

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 706 409**

51 Int. Cl.:

C07K 16/30 (2006.01)

C12N 9/88 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.06.2011 PCT/EP2011/003444**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.12.2011 WO11160859**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.06.2011 E 11738959 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2018 EP 2582726**

54 Título: **Derivados de anticuerpos**

30 Prioridad:

21.06.2010 GB 201010389

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

28.03.2019

73 Titular/es:

**ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ (50.0%)
Viale Regina Elena, 299
00161 Roma, IT y
DIATHEVA S.R.L. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**CIANFRIGLIA, MAURIZIO;
FLEGO, MICHELA;
ASCIONE, ALESSANDRO;
FIORI, VALENTINA;
DOMINICI, SABRINA;
MALLANO, ALESSANDRA;
MORICOLI, DIEGO y
ZAMBONI, SILVIA**

74 Agente/Representante:

RIZZO, Sergio

ES 2 706 409 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

Derivados de anticuerpos

[0001] La presente invención se refiere a proteína de fusión que comprende un fragmento variable de cadena sencilla (scFv), a sus formas monoméricas y oligoméricas, y a procesos para la producción de las mismas.

5 **[0002]** Los enfoques farmacológicos convencionales para el tratamiento de tumores se ven afectados por una selectividad pobre, comprometiendo así el aumento de dosis a niveles más activos desde el punto de vista terapéutico. Por lo tanto, el desarrollo de terapias para el cáncer selectivas y mejor toleradas representa un objetivo importante en la investigación de tratamientos nuevos y más efectivos. Una manera para mejorar la selectividad de moléculas terapéuticas es dirigirse al lugar del tumor, evitando de este modo tejidos normales.
10 Los tratamientos oncológicos basados en anticuerpos ofrecen una solución a este problema y han proporcionado resultados prometedores en varios tumores malignos (4).

[0003] El éxito generalizado de la tecnología de hibridoma murino ha dado como resultado el descubrimiento de numerosos anticuerpos monoclonales (mAb) bien caracterizados con especificidades únicas. Muchos de estos mAb muestran un potencial terapéutico considerable al inhibir la proliferación celular o como vehículos para dirigirse a radionúclidos, agentes citotóxicos e inmunomoduladores (5). Un importante avance en el campo de la ingeniería de anticuerpos fue la generación de fragmentos de anticuerpos como proteínas recombinantes en el espacio periplásmico de *Escherichia coli* (6).

[0004] El Fv de cadena sencilla (ScFv) es el fragmento de anticuerpo más pequeño que conserva las propiedades de unión al anticuerpo parental. Están estructurados como cadenas polipeptídicas únicas que incorporan una cadena pesada variable y una región variable de cadena ligera, enlazadas a través de un conector polipeptídico. Los anticuerpos monoclonales en formato scFv representan moléculas valiosas adecuadas para aplicaciones clínicas, tales como la administración dirigida de fármacos, toxinas o para el diagnóstico tumoral por imágenes. En comparación con los anticuerpos monoclonales de longitud completa, presentan una mejor penetración del tumor (7; 8; 9) sin ninguna toxicidad significativa, aunque presentan un rápido aclaramiento de la sangre (10). Para ralentizar el aclaramiento de scFv, estas moléculas se pueden modificar también para incorporar un residuo de cisteína carboxi-terminal, permitiendo de este modo la formación de un fragmento (de scFv)₂ en virtud de la formación de puentes disulfuro (11; 12). Otra molécula bivalente es un «diacuerpo» (13), que se forma a partir de dos scFv enlazados de manera no covalente por medio de un conector corto. Otra posibilidad es un «minicuerpo», en el cual 2 fragmentos de scFv están enlazados a través de un componente de la región de cadena pesada (por ejemplo, CH₃), dando como resultado una molécula bivalente (14), o bien mediante reticulación química (15).

[0005] El antígeno carcinoembrionario (CEA) es un objetivo que resulta atractivo para fines inmunoterapéuticos, debido a su perfil de expresión, su función en la progresión tumoral, y su inmunogenicidad. CEA pertenece a la superfamilia de inmunoglobulina CD66 que comprende también CEACAM1, el cual ha suscitado recientemente un considerable interés como diana de antígeno de cáncer (16). Estudios preclínicos en melanomas muestran que la expresión de la molécula de adhesión celular, CEACAM1, es un factor independiente del riesgo de metástasis, con un valor predictivo superior al del grosor del tumor (17). De hecho, CEACAM1 también parece ser una prometidora diana endotelial para el tratamiento del cáncer de vejiga; esta molécula está implicada en la transición del cáncer de vejiga no invasivo y no vascularizado a invasivo y vascularizado (18). Además, CEACAM1, que no se expresa en el pulmón, ha sido identificado en carcinoma de este tejido (19).

