos que sigue, el nuevo Fv monocatenario generado de acuerdo con la doctrina de la presente invención (denominado "A2") es una molécula relativamente pequeña (aproximadamente 30 kDa) que exhibe alta especificidad de fijación a la Pgp extracelular y las células multifarmacoresistentes, y una afinidad de fijación moderada (aproximadamente 150 nM) a Pgp. Adicionalmente, este scFv es capaz de inhibir eficazmente la actividad de eflujo de fármaco en las células MDR y, como resultado, es capaz de aumentar eficazmente la citotoxicidad de los fármacos en las células MDR.

Como se menciona anteriormente en esta memoria, un enfoque preferido para la síntesis del scFv anti-Pgp de la presente invención consiste en aislar y expresar secuencias codificantes de scFv.

Como se utiliza en esta memoria, el término "expresar" se refiere a la conversión de una secuencia de polinucleótidos en un polipéptido.

De acuerdo con ello, la secuencia de polinucleótidos aislada que codifica el polipéptido scFv puede ligarse a elementos reguladores apropiados para generar un constructo de ácido nucleico. Preferiblemente, el constructo de ácido nucleico es un constructo de expresión (es decir, un vector de expresión) que incluye un promotor seleccionado adecuado para dirigir la transcripción de la secuencia de ácido nucleico aislada que codifica el polipéptido de esta descripción en una célula hospedadora particular.

Cualquier secuencia promotora adecuada puede ser utilizada por el constructo de ácido nucleico de la presente descripción. Preferiblemente, el promotor utilizado por el constructo de ácido nucleico es activo en la célula específica que se transforma. El constructo de ácido nucleico de la presente descripción puede incluir adicionalmente un intensificador, que puede ser adyacente a o distante de la secuencia promotora y puede funcionar en la regulación creciente de la transcripción de la misma.

El constructo de ácido nucleico de la presente descripción incluye preferiblemente además un marcador seleccionable apropiado y/o un origen de replicación. Preferiblemente, el constructo de ácido nucleico utilizado es un vector lanzadera, que puede propagarse en *E. coli* (en cuyo caso el constructo comprende un marcador seleccionable

apropiado y un origen de replicación) y ser además compatible para propagación en células. El constructo de acuerdo con la presente descripción puede ser, por ejemplo, un plásmido, un b́acmido, un fagémido, un cósmido, un fago, un virus o un cromosoma artificial.

5 Una diversidad de células procariotas o eucariotas pueden utilizarse como hospedador-sistema de expresión para expresar la secuencia codificante del polipéptido. Éstas incluyen, pero sin carácter limitante, microorganismos, tales como bacterias transformadas con un DNA recombinante de bacteriófago, DNA plasmídico o vector de expresión de DNA cósmido que contiene la secuencia codificante del polipéptido; levadura transformada con vectores recombinantes de expresión de levadura que contienen la secuencia codificante del polipéptido; sistemas de células vegetales infectados con vectores recombinantes de expresión de virus (v.g., el virus del mosaico de la coliflor, CaMV; el virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión plasmídicos recombinantes, tales como un plásmido Ti, que contienen la secuencia codificante del polipéptido. Pueden utilizarse también sistemas de expresión de mamífero para expresar el polipéptido de la presente invención. Se utilizan preferiblemente sistemas bacterianos para producir los polipéptidos recombinantes, dado que aquéllos permiten un alto volumen de producción a bajo coste.

15 En los sistemas bacterianos, pueden seleccionarse ventajosamente cierto número de vectores de expresión, dependiendo del uso propuesto para el polipéptido expresado. Por ejemplo, cuando se desean grandes cantidades de polipéptidos, pueden ser deseables vectores que dirijan la expresión de niveles altos del producto proteínico, posiblemente como una fusión con una secuencia señal hidrófoba, que dirige el producto expresado al periplasma de la bacteria o al medio de cultivo en el que el producto proteínico se purifica fácilmente. Pueden ser también deseables ciertas proteínas de fusión modificadas por ingeniería genética con un sitio de escisión específico para favorecer la recuperación del polipéptido. Tales vectores adaptables a dicha manipulación incluyen, pero sin carácter limitante, la serie pET de vectores de expresión de *E. coli* [Studier *et al.*, *Methods in Enzymol.* 185:60-69 (1990)].

20 En levadura, puede utilizarse cierto número de vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles, como se describe en la Solicitud de Patente U.S. No. 5.932.447. Alternativamente, pueden utilizarse vectores que promueven la integración de secuencias de DNA extrañas en el cromosoma de levadura.

25 En los casos en que se utilizan vectores de expresión de plantas, la expresión de la secuencia codificante del polipéptido puede ser estimulada por cierto número de promotores. Por ejemplo, pueden utilizarse promotores virales tales como los promotores RNA 35S y RNA 19S de CaMV [Brisson *et al.* *Nature* 310:511-514 (1984)], o el promotor de la proteína de la cubierta para TMV [Takamatsu *et al.*, *EMBO J.* 6:307-311 (1987)]. Alternativamente, pueden utilizarse promotores de plantas tales como, por ejemplo, la subunidad pequeña de RUBISCO [Coruzzi *et al.*, *EMBO J.* 3:1671-1680 (1984); y Brogli *et al.*, *Science* 224:838-843 (1984)] o promotores del choque térmico, v.g., hsp17.5-E o hsp17.3-B de soja [Gurley *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 6:559-565 (1986)]. Estos constructos pueden introducirse en células de plantas utilizando el plásmido Ti, el plásmido Ri, vectores virales de plantas, transformación directa de DNA, microinyección, electroporación y otras técnicas bien conocidas por el artesano experto. Véase, por ejemplo, Weissbach & Weissbach [Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, Sección VIII, pp. 421-463 (1988)]. Otros sistemas de expresión tales como insectos y sistemas de células hospedadoras de mamífero, que son bien conocidos en la técnica, pueden utilizarse también en la presente invención.

30 Se apreciará que además de contener los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificante insertada (que codifica el polipéptido), el constructo de expresión de la presente descripción puede incluir también secuencias modificadas por ingeniería genética para optimizar la estabilidad, producción, purificación, rendimiento o actividad del polipéptido expresado.

35 Las células transformadas se cultivan en condiciones eficaces, que permiten la expresión de cantidades elevadas de polipéptido recombinante. Condiciones de cultivo eficaces incluyen, pero sin carácter limitante, condiciones eficaces de biorreactor, temperatura, pH y oxígeno que permiten la producción de proteínas. Un medio eficaz hace referencia a cualquier medio en el cual se cultiva una célula para producir el polipéptido recombinante de la presente descripción. Un medio de este tipo incluye típicamente una solución acuosa que contiene fuentes asimilables de carbono, nitrógeno y fosfato, y sales, minerales y otros nutrientes apropiados, tales como vitaminas. Las células de la presente descripción pueden cultivarse en biorreactores de fermentación, matraces de sacudidas, tubos de ensayo, cápsulas de microtitulación, y placas de Petri convencionales. El cultivo puede realizarse a una temperatura, pH y contenido de oxígeno apropiados para una célula recombinante. Tales condiciones de cultivo están dentro de los conocimientos de una persona con experiencia ordinaria en la técnica.

40 Dependiendo del vector y el sistema hospedador utilizados para la producción, los polipéptidos resultantes de la presente descripción pueden mantenerse en el interior de la célula recombinante, secretarse al medio de fermentación, secretarse a un espacio entre dos membranas celulares, tales como el espacio periplásmico en *E. coli*; o retenerse en la superficie externa de una membrana celular o viral.

Después de un tiempo predeterminado en cultivo, se efectúa la recuperación del polipéptido recombinante.

La expresión "recuperación del polipéptido recombinante" utilizada en esta memoria hace referencia a la recogida del medio de fermentación entero que contiene el polipéptido y no necesita implicar pasos adicionales de separación o purificación.

5 Así, los polipéptidos de la presente descripción pueden purificarse utilizando una diversidad de técnicas estándar de purificación de proteínas, tales como, pero sin carácter limitante, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, filtración, electroforesis, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de filtración en gel, cromatografía en fase inversa, cromatografía con concanavalina A, cromatoenfoque y solubilización diferencial.

10 Para facilitar la recuperación, la secuencia codificante expresada puede modificarse por ingeniería genética para codificar el polipéptido de la presente invención y el resto escindible fusionado. Una proteína de fusión de este tipo puede diseñarse de tal modo que el polipéptido pueda ser aislado fácilmente por cromatografía de afinidad; v.g., por inmovilización en una columna específica para el resto escindible. En el caso en que un sitio de escisión se modifica por ingeniería genética entre el polipéptido y el resto escindible, el polipéptido puede liberarse de la columna cromatográfica por tratamiento con una enzima o agente apropiado(a) que escinde específicamente la proteína de fusión en este sitio [v.g., véase Booth *et al.*, *Immunol. Lett.* 19:65-70 (1988); y Gardella *et al.*, *J. Biol. Chem.* 265:15854-15859 (1990)].

El polipéptido de la presente descripción se recupera preferiblemente en forma "sustancialmente pura".

Como se utiliza en esta memoria, la expresión "sustancialmente puro" se refiere a una pureza que permite el uso eficaz de la proteína en las aplicaciones descritas en esta memoria.

20 Además de ser sintetizable en células hospedadoras, el polipéptido de la presente invención puede sintetizarse también utilizando sistemas de expresión *in vitro*. Estos métodos son bien conocidos en la técnica y los componentes del sistema están disponibles comercialmente.