[0006] Durante las últimas dos décadas, se ha producido y caracterizado una serie de mAb en los dominios extracelulares de CEA y CEACAM1. Sin embargo, la administración selectiva de componentes bioactivos en las células de CEA que expresan el tumor utilizando esta clase de anticuerpos presenta varias limitaciones, incluyendo la respuesta del anticuerpo humano anti-ratón (HAMA, por sus siglas en inglés) (20). Por lo tanto, el aislamiento de un anticuerpo específico CEA es un primer paso hacia la construcción de nuevos anticuerpos monoclonales anticancerígenos diseñados para administrar agentes bioactivos de manera selectiva.

[0007] La tecnología de anticuerpos fagos puede ayudar a aportar una solución, debido a que se pueden aislar fragmentos de anticuerpos humanos procedentes de repertorios de fragmentos expuestos en bacteriófagos filamentosos (21; 22). El proceso no necesita la inmunización de humanos, y los fragmentos de anticuerpos se pueden realizar tanto frente a antígenos foráneos como humanos. Estos fragmentos inmunocompetentes se secretan en el periplasma bacteriano y en el medio de cultivo, y se pueden producir a gran escala utilizando sistemas celulares procariotas estables y seguros (23).

[0008] La utilidad de bibliotecas de anticuerpos fagos como herramienta para generar scFv frente a antígenos asociados a tumores ha sido ampliamente empleada en los últimos 5 años, y más de 50 anticuerpos humanos desarrollados con esta técnica se encuentran en evaluación clínica de seguridad y eficacia para el tratamiento de cánceres (24). Además, hemos explorado la presentación eficiente de anticuerpos recombinantes en fagos filamentosos, mostrando que los scFv solubles humanos seleccionados de la biblioteca ETH-2 (25) pueden producir agentes capaces de reconocer de manera específica células cancerosas metastásicas de melanoma, mama, colon y pulmón (1).

[0009] Sorprendentemente, se ha descubierto ahora que un scFv anti-CEA que presenta una secuencia líder de Pel B no escindida es capaz de formar oligómeros, es estable y es altamente específica para CEA y CEACAM1.

[0010] Así, en el presente documento, se da a conocer una proteína de fusión que comprende un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) específico para CEA y CEACAM, y una secuencia líder escindible mediante peptidasa Pel B de *E. coli*.

[0011] En un primer aspecto, la presente invención expone una proteína de fusión que comprende un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) específico para cada uno del antígeno carcinoembrionario (CEA) y la molécula de adhesión celular asociada a CEA 1 (CEACAM1), y una secuencia líder, comprendiendo dicha secuencia líder la totalidad, o al menos 18 de los 22 aminoácidos, de la secuencia líder Pel B de *E. coli*, donde la porción scFV comprende la secuencia de aminoácidos de la porción VH y VL de la SEQ ID N.º 2, o donde la porción scFV comprende la secuencia de aminoácidos de la porción VH y VL de la SEQ ID N.º 2 con el Trp en la posición 208 mutado a Arg.

[0012] Preferiblemente, la secuencia líder es como la identificada en los aminoácidos 1 - 22 de la SEQ ID N.º 2. Una secuencia líder que comprenda prácticamente la totalidad de la secuencia líder Pel B conservará el efecto sobre scFv E8, cuando esté enlazada a este, de potenciar la formación de oligómeros, y contendrá al menos 18 de los 22 aminoácidos de la secuencia líder Pel B, preferiblemente 19, más preferiblemente 20, todavía más preferiblemente 21, y sobre todo preferiblemente la totalidad de los 22 aminoácidos que se muestran para la secuencia líder Pel B de la SEQ ID N.º 2.

[0013] CEACAM1 pertenece a la familia del gen CEA que, a su vez, pertenece a la superfamilia del gen de inmunoglobulina. CEA y CEACAM1 son codificados por dos genes distintos, CEACAM5 y CEACAM1, respectivamente. Como se ha indicado anteriormente, CEACAM1 ha suscitado recientemente considerable interés como una diana de antígeno de cáncer, especialmente en el melanoma y el cáncer de pulmón. El scFv preferido, de DIATHIS1, deriva del scFv E8 conocido, que es específico para CEA y CEACAM1. En los Ejemplos adjuntos, se demostró la reactividad de scFv con la línea celular primaria de melanoma CEACAM1-positiva MelP5.

[0014] Las proteínas de fusión de la presente invención, y según se han dado a conocer en el presente documento, poseen, sorprendentemente, buenas semividas, superando a otras formas conocidas de scFv específicas para CEA, tales como diacuerpos y dímeros, con cierto margen considerable. Además, son muy específicas para CEA, exhibiendo la proteína de fusión actualmente preferida un incremento mayor del 30 % en afinidad con respecto a scFvE8. Asimismo, las proteínas de fusión pueden administrar cuatro veces más marcadores radioactivos que el siguiente mejor scFv.

[0015] Sin querer limitarse a la teoría, lo que parece ser responsable de este aumento de actividad es la presencia de la secuencia líder, la cual parece estimular la formación de oligómeros del scFv. Según parece, los oligómeros de menor número presentan tanto una afinidad alta como una buena estabilidad.

[0016] Para el aislamiento de mAb humanos anti-CEA en formato scFv, se introdujo en un contenedor biológico la biblioteca de anticuerpos fagos scFv ETH-2 humanos sobre proteína CEA purificada como antígeno objetivo. El anticuerpo anti-CEA aislado (1) se modificó además añadiendo una secuencia líder (Pel B) y 3 nuevas mutaciones, provocando tres cambios de aminoácidos. La proteína de fusión obtenida de este modo presentaba, sorprendentemente, una alta estabilidad e, *in vivo*, demostró ser un farmacocinético conveniente con una capacidad de dirección al tumor muy elevada. Este nuevo scFv recombinante se denominó DIATHIS-1, y cumple varios criterios para que un compuesto biológico sea empleado para el diagnóstico y el tratamiento de cáncer: es humano, por lo tanto, nada o prácticamente nada inmunogénico, y se une de manera selectiva al epítipo CEACAM1 de la superficie celular, expresado exclusivamente en células de carcinoma, tales como melanoma, carcinoma de pulmón o carcinoma gástrico. Además, la estructura genética simple y flexible de DIATHIS-1 permite la construcción y el aislamiento de fragmentos oligoméricos de scFv con un equilibrio óptimo entre difusión y retención.

[0017] Se obtuvo una proteína de fusión preferida, DIATHIS-1, mediante técnicas de ADN recombinante, empezando por el fragmento scFvE8 específico para el antígeno carcinoembrionario (CEA) (1). DIATHIS-1 difiere del E8 original en 3 aminoácidos y porque presenta una secuencia líder Pel B específica de 22 aminoácidos. Sorprendentemente, DIATHIS-1 muestra la formación de dímeros y oligómeros que presentan una estabilidad inusual. Sin la secuencia Pel B, DIATHIS-1 se comporta como un monómero. Esta nueva proteína de fusión, o scFv, posee una afinidad muy elevada al antígeno CEA recombinante y un reconocimiento eficiente de proteínas CEACAM1 en melanoma metastásico humano. Además, el aislamiento de formas oligoméricas seleccionadas obtenido mediante un método de aislamiento original confiere a este scFv un rendimiento farmacocinético superior al de los scFv presentados anteriormente y mejor que los diacuerpos convencionales (2; 3).

[0018] La proteína de fusión de la invención se denomina en el presente documento scFv, y no se ha de aplicar un sentido concreto a ningún uso en ausencia de cualquier indicación que especifique lo contrario. Por consiguiente, se apreciará que las referencias a la proteína de fusión de la invención incluyen además referencias al scFv fusionado con una secuencia líder y una secuencia efectora, por ejemplo.

[0019] El scFv identificado inicialmente como útil en la técnica fue scFvE8 (1), y corresponde a la porción V_H-Conector-V_L de scFvDIATHIS-1, SEQ ID N.º 1 o SEQ ID N.º 2, en la Lista de secuencias adjunta, y en la figura 15, pero donde C>W, P>L y W>R en aquellas posiciones marcadas con un asterisco. Estas posiciones son C, P y W, respectivamente, en scFvDIATHIS-1, y W, L y R, respectivamente, en scFvE8.

5 **[0020]** En general, la porción scFv de la proteína de fusión de la invención puede ser cualquier scFv que presente especificidad al antígeno carcinoembrionario (CEA), preferiblemente CEACAM1. Más especialmente, se prefiere identificar la porción scFv anti-CEA a partir de una biblioteca de anticuerpos fagos, empleando CEA como antígeno sustrato. En algunos casos, la porción de scFv de la proteína de fusión es scFvE8.