25 Además, alternativamente, el polipéptido de la presente descripción puede sintetizarse también utilizando, por ejemplo, técnicas estándar en fase sólida. Dichas técnicas incluyen síntesis exclusiva en fase sólida, métodos de síntesis en fase parcialmente sólida, condensación de fragmentos, síntesis clásica en solución, e incluso tecnología de DNA recombinante, tal como ha sido descrito por Merrifield, J. [*Am. Chem. Soc.*, 85:2149 (1963)]. Los procedimientos de síntesis de polipéptidos en fase sólida son bien conocidos en la técnica y han sido descritos adicionalmente por John Morrow Stewart y Janis Dillaha Young [*Solid Phase Peptide Syntheses*, 2ª ed., Pierce Chemical Company, (1984)].

30 El polipéptido sintético puede purificarse por un procedimiento de cromatografía líquida preparativa de alta resolución, tal como ha sido descrito por Creighton T. [*Proteins, structure and molecular principles*, W.H. Freeman and Co. N.Y. (1983)] y cuya composición puede confirmarse por secuenciación de aminoácidos.

35 Dado que el fragmento de anticuerpo de la presente descripción es específico de Pgp, el mismo puede utilizarse para detectar células multifarmaco-resistentes (MDR). Un mecanismo fundamental de la MDR es la sobreexpresión de Pgp y se ha establecido una correlación clara entre la sobreexpresión de Pgp y la falta de respuesta a la quimioterapia de los pacientes de cáncer (6, 7). Así, si la quimioterapia se aplica ineficazmente, puede resultar un deterioro considerable por la toxicidad no dirigida a la diana acoplada con la pérdida de la oportunidad de proporcionar otro tratamiento más eficaz. Por consiguiente, una diagnosis exacta, específica y fiable de las células MDR en los pacientes de cáncer podría ser una herramienta clínica muy útil para determinar las opciones y seleccionar el tratamiento más apropiado para administración.

40 Así pues, de acuerdo con otro aspecto de la presente descripción, se proporciona un método para detectar células multifarmaco-resistentes. El método incluye exposición de las células al fragmento de anticuerpo de esta invención, seguido por detección del fragmento de anticuerpo fijado a las células que sobreexpresan Pgp, detectando con ello las células multifarmaco-resistentes. Preferiblemente, el fragmento de anticuerpo se marca con un resto detectable (descrito más adelante) y que puede ser detectado utilizando inmunoensayos estándar conocidos en la técnica, tales como ELISA, inmunofluorescencia, radioinmunoensayo y tinción inmunohistoquímica.

45 Inicialmente, se obtiene del individuo para análisis *ex vivo* una muestra biológica, que contiene células sospechosas de ser células MDR, tales como células tumorales. Con objeto de prevenir que las células de la muestra se degraden, las células pueden guardarse a temperatura inferior a -20°C hasta su análisis. Durante el análisis, las células se exponen al fragmento de anticuerpo y se determina la fijación anticuerpo-célula utilizando cualquiera de los métodos convencionales de inmunoensayo *in vitro* conocidos en la técnica. Por ejemplo, una sección de tumor puede exponerse al fragmento de anticuerpo de esta descripción sobre un portaobjetos de microscopio y analizarse utilizando técnicas inmunohistoquímicas estándar.

Las células de un individuo sospechoso de contener células multifarmaco-resistentes, tal como un paciente de cáncer, pueden exponerse también al fragmento de anticuerpo *in vivo*. En tales casos, el fragmento de anticuerpo se marca con un resto detectable, tal como un resto radiactivo, v.g., ^3H , ^{35}S , ^{14}C , ^{32}P o ^{125}I utilizando técnicas estándar y el fragmento de anticuerpo marcado se administra a un individuo sospechoso de contener células que sobreexpresan Pgp, preferiblemente por vía parenteral. Después de un periodo de tiempo predeterminado, se evalúan los cambios en los niveles de radiactividad en las células hospedadoras utilizando recuento de centelleo, auto-radiografía o técnicas de formación de imagen.

La metodología descrita anteriormente en esta memoria se practica preferiblemente utilizando un kit de detección. El kit incluye el fragmento de anticuerpo de la presente descripción, que está marcado preferiblemente con un resto detectable tal como un resto cromógeno (v.g., biotina), un resto fluorógeno (v.g., fluoresceína), un resto fotoemisor (v.g., luminol) o un resto radiactivo (v.g., ^{125}I). El kit incluye también reactivos adecuados para detectar el resto detectable empaquetados en un envase e identificados en forma impresa o en el envase para uso en el diagnóstico de células multifarmaco-resistentes. Procedimientos para marcación de anticuerpos con tales restos detectables se describen, por ejemplo, en "Using Antibodies: A Laboratory Manual" [Ed Harlow, David Lane eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1999)] y la detección de tales anticuerpos marcados puede realizarse utilizando procedimientos estándar de inmunoensayo bien conocidos en la técnica.

Como se ilustra en la sección de ejemplos que sigue, el fragmento de anticuerpo anti-Pgp de esta descripción es sumamente adecuado para uso como inhibidor de la actividad de eflujo de fármaco en las células multifarmaco-resistentes (MDR), particularmente por los atributos siguientes (i) el mismo tiene un tamaño molecular relativamente pequeño, confiriendo por tanto movilidad y suministro mejorados a las células diana, así como circulación corta en los fluidos corporales, lo cual minimiza las interacciones no deseadas con las células distintas de la diana; (ii) tiene una afinidad moderada para Pgp, lo cual minimiza adicionalmente las interacciones con las células distintas de la diana; y (iii) es capaz de expresarse *ex vivo* e *in vivo*.

De acuerdo con ello, el fragmento de anticuerpo de esta descripción puede utilizarse eficazmente para mejorar sustancialmente la quimioterapia de individuos que contienen células de cáncer multifarmaco-resistentes.

Así, de acuerdo con otro aspecto de la presente descripción, se proporciona un método de tratamiento del cáncer en un individuo que incluye proporcionar el fragmento de anticuerpo de esta invención a un individuo que padece cáncer, y administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente anti-cáncer, preferiblemente un agente que es citotóxico para las células del cáncer. El fármaco anti-cáncer puede administrarse antes de, simultáneamente a, o después de proporcionar el fragmento de anticuerpo. Preferiblemente, el fragmento de anticuerpo se proporciona al paciente suficientemente antes de la administración del agente anti-cáncer a fin de permitir que el fragmento de anticuerpo penetre en los tumores del individuo que contienen células MDR, para fijar las células MDR, y deteriorar la capacidad de eflujo de fármaco de tales células. El intervalo de tiempo requerido puede determinarse por métodos farmacocinéticos de rutina y debería esperarse que varíe con la edad, el peso, y el volumen corporal del individuo, así como con la localización y condición de los tumores que contienen las células MDR diana.

La expresión "agente anti-cáncer" y la expresión "fármaco quimioterapéutico" se utilizan en esta memoria de modo intercambiable y se refieren a un fármaco que puede utilizarse para tratar el cáncer.

Como se utiliza en esta memoria, el término "tratar" se refiere a inhibir, ralentizar o invertir sustancialmente la progresión de una enfermedad, tal como el cáncer.

El efecto de anticuerpo puede proporcionarse por administración directa del fragmento de anticuerpo al individuo, o alternativamente, por expresión del fragmento de anticuerpo en las células del individuo.

Cuando se administra directamente, el fragmento de anticuerpo se introduce con preferencia parenteralmente. El mismo puede administrarse por vía intravenosa, intraperitoneal, retroperitoneal, intrasistémica, intramuscular, subcutánea, tópica, intraorbital, intranasal o por inhalación. Pueden administrarse una o varias dosis en caso apropiado para alcanzar un nivel suficiente de fragmento de anticuerpo fijado a las células MDR diana a fin de producir una inhibición eficaz de la actividad de eflujo de fármaco en las células MDR para ser erradicadas por quimioterapia. La dosis global y el protocolo de administración para tratamiento con el fragmento de anticuerpo y un agente anti-cáncer, pueden ser diseñados y optimizados por el especialista clínico por aplicación de su experiencia clínica de rutina.

El fragmento de anticuerpo de esta descripción puede proporcionarse también por expresión en las células del individuo. Preferiblemente, el fragmento de anticuerpo que se expresa es un Fv monocatenario (scFv). Además, preferiblemente, el fragmento de anticuerpo se expresa selectivamente en las células diana tales como, pero sin carácter limitante, células de cáncer MDR, o en células que rodean las células del cáncer MDR (v.g., células tumorales distin-

tas de MDR), o en células hematopoyéticas en contacto con las células del cáncer MDR. La expresión del efecto anticuerpo en las células humanas puede efectuarse por introducción de la secuencia de polinucleótidos de esta descripción en las células diana de una manera que permite transformación y expresión transitoria o estable.

5 La introducción de la secuencia de polinucleótidos de esta invención en las células diana puede realizarse *ex vivo* o *in vivo*. En el método *ex vivo*, se extraen células de un individuo y se transforman con la secuencia polinucleotídica de esta descripción mientras se cultivan. Las células transformadas se expanden ulteriormente en cultivo y se devuelven luego al individuo. El método *ex vivo* es muy adecuado para uso junto con trasplantes autólogos de médula ósea. En tales procedimientos, las células de médula ósea se extraen del cuerpo de un paciente de cáncer, se enriquecen las células madre hematopoyéticas, se trata el paciente con quimioterapia exhaustiva, y finalmente, las células madre cultivadas se insertan de nuevo en el paciente a fin de permitir la regeneración de células hematopoyéticas.