10 **[0021]** Puede resultar especialmente preferible la estabilización posterior de scFvE8 invirtiendo la mutación C>W en la posición 242, permitiendo de este modo la formación de un puente disulfuro entre esta posición y la cisteína en la posición 178. La mutación L>P en la posición 201 no es fundamental, aunque puede ser preferible. La mutación R>W en la posición 209 no es fundamental, pero puede ser preferible. Se pueden presentar ambas mutaciones L>P y R>W, o solamente una. También es posible que no se presente ninguna mutación.

15 **[0022]** También son posibles otras mutaciones, tales como mediante mutación puntual, sustitución, inserción, deleción e inversión tanto de la secuencia de ácido nucleico codificante como de la secuencia de aminoácidos, siempre y cuando la porción de scFv resultante de la proteína de fusión de la presente invención no se reconozca como foránea, o no humana, al administrarse a un paciente, y continúe presentando una especificidad a CEA, y preferiblemente CEACAM1, de al menos el 50 % de la de scFvDIATHIS-1 medida conforme a los Ejemplos adjuntos. Preferiblemente, la especificidad puede ser de al menos el 80 %, y más preferiblemente de al menos el 90 % de la de scFvDIATHIS-1, y puede sobrepasar el 100 %.

20 **[0023]** Se pueden incorporar otras mutaciones con motivo del aumento de la estabilidad, o por requisitos de fabricación, por ejemplo. Una porción de scFv especialmente preferida corresponde a las porciones V_H y V_L de scFvDIATHIS-1, según se muestra en la SEQ ID N.º 1 o SEQ ID N.º 2 de la Lista de secuencias adjunta y en la figura 15, enlazadas mediante un conector apropiado, tal como el que se muestra para scFvDIATHIS-1, SEQ ID N.º 1 o SEQ ID N.º 2 en la Lista de secuencias y en la figura 15.

[0024] La presencia de un conector no es fundamental, aunque es preferible utilizar un conector. Un conector adecuado incluye una o más unidades de GGGGS.

30 **[0025]** La longitud del conector entre las porciones V_H y V_L del scFv afecta a la dimerización en los scFv de la técnica, y se inducen dímeros mediante el acortamiento del conector hasta aproximadamente de 5 a 10 aa. Sería de esperar que un scFv con un conector de 15 aa no formase oligómeros, y este hecho representa un hallazgo sorprendente en lo que respecta al scFv de DIATHIS-1, que se ha demostrado que forma oligómeros, incluso con conectores solitarios.

35 **[0026]** La secuencia líder debería ser escindible mediante la peptidasa Pel B de *E. coli*, que se halla en el espacio periplásmico que rodea a *E. coli*. Por lo general, esta secuencia líder se utiliza para estimular la secreción de proteínas de fusión a través de la membrana celular para permitir la producción continua de la proteína de fusión sin acumular niveles de la proteína de fusión en el hospedador que puedan contaminar o inhibir de otro modo una mayor producción. En la presente invención, es preferible obtener la proteína de fusión antes de que se haya secretado, y mientras se encuentre aún presente en cuerpos de inclusión en el hospedador. Esto se puede lograr transformando el hospedador con un plásmido o vector adecuado, cultivando el hospedador en condiciones permisivas hasta que presente una densidad óptica (DO) lo suficientemente elevada, y recogiendo y rompiendo las células, por ejemplo, mediante homogeneización y centrifugación del lisado, para obtener las proteínas de fusión como cuerpos de inclusión en el gránulo. Se podrá apreciar que es preferible desactivar o suprimir la peptidasa Pel B antes de la ruptura de la membrana celular, con el fin de minimizar la pérdida de la proteína de fusión diana.

45 **[0027]** Se podrá apreciar que la secuencia líder puede variar de un modo similar al descrito anteriormente para la porción scFv de la proteína de fusión, pero donde la limitación funcional es la capacidad de ser escindida por la peptidasa Pel B de *E. coli*. Es preferible que la funcionalidad de la secuencia líder también se conserve, de tal manera que la proteína de fusión se secrete a través de la membrana celular de *E. coli* en caso de que se cultive durante el tiempo suficiente con condiciones permisivas.