15 En tales procedimientos, la quimioterapia falla a veces en erradicar todas las células del cáncer debido a la supervivencia de células multifarmaco-resistentes (MDR). La recurrencia del cáncer después de dicha quimioterapia intensiva, cuando el cuerpo es acusadamente inmuno-deficiente, es sumamente devastadora. El uso del método de la presente descripción, junto con el trasplante autólogo de médula ósea puede inhibir la actividad de MDR y reducir sustancialmente la probabilidad de recurrencia del cáncer.

Las secuencias codificantes del fragmento de anticuerpo pueden introducirse en las células madre hematopoyéticas extraídas del cuerpo y expresarse y secretarse subsiguientemente a partir de estas células *in vivo*, direccionando con ello a las células MDR del cáncer y mejorando sustancialmente la eficacia de la quimioterapia.

20 En el método *in vivo*, el polinucleótido se introduce directamente hacia las células diana en el interior del individuo. El polinucleótido de esta invención puede introducirse en las células por uno cualquiera de una diversidad de métodos conocidos en la técnica. Tales métodos pueden encontrarse descritos generalmente en Sambrook *et al.*, [Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory, Nueva York (1989, 1992)]; Ausubel *et al.*, [Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989)]; Chang *et al.*, [Somatic Gene Therapy, CRC Press, Ann Arbor, MI (1995)]; Vega *et al.*, [Gene Targeting, CRC Press, Ann Arbor MI (1995)]; Vectors [A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworths, Boston MA (1988)] y Gilboa *et al.* [Biotechniques 4 (6): 504-512 (1986)] e incluyen, por ejemplo, transfección estable o transitoria, lipofección, electroporación e infección con vectores virales recombinantes. Adicionalmente, véase la Patente de los Estados Unidos 4.866.042 para vectores que implican el sistema nervioso central, así como las Patentes de Estados Unidos 5.464.764 y 5.487.992 para métodos de selección positiva-negativa para inducción de recombinación homóloga.

35 Un método preferido para introducir un polinucleótido que codifica el fragmento de anticuerpo de la presente invención en las células de un individuo, es por utilización de un vector viral. Los vectores virales ofrecen varias ventajas, que incluyen mayor eficiencia de transformación, y el direccionamiento a, y la propagación en, tipos de células específicos. Los vectores virales pueden modificarse también con receptores o ligandos específicos para alterar la especificidad de diana a través de receptores celulares específicos, tales como receptores de células de cáncer.

40 Los vectores retrovirales representan una clase de vectores adecuados para uso con la presente invención. Retrovirus defectuosos se utilizan rutinariamente en la transferencia de genes en células de mamífero (para revisión, véase Miller, A.D., Blood 76:271 (1990)). Un retrovirus recombinante que incluye un polinucleótido codificante del fragmento de anticuerpo de la presente descripción puede construirse utilizando técnicas moleculares bien conocidas. Pueden eliminarse porciones del genoma retroviral a fin de hacer la replicación del retrovirus defectuosa y el retrovirus de replicación defectuoso puede empaquetarse luego en viriones, que pueden utilizarse para infectar células diana mediante el uso de un virus adyuvante y con empleo de técnicas estándar. Protocolos para la producción de retrovirus recombinantes y para infección de células *in vitro* o *in vivo* con tales virus pueden encontrarse en, por ejemplo, Ausubel *et al.*, [eds., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1989)]. Se han utilizado retrovirus para introducir una diversidad de genes en muchos tipos de células diferentes, con inclusión de células epiteliales, células endoteliales, linfocitos, mioblastos, hepatocitos y células de la médula ósea.

50 Otro vector de expresión adecuado puede ser un vector de adenovirus. El adenovirus es un vector de transferencia de genes extensamente estudiado y utilizarlo rutinariamente. Las ventajas fundamentales de un vector de adenovirus incluyen eficiencia de transducción relativamente alta de las células tanto en división como en reposo, tropismo natural para una amplia gama de tejidos epiteliales y producción fácil de títulos altos [Russel, W.C. [J. Gen. Virol. 81:57-63 (2000)]. El DNA de adenovirus se transporta al núcleo, pero no se integra en el mismo. Por tanto, el riesgo de mutagénesis con los vectores adenovirales se minimiza, en tanto que la expresión a corto plazo es particularmente adecuada para tratamiento de las células del cáncer, tales como células de cáncer multifarmaco-resistentes. Vectores de adenovirus utilizados en tratamientos experimentales del cáncer han sido descritos por Seth *et al.*

[Adenoviral vectors for cancer gene therapy. En: P. Seth (ed.) Adenoviruses: Basic biology to Gene Therapy, Landes, Austin, TX , (1999) pp. 103-120].

Un vector de expresión viral adecuado puede ser también un vector quimérico adenovirus/retrovirus que combina componentes retrovirales y adenovirales. Los resultados preliminares de la utilización de tales vectores para transducir células tumorales sugieren que este nuevo tipo de vector de expresión viral es más eficiente que los vectores de expresión tradicionales [Pan *et al.*, Cancer Letters 184:179-188 (2002)].

Un ejemplo específico de un vector viral adecuado para introducción y expresión de la secuencia de polinucleótidos de esta invención en un individuo es el vector derivado de adenovirus Ad-TK. Este vector expresa un gen de timidina-quinasa (TK) del herpes-virus para selección positiva o negativa e incluye una casete de expresión para secuencias recombinantes deseadas. Este vector puede utilizarse para infectar células que tienen un receptor de adenovirus que incluye la mayoría de los cánceres de origen epitelial [Sandmair *et al.* [Hum. Gene. Ther. 11:2197-2205 (2000)].

Pueden incluirse también características que limitan la expresión a tipos de células particulares. Tales características incluyen, por ejemplo, elementos promotores y reguladores que son específicos para el tipo de célula deseado. El vector viral puede incluir también una secuencia de nucleótidos que codifica una señal para secreción del fragmento de anticuerpo al exterior de la célula. Las señales de secreción contienen generalmente una secuencia corta (7-20 residuos) de aminoácidos hidrófobos. Señales de secreción adecuadas para uso en esta descripción están ampliamente disponibles y son bien conocidas en la técnica; véase, por ejemplo, por von Heijne [J. Mol. Biol. 184:99-105 (1985)] y por Lej *et al.* [J. Bacteriol. 169:4379 (1987)].

El vector recombinante puede administrarse de varias maneras. Si se utilizan vectores virales, el procedimiento puede aprovechar la ventaja de su especificidad de diana y por consiguiente, dichos vectores no tienen que administrarse localmente en el sitio del tumor. Sin embargo, la administración local puede proporcionar un tratamiento más rápido y más eficaz. La administración de vectores virales puede realizarse también, por ejemplo, por inyección intravenosa o subcutánea en el individuo. Después de la inyección, los vectores virales circularán hasta que reconocer las células hospedadoras con especificidad de diana apropiada para infección.

El fragmento de anticuerpo de la presente descripción, o el polinucleótido que codifica el mismo, pueden proporcionarse a un individuo *per se* o como ingrediente activo de una composición farmacéutica que incluye también un portador adecuado.

La composición farmacéutica de la presente descripción puede incluir adicionalmente un fármaco quimioterapéutico, preferiblemente un fármaco quimioterapéutico que es tóxico para las células del cáncer tal como, pero sin carácter limitante, doxorubicina, vincristina, colchicinas, VP-16, vinblastina, verapamil, mitoxantrona, taxol, ciclosporina A, quinidina, progesterona, tamoxifeno, epirubicina, daunorubicina, y MX2.

La composición farmacéutica puede administrarse de una o más maneras dependiendo de si se elige tratamiento local o sistémico, y del área a tratar. La administración puede hacerse tópicamente, (con inclusión de las vías oftálmica, vaginal, rectal, intranasal), o por vía oral, por inhalación, o parenteralmente, por ejemplo por goteo intravenoso o inyección intraperitoneal, subcutánea, intramuscular o intravenosa. Preferiblemente, la composición farmacéutica se administra por vía parenteral.

Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de la preparación activa en forma soluble en agua. Adicionalmente, pueden prepararse suspensiones del fragmento de anticuerpo como suspensiones apropiadas de inyección en aceite. Disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres sintéticos de ácidos grasos tales como oleato de etilo, triglicéridos o liposomas. Las suspensiones de inyección acuosa pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetil-celulosa sódica, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión puede contener también estabilizadores adecuados o agentes que aumentan la solubilidad del fragmento de anticuerpo para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

Las composiciones de la presente invención pueden, en caso deseado, presentarse en un paquete o dispositivo de dispensación, tal como un kit aprobado por la FDA, que puede contener una o más formas de dosificación unitarias que contienen el ingrediente activo. El paquete puede, por ejemplo, comprender metal o lámina plástica metalizada, tal como un envase burbuja. El paquete o dispositivo dispensador puede ir acompañado de instrucciones para su administración. El paquete o dispensador puede estar provisto también de una advertencia asociada con el recipiente en una forma prescrita por una agencia gubernamental reguladora de la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos, noticia que refleja la aprobación por la agencia de la forma de las composiciones o la administración humana o veterinaria. Dicha advertencia, por ejemplo, puede ser de etiquetado aprobado por la U.S.

Food and Drug Administration para fármacos de venta con receta o de anuncio como producto aprobado. Pueden prepararse también composiciones que comprenden una preparación de la descripción formulada en un portador farmacéutico compatible, disponerse en un envase apropiado, y etiquetarse para tratamiento de una afección indicada, como se ha detallado arriba anteriormente.

- 5 Adicionalmente, cada una de las diversas realizaciones y los diversos aspectos de la presente invención como se han descrito anteriormente en esta memoria y como se reivindican en la sección de reivindicaciones más adelante encuentra respaldo experimental en los ejemplos siguientes.

EJEMPLOS

10 Se hace ahora referencia a los ejemplos que siguen, que junto con las descripciones anteriores, ilustran la invención de manera no limitante.

Por regla general, la nomenclatura utilizada en esta memoria y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de DNA recombinante. Dichas técnicas se explican detalladamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías como las expuestas en las Patentes U.S. Núms. 4,666,828; 4,683,202; 4,801,531; 5,192,659 y 5,272,057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", volúmenes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Current Protocols in Immunology" volúmenes I-III Coligan I. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and

Clinical Immunology" (8ª edición), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., Nueva York (1980); inmunoensayos disponibles se describen extensamente en la literatura de patentes y científica; véanse, por ejemplo, las Patentes U.S. núms. 3,791,932; 3,839,153; 3,850,752; 3,850,578; 3,853,987; 3,867,517; 3,879,262; 3,901,654; 3,935,074; 3,984,533; 3,996,345; 4,034,074; 4,098,876; 4,879,219; 5,011,771 y 5,281,521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. L., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996). Otras referencias generales se proporcionan a lo largo de este documento. Se considera que los procedimientos de esta memoria son bien conocidos en la técnica y se proporcionan para comodidad del lector.

EJEMPLO 1

35 AISLAMIENTO DE UN Fv A2 MONOCATENARIO

Generación de Constructos de Presentación de Péptidos para Inmunización:

La secuencia peptídica GEMTDIFANAGNL (SEQ ID NO: 1) que corresponde a los aminoácidos 73-85 del primer bucle extracelular supuesto de la glicoproteína P humana (Pgp, GenBank Accesion Number NM000927.2) se sintetizó como ha sido descrito por Niv *et al.* (19). Los fagos recombinantes que presentan esta secuencia de aminoácidos se generaron utilizando los sitios de clonación *HinDIII* y *PstI* del bacteriófago filamentoso f88, como ha sido descrito por Frenkel y Solomon (17). El bacteriófago filamentoso recombinante f88 se utilizó para inmunizar ratones en 3 inyecciones intraperitoneales, de 10^{11} unidades de fago en PBS por inyección, a intervalos de 14 días. Las muestras de suero recogidas de los ratones inmunizados se examinaron por ELISA respecto a inmunorreactividad con este péptido. Los ratones que exhibían una respuesta inmune específica para el péptido diana se seleccionaron para construir una biblioteca de presentación del fago monocatenario Fv (scFv).

Construcción y cribado de la biblioteca de scFv:

Se generó una biblioteca de presentación de fago scFv utilizando RNA extraído de células de bazo de los ratones inmunizados con el fago arriba descritos, de acuerdo con el procedimiento descrito por Clackson *et al.* [(Nature 352:624-628 (1991)]. Resumidamente, segmentos polinucleotídicos correspondientes a los dominios variables de la cadena pesada (VH) y ligera (VL) de inmunoglobulina se amplificaron a partir del mRNA de células B del bazo de ratones inmunizados por RT-PCR, utilizando series específicas de iniciadores degenerados. Se ensamblaron las agrupaciones PCR VH y VL en un repertorio Fv monocatenario por una reacción de extensión de superposición PCR

y se clonaron subsiguientemente como un fragmento *Sfil-NotI* en el vector fagémido pCANTAB6. La complejidad de la biblioteca era 1×10^7 clones independientes. Para el lavado en batea, se agotó en primer lugar la biblioteca de ligantes de estreptavidina por incubación con bolitas magnéticas recubiertas con estreptavidina. Un péptido biotinilado que comprendía la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 ($1 \mu\text{M}$) se incubó luego con 10^{11} cfu de la biblioteca agotada (1 hora, a la temperatura ambiente), seguido por adición de bolitas magnéticas recubiertas con estreptavidina. Los fagos fijados se eluyeron utilizando 1 ml de trietilamina (100 mM, pH 12) durante 5 min a la temperatura ambiente, seguido por neutralización con 0,1 ml de Tris-HCl 1 M, pH 7,4. Los fagos eluidos se expandieron en células TG1 de *E. coli* en fase de crecimiento exponencial que se superinfectaron posteriormente con el fago adyuvante M13KO7 como ha sido descrito por Hoogenboom *et al.* (16).

Como se ilustra en la Tabla 1 siguiente, se observó un enriquecimiento progresivo y marcado, de fagos que fijan el péptido de SEQ ID NO: 1, después de 3 tandas de lavado en batea. Veinte clones de fago de 84 analizados después de la tercera tanda de lavado en batea exhibían actividad de fijación al péptido (datos no presentados). El análisis de la huella dactilar por medio de digestión con enzimas de restricción de corte múltiple de 10 clones específicos de péptido reveló que los mismos tenían un patrón de digestión similar, lo que sugería que todos ellos eran similares o idénticos (datos no presentados). La secuenciación del DNA de los dominios VH y VL de estos clones reveló que todos ellos eran idénticos, lo que sugería que se derivaban todos de un solo anticuerpo productor durante el suceso combinatorio VH/VL. El análisis de la secuencia y la comparación con la base de datos Kabbat reveló que el dominio A2 VH pertenece al subgrupo II de la cadena pesada del ratón, y el dominio VL al subgrupo de ratón Kappa II de cadenas ligeras. La secuencia de ácido nucleico del scFv construido a partir de estos dominios VH y VL se proporciona en SEQ ID NO: 2.

Tabla 1

Selección de la biblioteca de fago scFv para fijación al péptido de SEQ ID NO: 1

Ciclo	Entrada*	Salida*	Ratio (0/1)	Enriquecimiento
1	1×10^{11}	1×10^5	1×10^{-6}	1
2	1×10^{11}	1×10^7	1×10^{-4}	300
3	1×10^{11}	2×10^8	2×10^{-3}	2,000

* La entrada y salida de fago se determinó por titulación, determinando las cfu de fago de las células TG1 de *E. coli* infectadas antes y después de cada tanda de selección.

Expresión y purificación del scFv recombinante soluble:

La secuencia A2 scFv (SEQ ID NO: 2) se rescató del clon de fago por PCR y se subclonó en el vector fagémido pCANTAB6, utilizando los sitios de clonación *Sfil-NotI*. Se fusionaron un Myc (SEQ ID NO: 3) y marcadores hexahistidina al término C del gen scFv. El anticuerpo scFv se expresó en células BL21 (λ DE3) y se purificó de la fracción periplásmica por cromatografía de afinidad metal-ion, utilizando el marcador hexahistidina fusionado al término C. un análisis por SDS-PAGE del A2 scFv purificado se presenta en la Figura 1a.

EJEMPLO 2

ESPECIFICIDAD Y PROPIEDADES DE FIJACIÓN DE A2 scFv

El perfil molecular del anticuerpo A2 scFv se analizó por cromatografía de exclusión de tamaños y reveló un solo pico proteínico en una forma monómera con una masa molecular esperada de aproximadamente 30 kDa (datos no presentados). El rendimiento del A2 scFv era aproximadamente 2% (2 mg de una proteína altamente pura en un litro de cultivo).

La especificidad de fijación del anticuerpo A2 scFv purificado se determinó por ELISA. Un péptido diana biotinilado que tenía la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, o un péptido de control MRP1 no-diana (proporcionado a $10 \mu\text{g}$ en $100 \mu\text{l}$) se inmovilizaron cada uno en una placa flexible de microtitulación utilizando BSA-biotina-estreptavidina. Se añadió luego un A2 scFv purificado, a diferentes concentraciones, a la placa recubierta con el péptido y se detectó con un anticuerpo conjugado marcador anti Myc-HRP.

Los resultados del ELISA, presentados en la Figura 1b, muestran que el anticuerpo A2 scFv reaccionaba positivamente y de una manera dependiente de la dosis con el péptido diana derivado de Pgp (SEQ ID NO: 1). En comparación, A2 scFv no reaccionaba con el péptido de control MRP1 no-diana.

Las propiedades de fijación de A2 scFv se caracterizaron ulteriormente utilizando un ELISA a saturación. En este experimento, un péptido biotinilado derivado de Pgp (SEQ ID NO: 1) se fijó a placas previamente recubiertas con

BSA-biotina y expuestas a cantidades crecientes de A2 scFv. Los resultados del ELISA que se ilustran en la Figura 1c muestran que la fijación de A2 scFv al péptido diana era dependiente de la dosis y saturable. Por interpolación de la cantidad de A2 scFv necesaria para 50% de la fijación máxima, se estimó la constante de afinidad a 150 nM, indicando una afinidad moderada.