50 **[0028]** En algún ejemplo, la proteína de fusión, o scFv, de la invención se proporciona con una etiqueta. En los Ejemplos adjuntos, se utiliza una etiqueta versátil D3SD3-FLAG-His6 (26). Esta incluye un sitio de fosforilación (D3SD3), la secuencia de la etiqueta FLAG M2 (para su detección con un anticuerpo anti-FLAG M2) y la etiqueta 6xHis, permitiendo una rápida purificación mediante cromatografía de afinidad a metales (IMAC). No es preciso utilizar una etiqueta, aunque se pueden utilizar etiquetas para ayudar en la purificación y detección del scFv. En el ejemplo anterior, se puede omitir cualquiera o varios de los componentes, D3SD3, FLAG e His6. De entre los componentes, la etiqueta His6 resulta especialmente útil para permitir el uso de IMAC, aunque, como sabrán los expertos en la materia, se pueden utilizar otras etiquetas.

[0029] La proteína de fusión, o scFv, de la presente invención se puede utilizar por sí sola para detectar tejido canceroso, por ejemplo. En este sentido, puede estar radiomarcada, por ejemplo, mediante radioyodación. Para los expertos en la materia, resultará evidente que se pueden utilizar otros marcadores.

5 **[0030]** En algunos casos, la proteína de fusión de la presente invención comprende además un efector. El efector es una porción de la proteína de fusión que es capaz de ejercer una función concreta cuando la proteína de fusión entra en contacto con el antígeno diana CEA o CEACAM1. Por ejemplo, la vpr de VIH1 y LLOΔPEST son dos toxinas derivadas, respectivamente, de VIH1 y *L. monocytogenes*. Estos efectores poseen distintos mecanismos de acción, y ambos provocan la muerte de células eucariotas. La citosina desaminasa de levadura (YCD) es una enzima de levadura capaz de convertir el agente antifúngico no tóxico 5-fluorocitosina (5-FC) en el agente anticanceroso conocido, 5-fluorouracilo (5-FU). La ubiquitina es una proteína conocida y ubicua que se encuentra interiorizada en algunas células e incrementa la probabilidad de que el scFv se marque con yodo marcado radiactivamente. IL2 es una citocina utilizada para el tratamiento de melanoma, y su fusión con DIATHIS-1 permite que esté dirigida. Para los expertos en la materia, resultará evidente que se pueden utilizar otros efectores. Se ha demostrado que la inclusión de un efector no deriva necesariamente en una pérdida significativa de especificidad del scFv a CEA y CEACAM1.

10 **[0031]** Al igual que sucede con las regiones V_H y V_L, el efector puede estar enlazado directamente a la porción scFv, o por medio de un conector, tal como SSSSG, que puede estar presente como una unidad monomérica o 2 o más, normalmente 2 - 5 unidades.

20 **[0032]** La expresión del scFv de la invención se logra normalmente mediante su incorporación en un plásmido de expresión adecuado, tal como el vector pET22b(+). En el sistema de vector pET, el gen clonado está controlado por el promotor fuerte del bacteriófago T7, y la expresión se induce proporcionando una fuente de ARN polimerasa T7 en la célula hospedadora. Este promotor se seleccionó por su fuerza, aunque se pueden utilizar otros promotores, tales como el promotor fago T5, el promotor lac, y otros promotores adecuados para la expresión proteica procarionta. Para los expertos en la materia, resultará evidente que la elección de otros promotores puede influir en la expresión proteica y en el rendimiento final.

25 **[0033]** Se podrá observar también que el casete de expresión para la proteína de fusión de la invención comprenderá, por lo general, otros elementos fundamentales para la expresión o que pueden ayudar a esta, tal como un codón de parada, por ejemplo.

30 **[0034]** El scFv original del que deriva el clon E8 ha sido analizado, y muestra una afinidad reducida al antígeno (Pavoni *et al.*, 2006). Se introdujeron mutaciones aleatorias en el clon E8 para incrementar la afinidad (existen 8 cambios de aminoácidos entre el scFv original y el clon E8). Una de estas mutaciones es un cambio C>W. En la DIATHIS-1, esta mutación se invirtió mediante otra mutación puntual, en la que se restauró el estado original del nucleótido, para recuperar la cisteína con el fin de mejorar la estabilidad del scFv. Las otras dos mutaciones se introdujeron de manera casual. Sorprendentemente, a pesar de que se modificó el E8 para mejorar la afinidad a CEA (1), la afinidad de DIATHIS-1 a CEA es mayor que la de E8 ($1,88 \times 10^8 \text{M}^{-1}$ y $1,39 \times 10^8 \text{M}^{-1}$ respectivamente).