- 5 En un radio-inmunoensayo de fijación a competición, el A2 scFv purificado (100 µg) se marcó primeramente con [¹²⁵I] utilizando el reactivo Bolton-Hunter. El anticuerpo A2 scFv marcado con [¹²⁵I] se añadió como trazador (3-5 x 10⁵ cpm/pocillo) a una placa flexible de microtitulación, que se había recubierto previamente con BSA-biotina y el péptido diana (SEQ ID NO: 1), como se ha descrito arriba. Se añadió luego un A2 scFv sin marcar (es decir, frío), como competidor, a las placas pre-recubiertas a concentraciones crecientes. Las placas se incubaron durante una hora a la temperatura ambiente, se lavaron luego y analizaron por un contador gamma. Los resultados del radio-inmunoensayo, ilustrados en la Figura 1d, muestran que la fijación del anticuerpo A2 scFv marcado con [¹²⁵I] al péptido diana derivado de Pgp (que tenía la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1) era dependiente de la dosis. Por interpolación de la cantidad del competidor (frío) A2 scFv necesaria para 50% de la fijación máxima, se estimó la constante de afinidad a 130 nM, indicando una afinidad moderada.
- 10
- 15 En otra serie de experimentos, se evaluó la reactividad y especificidad de A2 scFv para Pgp, expresada en la superficie de células MDR. Estos experimentos utilizaron líneas de células de carcinoma humano que presentan un fenotipo MDR estable dependiente de Pgp, así como sus células respectivas parentales farmaco-sensibles. Las líneas de células MDR y las líneas de células farmaco-sensibles utilizadas en estos experimentos se describen a continuación en la Tabla 2.

20

Tabla 2

Tejido de Origen	Línea de Células MDR	Línea de Células Farmaco-sensibles
Carcinoma de ovario humano	2780 ^{ADR} *	2780 *
Carcinoma epidermoide humano	KBV-1 **	KB3-1 **

* 2780^{ADR} se estableció a partir de la línea de células 2780 farmaco-sensibles (21).

** KBV-1 se estableció a partir de la línea de células KB3-1 farmaco-sensibles (24).

- 25 Las células farmaco-sensibles y las células MDR (5 x 10⁵) se lavaron con PBS, y se suspendieron de nuevo en medio RPMI-1640 (GIBCO). Las células que crecían sobre placas de cultivo de tejidos de 6 pocillos se lavaron dos veces seguido por incubación con A2 scFv soluble purificado (50 µg/ml) durante 90 minutos en hielo. La detección se realizó con anti-Myc (30 µg/ml) e IgG anti-ratón marcada con FITC (1:1000, Jackson). La detección de las células fluorescentes se realizó en un FACScalibur (Becton Dickinson).

- 30 Las Figuras 2a-d muestran un análisis comparativo de citometría de flujo con inmuno-fluorescencia, que ilustra una fuerte reactividad de A2 scFv con las líneas de células MDR 2780^{ADR} (Figura 2b) y KBV-1, en tanto que no se observó reactividad alguna con las líneas de células 2780 (Figura 2a) y KB3-1 (Figura 2c) farmaco-sensibles.

- 35 La especificidad y reactividad del anticuerpo A2 scFv para las células MDR y que sobreexpresan Pgp se demostró ulteriormente por análisis comparativos de inmuno-histoquímica. Las células farmaco-sensibles y las células MDR se cultivaron hasta 50% de confluencia sobre portaobjetos de vidrio, prerrecubiertos con gelatina al 4% en PBS, se fijaron con formaldehído al 2% en PBS, se bloquearon con BSA al 1% en PBS a la temperatura ambiente, seguido luego por 90 minutos de incubación con A2 scFv (0,2 mg/ml) en PBS que contenía 1% de BSA (temperatura ambiente). Los portaobjetos se cubrieron luego con anticuerpo anti-Myc marcado con HRP (1:500, en PBS que contenía 1% de BSA) durante una hora, se lavaron con agua y se cubrieron luego con sustrato de peroxidasa, (AEC) durante 2-3 min. Los portaobjetos se lavaron luego con agua y se realizó contratinción con hematoxilina. Como se ilustra en las Figuras 2e-h, el anticuerpo A2 scFv exhibía una tinción intensa *in situ* de las células MDR 2780^{ADR} y KBV-1 (Figuras 2e y 2g, respectivamente), mientras que, por el contrario, A2 scFv no teñía las respectivas células parentales 2780 y KB3-1 farmaco-sensibles (Figuras 2f y 2h, respectivamente).
- 40

- 45 Por consiguiente, los resultados descritos anteriormente en esta memoria demuestran claramente que el anticuerpo A2 scFv fija selectivamente la Pgp expresada en la superficie de las células humanas y no fija las células humanas farmaco-sensibles que carecen de o expresan marginalmente Pgp.

EJEMPLO 3**FUNCIÓN BIOLÓGICA DE A2 scFv**

El efecto de A2 scFv sobre la actividad de eflujo de fármaco de Pgp se evaluó en una serie de ensayos de eflujo de cromóforo. Los ensayos utilizaron el sustrato fluorescente hidrófobo de Pgp calceína-AM (Molecular Probes, Eugene, Oregon), dado que existe una relación inversa entre el nivel de actividad de Pgp y la acumulación de calceína en las células MDR (Hollo *et al.* (20)). El A2 scFv se aplicó a líneas de células humanas y de roedor (CHO) que exhiben un fenotipo MDR estable dependiente de Pgp, y sus células parentales respectivas farmaco-sensibles, como se describe en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3

Tejido de Origen	Línea de Células MDR	Línea de Células Farmaco-sensibles
Carcinoma de ovario humano	2780 ^{ADR} *	2780 *
Carcinoma epidermoide humano	KBV-1 **	KB3-1 **
Roedor (CHO)	EMT ^{R1} ***	A8 ***

*2780^{ADR} se estableció a partir de la línea de células 2780 farmaco-sensibles (21).

** KBV-1 se estableció a partir de la línea de células KB3-1 farmaco-sensibles (24).

*** EMT^{R1} se estableció a partir de la línea de células A8 farmaco-sensibles (23).

Las células farmaco-sensibles y las células MDR (5×10^5) se lavaron con PBS, y se suspendieron en tampón HPMI (HEPES 10 mM a pH 7,4 que contenía NaCl 120 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 0,4 mM, NaHCO₃ 10 mM, Na₂HPO₄ 5 mM, y glucosa 10 mM). Las suspensiones de células se preincubaron varias veces con diversas concentraciones de A2 scFv, y se complementaron luego con calceína-AM 1 μ M (un sustrato fluorescente hidrófobo de Pgp; Molecular Probes, Eugene, Oregon) y se dejaron durante 5-15 minutos de incubación a 37°C. Después de la incubación, las células tratadas y sin tratar se expusieron a calceína y se analizaron respecto a intensidad de fluorescencia (493-515 nm por un fluorómetro estándar o por un citómetro de flujo (FACScalibur, Becton Dickinson).

La Figura 3a ilustra que la línea de células MDR 2780^{ADR} acumulaba 5 y 10 veces menos calceína (después de 5 ó 15 minutos de incubación, respectivamente), en comparación con la línea de células 2780 parental farmaco-sensible. Análogamente, los resultados de un ensayo de citometría de flujo, ilustrados en la Figura 3b, demuestran que la línea de células MDR 2780^{ADR} exhibía una intensidad media de fluorescencia sustancialmente menor que la línea de células parental respectiva 2780 farmaco-sensible. Estos resultados demuestran claramente la capacidad funcional de las células MDR y las células que sobreexpresan Pgp para extrudir sustratos cromóforos como calceína-AM.

En un experimento similar, se añadió A2 scFv a células 2780^{ADR}, durante 10-30 minutos antes de la adición de calceína-AM. El tratamiento con A2 scFv dio como resultado un aumento sustancial en la intensidad de fluorescencia de las células, indicando una disminución sustancial en la actividad de eflujo de fármaco. De acuerdo con ello, la Figura 3c muestra que la acumulación de calceína en las células tratadas con A2 scFv era 4-5 veces mayor que la acumulación de calceína en las células no tratadas con A2 scFv. Los resultados ilustrados en la Figura 3c muestran adicionalmente que el efecto inhibitorio de A2 scFv sobre la actividad de eflujo de fármaco de las células 2780^{ADR} era dependiente de la dosis y exhibía una actividad inhibitoria máxima a 100 μ g/ml (es decir 4 μ M). El efecto inhibitorio de eflujo de fármaco de A2 scFv era similar al efecto inhibitorio de eflujo de fármaco observado con verapamil 15 μ M, un modulador conocido del eflujo de fármaco Pgp (8). Se observó un efecto similar por un análisis de citometría de flujo, como se ilustra en la Figura 3d. Estos resultados indican que el anticuerpo A2 scFv puede inhibir eficazmente la actividad de eflujo de fármaco de las células humanas MDR y las que sobreexpresan Pgp.

En otro ensayo, se comparó la actividad moduladora del eflujo de fármaco de A2 scFv con G1 scFv [aislado contra un antígeno tumoral asociado al melanoma (22)]. Los resultados del ensayo, ilustrados en la Figura 3e, muestran que mientras que el A2 scFv inhibía sustancialmente la actividad de eflujo de fármaco de 2780^{ADR}, el tratamiento con el anticuerpo G1 scFv no tenía efecto alguno.

Se evaluó en una serie de ensayos el efecto de A2 scFv sobre la actividad de eflujo de fármaco de otras líneas de células que sobreexpresan MDR y Pgp, y sus líneas de células parentales farmaco-sensibles. Las Figuras 4a-b ilustran el efecto de A2 scFv sobre la actividad de eflujo de fármaco de las células MDR y las células EMT^{R1} y KBV-1

que sobreexpresan Pgp. Los resultados muestran aumentos sustanciales en la acumulación de calceína, indicando la inhibición del eflujo de fármaco en las células tratadas con A2 scFv.