35 **[0035]** En general, existen dos estrategias básicas para obtener fragmentos recombinantes de anticuerpos de *Escherichia coli*. La primera es producir proteínas de anticuerpos, como cuerpos de inclusión citoplasmáticos, y a continuación volver a plegarlas *in vitro*. En esta estrategia, la proteína se expresa sin una secuencia señal, con un promotor fuerte. Los cuerpos de inclusión contienen la proteína recombinante en una configuración no nativa y no activa. Para obtener el anticuerpo funcional, las cadenas polipeptídicas recombinantes se deben disolver y plegar en la forma correcta, utilizando un proceso de repliegamiento arduo y que requiere mucho tiempo (Kipriyanov, S. M., y Little, M. Mol. Biotechnol. (1999)). El segundo enfoque para la obtención de fragmentos de anticuerpos funcionales es imitar la situación en la célula eucariota para secretar un anticuerpo plegado correctamente. Los fragmentos de anticuerpos se secretan en el espacio periplásmico, e incluso en el medio de *E. coli*, fusionando un péptido señal bacteriano con el N-terminal del anticuerpo (Better, M., Science (1988); Skerra, A., Science (1988)). Normalmente, los scFv se procesan correctamente en el periplasma; contienen enlaces disulfuro intramoleculares y son solubles.

40 **[0036]** Según se ha expuesto en el presente documento, se utilizó el segundo método descrito anteriormente para la purificación de scFv extrayendo DIATHIS-1 (fusionada en el N-terminal con pel B) del periplasma de *E. coli*, aunque el producto final contenía niveles altos de endotoxinas y el rendimiento final resultó pobre. Para incrementar el rendimiento, la expresión proteica se realizó en cultivos de *E. coli* con una elevada densidad celular. Sorprendentemente, en estas condiciones, la proteína se encontró exclusivamente en los cuerpos de inclusión. Por lo tanto, el repliegamiento tuvo lugar durante la primera etapa de elución.

45 **[0037]** La presente invención y descripciones del presente documento se ilustrarán a continuación con referencia a las figuras adjuntas, no limitativas, en las cuales:

la figura 1 muestra la estructura del constructo de expresión de DIATHIS-1;

la figura 2 muestra la secuencia de aminoácidos y la predicción de la estructura secundaria de scFv DIATHIS-1, incluyendo Pel B y la etiqueta D3SD3-FLAG-His6;

la figura 3 (A) muestra el diagrama de flujo para el proceso en dirección 5', mientras que (B) muestra el análisis SDS-PAGE al 12 % de la expresión de scFvDIATHIS-1;

la figura 4 presenta un diagrama de flujo del proceso en dirección 3' de scFvDIATHIS-1;

5 la figura 5 representa (A) Cromatograma de la tercera etapa de purificación, que muestra los dos picos de elución correspondientes a NaCl 0,2 M y NaCl 0,5 M. (B) Análisis SDS-PAGE al 12 % de scFv DIATHIS-1 purificada eluida con NaCl 0,2 M (0,2M) y NaCl 0,5 M (0,5M). (C) Análisis PAGE nativo de las mismas proteínas. (D) Análisis PAGE nativo tras la adición de β -mercaptoetanol como agente reductor en la muestra. (E) Análisis PAGE nativo tras la adición del detergente dodecil sulfato de sodio en la muestra;

10 la figura 6 muestra el reconocimiento de antígeno mediante las dos formas de DIATHIS-1. El ensayo ELISA se llevó a cabo con distintas cantidades de DIATHIS-1 0,5 M (A) y 0,2 M (B), respectivamente, sobre placas recubiertas con 100 ng de antígeno CEA;

15 la figura 7 muestra la especificidad de DIATHIS-1 0,2 M determinada mediante ensayo de citometría (análisis FacScan). Los citogramas muestran los resultados obtenidos en la población de células de melanoma (picos sólidos) con respecto a las células COS1 CEA-negativas (gris, líneas intermedias). Las líneas negras representan células de melanoma que han recibido únicamente los anticuerpos secundarios;

la figura 8 representa la especificidad de DIATHIS-1 a células CEACAM1-positivas.;

la figura 9 muestra cromatografía de exclusión por tamaño llevada a cabo utilizando un sistema de cromatografía ÄKTA en condición isocrática (tampón fosfato 50 mM pH 7.5 y NaCl 0,15 M);