5 Para establecer que la actividad inhibidora de la molécula A2 scFv no es debida a toxicidad celular inespecífica, se realizaron experimentos adicionales en los cuales se preincubó A2 scFv, antes de la adición de calceína, con las líneas de células farmaco-sensibles 2780, KB3-1 y A8. Los resultados, ilustrados en la Figura 4c-e, muestran que el tratamiento con A2 scFv no afectaba al nivel de acumulación de calceína en ninguna de estas células, indicando la ausencia de efecto sobre la actividad de eflujo de fármaco de las células farmaco-sensibles tratadas con A2 scFv .

10 La eficiencia de la inhibición del eflujo de fármaco de A2 scFv se evaluó ulteriormente en otro ensayo en el cual se proporcionó el A2 scFv, a concentraciones crecientes, a células MDR 2780^{ADR}, seguido por la adición de calceína-AM. Los resultados, ilustrados en la Figura 5a, muestran que A2 scFv aumentaba la acumulación de calceína en las células de una manera dependiente de la dosis y saturable. La actividad inhibidora mínima detectable se observó con una concentración de A2 scFv de 0,025 mg/ml (1 μ M). La actividad inhibidora de saturación se observó con una concentración de A2 scFv que excedía de 0,1 mg/ml (4 μ M). La concentración de la molécula A2 scFv que inhibe el 50% de la actividad de eflujo de fármaco (CI_{50}) se estimó en 65 μ g/ml (2,6 μ M).

15 Se evaluó el efecto de la molécula A2 scFv sobre la supervivencia de 2780^{ADR}, expuestas a doxorubicina (un fármaco quimioterapéutico), basado en el nivel de [³H]leucina en las células, un indicador de la viabilidad celular. Las células se preincubaron con A2 scFv a una concentración de 0,2 mg/ml, se expusieron luego a 5-10 μ M de doxorubicina y se analizaron después respecto a contenido de [³H]leucina. Como se ilustra en la Figura 5b, el tratamiento con A2 scFv reducía eficazmente la viabilidad de las células expuestas a doxorubicina, en comparación con las células sin tratar con A2 scFv. Estos resultados demuestran que A2 scFv puede inhibir la actividad de eflujo de fármaco mediada por Pgp en las células multifarmaco-resistentes, soslayando con ello la resistencia a los fármacos.

20 Así pues, en conclusión, los resultados presentados en esta memoria demuestran claramente que el anticuerpo A2 scFv de la presente invención reacciona selectivamente con las células que sobreexpresan Pgp y es por consiguiente un inhibidor eficaz de la actividad de eflujo de fármaco en las células multifarmaco-resistentes.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Reiter, Yoram
 <120> FRAGMENTO DE ANTICUERPO CAPAZ DE MODULAR LA MULTIRRESISTENCIA Y COMPOSICIONES Y KITS Y MÉTODOS QUE UTILIZAN EL MISMO
 AND KITS AND METHODS USING SAME
 <130> 27329
 <160> Secuencia artificial
 <170> Péptido derivado de la proteína 1 (MDR1) de multifarmaco-resistencia
 <210> 1
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220> Secuencia artificial
 <223> Multidrug resistance protein 1 (MDR1) derived peptide
 <400> Secuencia codificante de A2 Fv monocatenario
 Gly Glu Met Thr Asp Ile Phe Ala Asn Ala Gly Asn Leu
 1 5 10
 <210> 2
 <211> 723
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> A2 single chain Fv coding sequence
 <400> 2
 cagggtccaac tgcagcagtc tggacctgac ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata 60
 tcttgcgaagg cttctggtta ctcattcact ggetactaca tgcactgggt gaagcagagc 120
 catgaaaga gccttgagt gattggagct gctaataccta acaatggttg tactagctac 180
 Secuencia artificial
 aaccag Secuencia codificante del marcador Myc caaagcagc agtcatccag cacagcctac 240
 atggagcttc gcagctcag atctgagggc tctgcagctc attactgtgc aagatgggac 300
 ggggcttact ggggccaagg gactctggtc actgtctctt cgggaggttg tggatccggc 360
 ggtggcgggt ctggtggagg tggatctgat gttgtgatga cccaaactcc actctccctg 420
 cctgtcagtc ttggagatca agcctccatc tcttgcatg ctagtccagc cattgtacat 480
 agtaatggaa acacctatct agaatggtac ctgcagaaac caggccagtc tccaaagctc 540
 ctgatctaca aagtttccaa ccgattttct ggggtcccag acagggttcag tggcagtgga 600
 tcagggacag atttcacact caagatcagc agagtggagg ctgaggatct gggagtttat 660
 tactgcttcc aaggttcaca tgttccattc acgttcggct cggggaccaa gctggaactg 720
 aaa 723
 <210> 3
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Myc-tag coding sequence
 <400> 3
 gaacaaaaac tcattctcaga agaggatctg aat 33

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Un anticuerpo Fv monocatenario que comprende una región de fijación de antígeno capaz de fijar una porción extracelular de una glicoproteína P, en donde el anticuerpo Fv monocatenario es capaz de inhibir al menos parcialmente la actividad de eflujo de fármaco en células multifarmaco-resistentes y en donde dicha región de fijación de antígeno está codificada por una secuencia de ácido nucleico como se expone en SEQ ID NO: 2.
- 2.- El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde dichas células multifarmaco-resistentes son células de cáncer.
- 3.- El anticuerpo de la reivindicación 2, en donde dichas células de cáncer son células de cáncer humanas.
- 10 4.- Una composición farmacéutica, que comprende, como ingrediente activo, el anticuerpo Fv monocatenario de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 5.- La composición farmacéutica de la reivindicación 4, que comprende adicionalmente un fármaco quimioterapéutico.
- 6.- La composición farmacéutica de la reivindicación 5, en donde dicho fármaco quimioterapéutico es tóxico para las células del cáncer.
- 15 7.- Uso de la composición farmacéutica de la reivindicación 5 ó 6 para la fabricación de un medicamento para tratamiento del cáncer en un individuo.
- 8.- Un kit para diagnóstico de células que sobreexpresan glicoproteína P, que comprende el anticuerpo Fv monocatenario de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y reactivos para detectar dicho anticuerpo.
- 20 9.- El kit de la reivindicación 8, que comprende adicionalmente material de empaquetado que identifica dicho anticuerpo Fv monocatenario para uso en el diagnóstico de células que sobreexpresan glicoproteína P extracelular.
- 10.- Un método *in vitro* de detección de células que sobreexpresan glicoproteína P, que comprende:
- (a) exponer las células al anticuerpo monocatenario de cualquiera de las reivindicaciones 1-3; y
- (b) detectar dicho anticuerpo Fv monocatenario fijado a dicha porción extracelular de dicha glicoproteína P, identificando con ello las células que sobreexpresan glicoproteína P extracelular.
- 25 11.- El método de la reivindicación 10, en donde dichas células son de una muestra biológica de un individuo.
- 12.- El kit de la reivindicación 8 ó 9, o el método de la reivindicación 10 ó 11, en donde dicho anticuerpo Fv monocatenario está marcado con un resto detectable.
- 13.- El kit o el método de la reivindicación 12, en donde dicho resto detectable se selecciona del grupo constituido por un resto cromógeno, un resto fluorógeno, un resto fotoemisor y un resto radiactivo.
- 30 14.- Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico como se expone en SEQ ID NO: 2.
- 15.- Un constructo de ácido nucleico que comprende el polinucleótido de la reivindicación 14 y un promotor para regulación de la expresión de dicho polinucleótido.
- 16.- Una célula que comprende el constructo de ácido nucleico de la reivindicación 15.