20 la figura 10 muestra (A) farmacocinética *in vivo* durante intervalos de tiempo cortos y largos de DIATHIS-1. Semivida estimada $t_{1/2\alpha}$: $0,07 \pm 0,013$ h; $t_{1/2\beta}$: $8,58 \pm 3,15$ h; AUC_{24h} : 113 ± 15 . (B) Farmacocinética durante un período largo. Semivida $t_{1/2}$: $8,84 \pm 3,3$ h (cálculo realizado con Origin 8.1);

la figura 11 muestra la biodistribución en ratones desnudos portadores de tumores. Se les inyectó [124 I]-DIATHIS-1 a los ratones por vía intravenosa. La absorción de tejido tumoral y normal se expresó como porcentaje de DI/g;

25 la figura 12 muestra el diagnóstico por imágenes PET de [124 I]-DIATHIS-1. Se inyectaron por vía intravenosa 290 μ Cu del anticuerpo [124 I]-scFv anti-CEACAM en ratones desnudos CD-1 portadores de tumores, y se realizó un diagnóstico por imágenes microPET con anestesia con isoflurano;

la figura 13 muestra la estructura de diversas proteínas de fusión, comprendiendo un efector;

30 la figura 14 muestra la afinidad y especificidad de derivados de scFv DIATHIS-1 al antígeno CEA, determinadas mediante citometría de flujo (panel izquierdo) y análisis por inmunofluorescencia (panel derecho) en la línea celular primaria de melanoma CEA-positiva MeIP5;

35 la figura 15 muestra la secuencia de nucleótidos y la correspondiente secuencia de aminoácidos para scFvDIATHIS-1. Las secuencias nucleotídicas y de aminoácidos de scFv DIATHIS-1 incluyen la señal pel B, la V_L , el conector, la V_H y la etiqueta C-terminal D3SD3-FLAG-His6. Las mutaciones insertadas en scFv DIATHIS-1 relativas a scFvE8 aparecen señaladas con un asterisco;

la figura 16 muestra la secuencia de nucleótidos y la correspondiente secuencia de aminoácidos para scFvDIATHIS-1:ubiquitina. Las secuencias nucleotídicas y de aminoácidos de scFv DIATHIS-1 incluyen la señal pel B, la V_L , el conector, la V_H y la etiqueta C-terminal His y de ubiquitina. Las mutaciones insertadas en scFv DIATHIS-1 relativas a scFvE8 aparecen señaladas con un asterisco;

40 la figura 17 muestra la secuencia de nucleótidos y la correspondiente secuencia de aminoácidos para scFvDIATHIS-1:vpr de VIH. Las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de scFv DIATHIS-1 incluyen la señal pel B, la V_L , el conector, la V_H y la etiqueta C-terminal His y de vpr de VIH. Las mutaciones insertadas en scFv DIATHIS-1 relativas a scFvE8 aparecen señaladas con un asterisco;

45 la figura 18 muestra la secuencia de nucleótidos y la correspondiente secuencia de aminoácidos para scFvDIATHIS-1:YCD. Las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de scFv DIATHIS-1 incluyen la señal pel B, la V_L , el conector, la V_H y la etiqueta C-terminal His y de YCD. Las mutaciones insertadas en scFv DIATHIS-1 relativas a scFvE8 aparecen señaladas con un asterisco;

50 la figura 19 muestra la secuencia de nucleótidos y la correspondiente secuencia de aminoácidos para scFvDIATHIS-1:LLO PEST. Las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de scFv DIATHIS-1 incluyen la señal pel B, la V_L , el conector, la V_H y la etiqueta C-terminal His y de LLO PEST. Las mutaciones insertadas en scFv DIATHIS-1 relativas a scFvE8 aparecen señaladas con un asterisco; y

55 la figura 20 muestra la secuencia de nucleótidos y la correspondiente secuencia de aminoácidos para scFvDIATHIS-1:IL-2. Las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de scFv DIATHIS-1 incluyen la señal pel B, la V_L , el conector, la V_H y la etiqueta C-terminal His y de IL-2. Las mutaciones insertadas en scFv DIATHIS-1 relativas a scFvE8 aparecen señaladas con un asterisco.