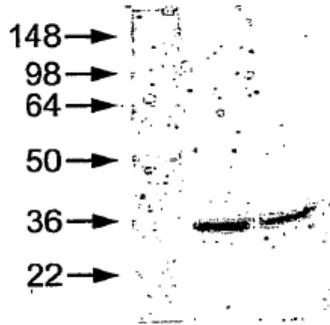


Fig. 1a

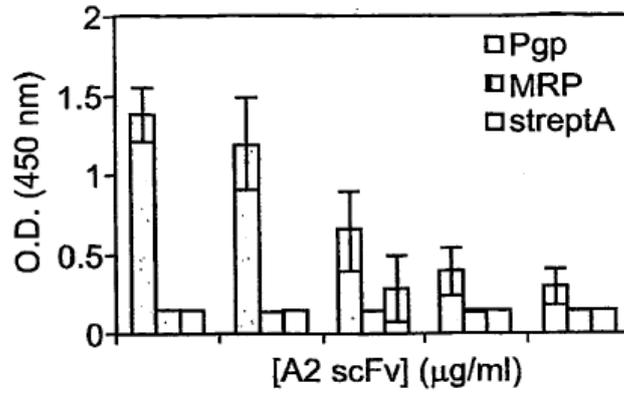


Fig. 1b

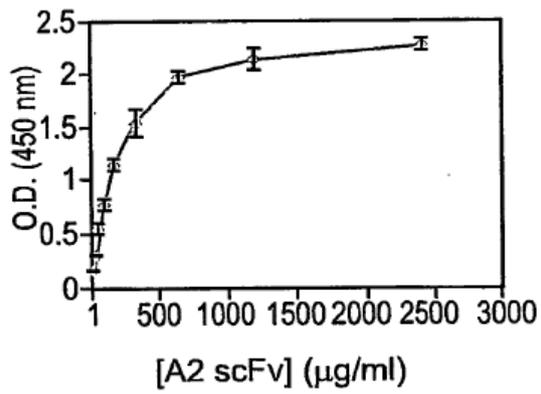


Fig. 1c

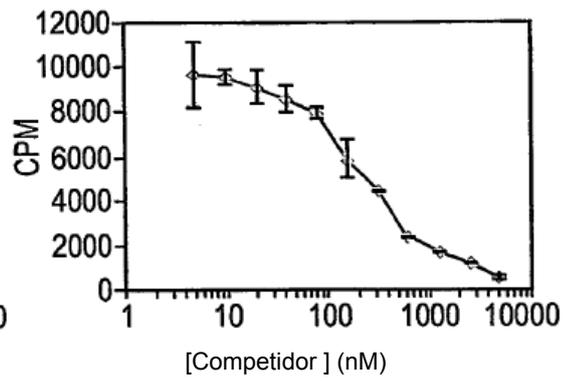


Fig. 1d

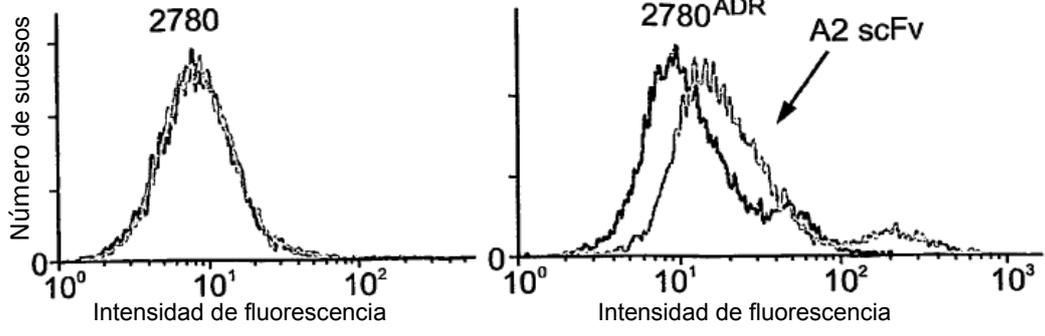


Fig. 2a

Fig. 2b

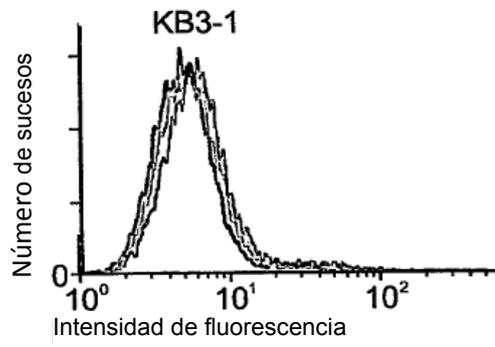


Fig. 2c

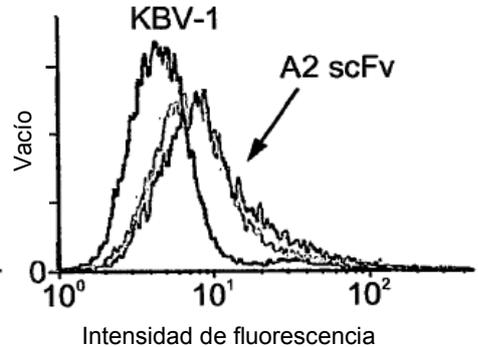


Fig. 2d



Fig. 2e

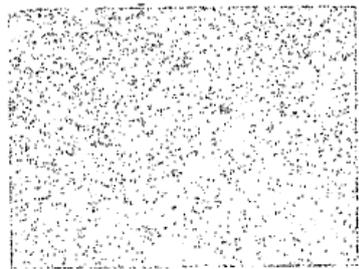


Fig. 2f

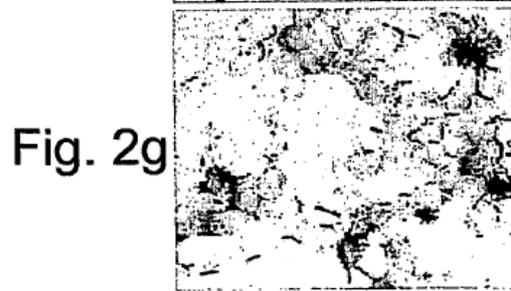


Fig. 2g

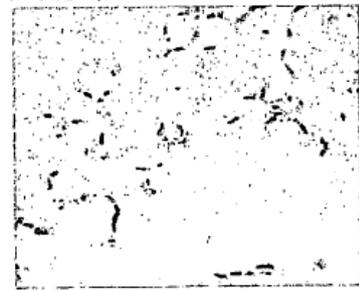


Fig. 2h

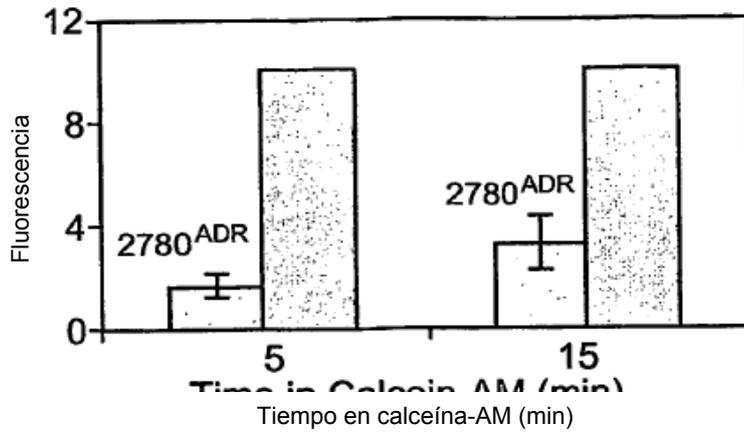


Fig. 3a

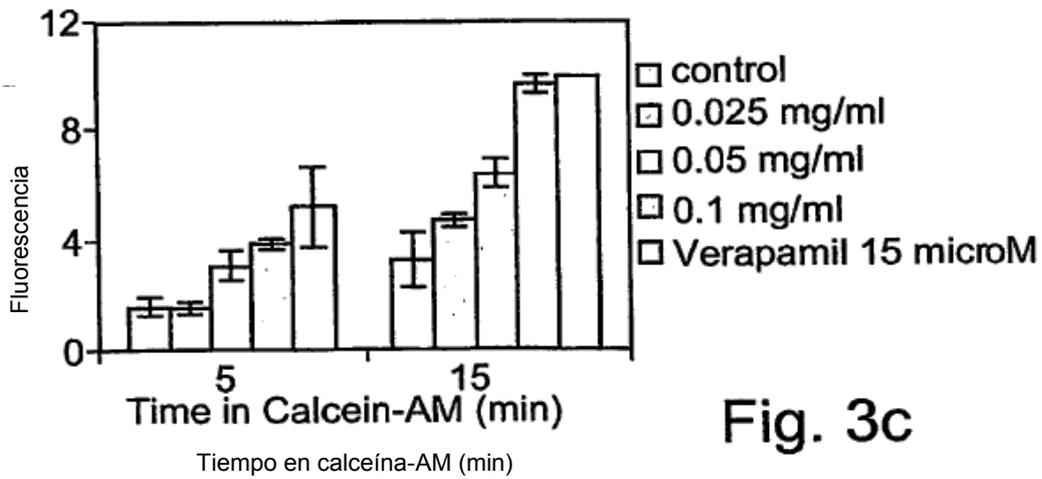
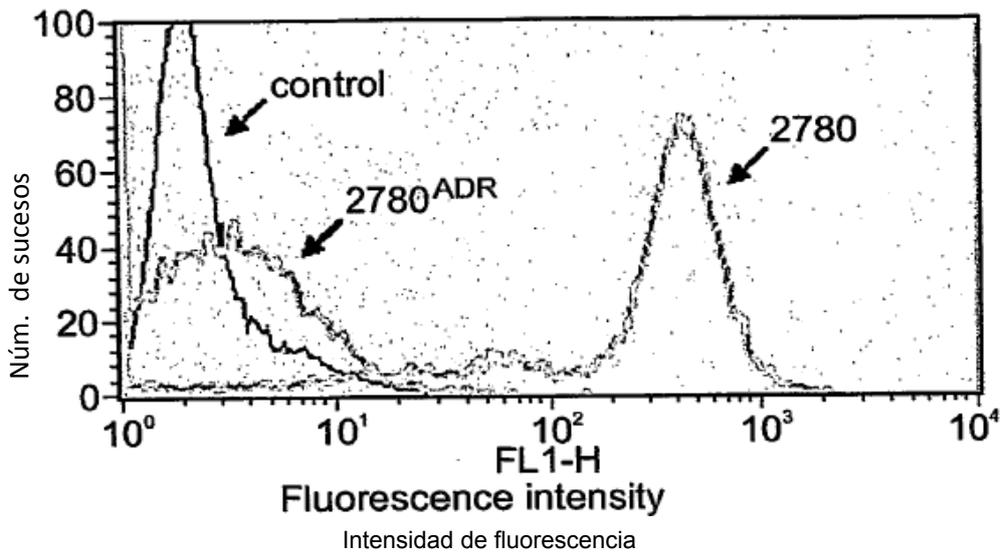
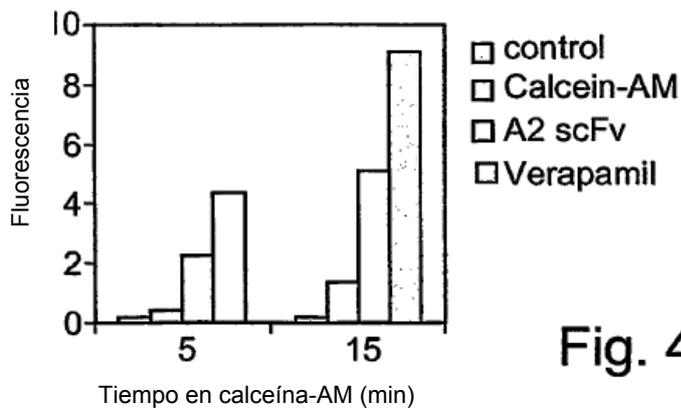
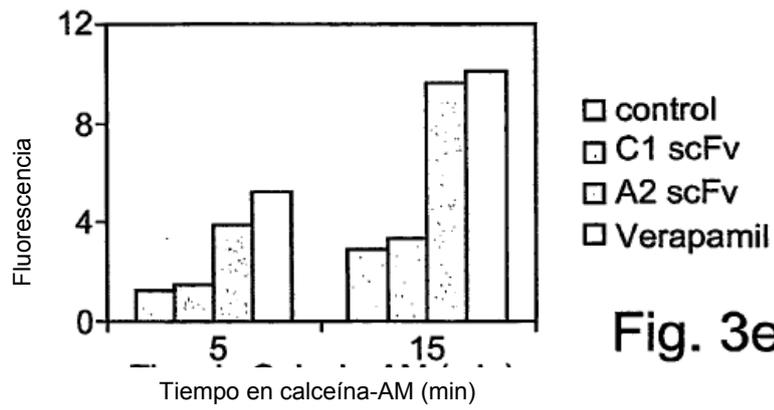
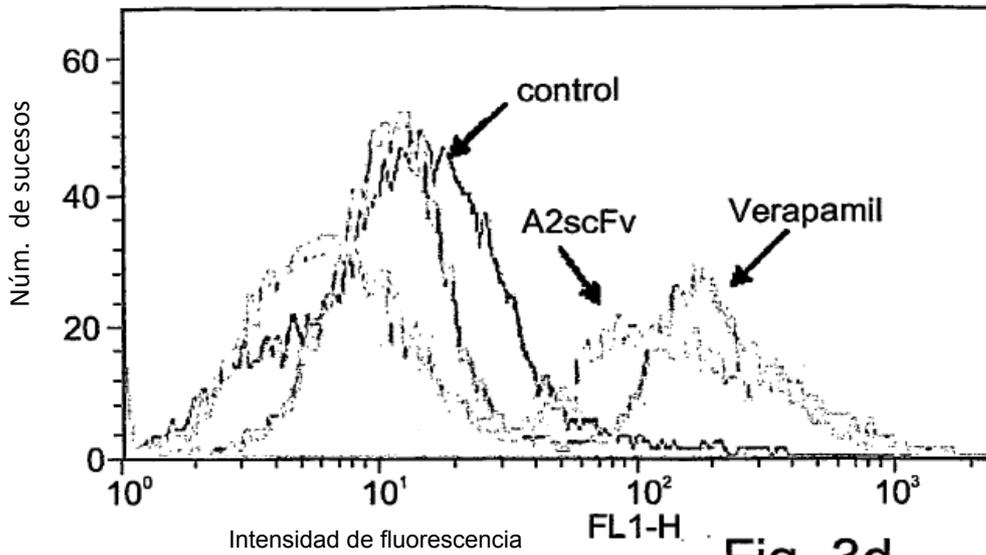


Fig. 3c



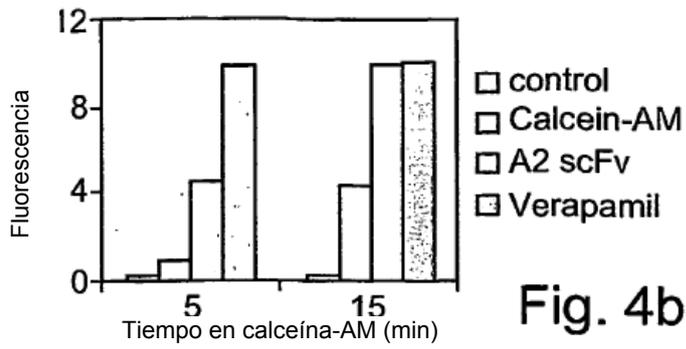


Fig. 4b

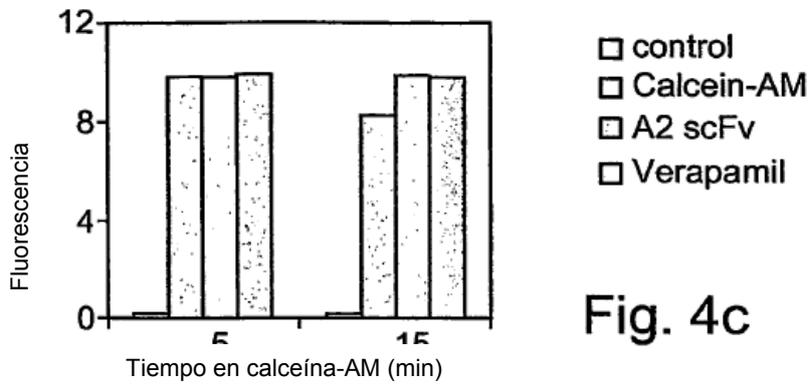


Fig. 4c

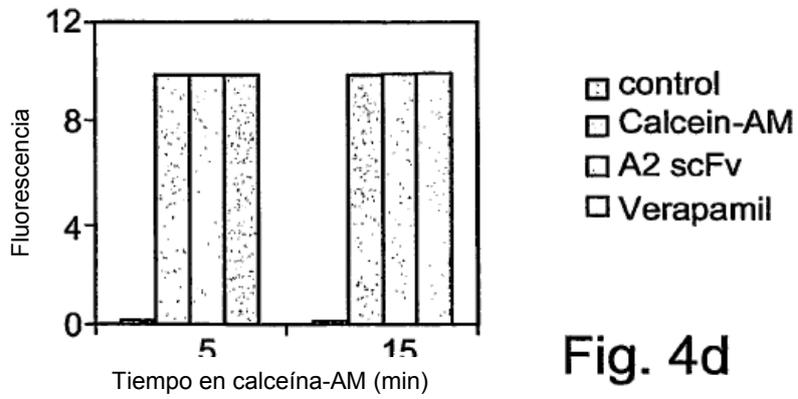


Fig. 4d

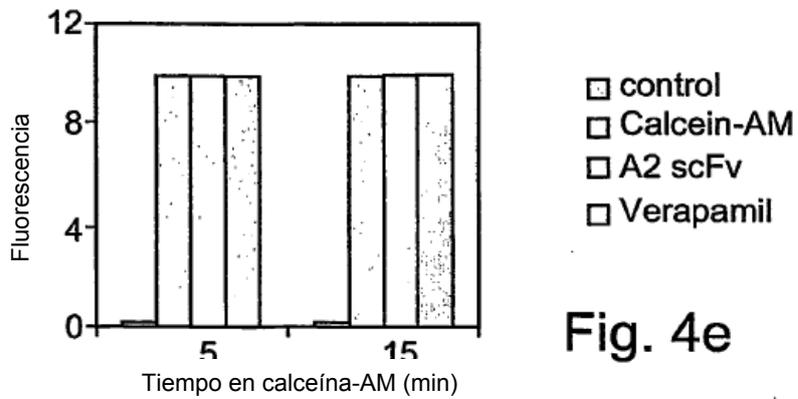


Fig. 4e

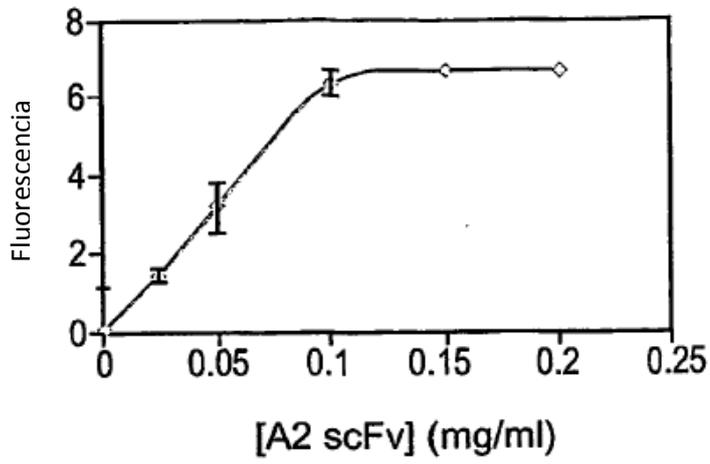


Fig. 5

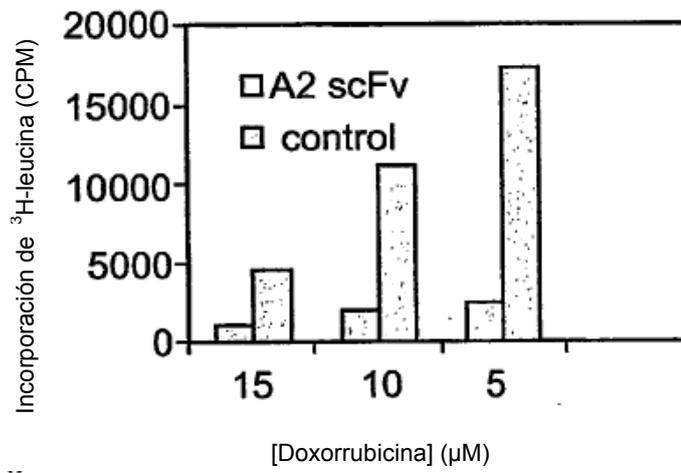


Fig. 6