[0038] El método de purificación preferido que se utiliza en el presente documento se basa en tres etapas cromatográficas (cf. fig. 4). El proceso cromatográfico se puede llevar a cabo utilizando un sistema de cromatografía con explorador AKTA (GE Healthcare, Bucks, Reino Unido). La primera etapa es de cromatografía DEAE de intercambio aniónico. Esta puede utilizar una columna BPG 100/500 con resina de flujo rápido DEAE, por ejemplo. La columna se equilibra utilizando un tampón fosfato 50 mM; NaCl 50 mM; urea 8 M; pH 7.5, por ejemplo. La solución sobrenadante se carga en la columna y se utiliza una etapa de gradiente lineal, por ejemplo, para eliminar la urea. El material ligado se puede eluir con tampón fosfato 50 mM; NaCl 0,5 M; glicerol al 10 %, pH 7.5. La segunda etapa es una cromatografía IMAC. Esta se puede llevar a cabo cargando el grupo de eluato DEAE en una columna BPG 100/500 llena de resina de Sepharose IMAC (Ni), que puede equilibrarse con tampón fosfato 20 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 20 mM, pH 7.5. El material ligado se puede eluir con tampón fosfato 20 mM, conteniendo NaCl 0,5 M e imidazol 250 mM, pH 7.5. A continuación, el grupo de eluato IMAC se diluye. Esto se puede realizar empleando 1:10 en tampón fosfato 20 mM, EDTA 1,5 mM, glicerol al 10 % (v/v), pH 7.5, y se carga de manera adecuada en una resina de flujo rápido de Sepharose en una columna, tal como una columna BPG 100/500, para la tercera etapa cromatográfica. La columna se equilibra utilizando, por ejemplo, tampón fosfato 20 mM conteniendo NaCl 50 mM, EDTA 1,5 mM y glicerol al 10 % (v/v), pH 7.5. El scFv DIATHIS-1 resultante, u otro scFv, se puede eluir con tampón fosfato 20 mM, NaCl 0,2 M o 0,5 M, y EDTA 1,5 mM y glicerol al 10 % como agentes estabilizadores.

[0039] El proceso utilizado en los Ejemplos proporciona rendimientos elevados de proteína replegada con niveles muy bajos de endotoxinas.

[0040] Resulta interesante que la etapa de elución final eluye preparaciones oligoméricas de scFv menores y más funcionales utilizando una primera operación de aproximadamente NaCl 0,2 M, mientras que una segunda operación de aproximadamente NaCl 0,5 M eluye agregados con peso molecular más alto y con una menor funcionalidad. A pesar de que ambos resultan útiles, se prefieren las preparaciones oligoméricas.

[0041] Los siguientes Ejemplos se incluyen únicamente para fines ilustrativos, y no limitan de ningún modo la presente invención.

EJEMPLOS

Modificación de scFv DIATHIS-1 anti-CEA

[0042] Se aisló scFv anti-CEA humano a partir de la biblioteca de anticuerpos fagos humanos ETH-2 (25, 2) mediante expresión en fagos, mientras que el clon E8, con un aumento de la afinidad antigénica, se obtuvo mediante maduración de afinidad, según se ha descrito anteriormente (1). En el vector pDN332, el constructo scFvE8 contiene, en el C-terminal, una etiqueta versátil D3SD3-FLAG-His6 (26), que incluye un sitio de fosforilación (D3SD3), la secuencia de la etiqueta FLAG M2 (para su detección con un anticuerpo anti-FLAG M2) y la etiqueta 6xHis, que permite una rápida purificación mediante cromatografía de afinidad a metales (IMAC). El constructo scFv DIATHIS-1 se clonó en un vector pET22b(+) mediante la clonación de la secuencia scFvE8 de pDN332, incluyendo la etiqueta D3SD3-FLAG-His6. En el sistema de vector pET, el gen clonado está controlado por el promotor fuerte del bacteriófago T7, y la expresión se induce proporcionando una fuente de ARN polimerasa T7 en la célula hospedadora. Se escogió este promotor por su fuerza, aunque se pueden utilizar otros promotores, tales como el promotor fago T5, el promotor lac, y todos los promotores que resulten adecuados para la expresión proteica procarionota. Es probable que la elección del promotor influya en la expresión proteica y en el rendimiento final.

[0043] Se decidió incluir el péptido señal bacteriano Pel B en el N-terminal de scFv, lo cual permite exportar scFv soluble al periplasma (figura 1) (27; 6) con el fin de incrementar el nivel de expresión proteica (28, 29). La secuencia se amplificó a partir del vector pDN332 con cebadores degenerados: un cebador directo CEANcol5' 5'-CCAGCCGGCCATGGCCGAGGTG-3', SEQ ID N.º 3, y un cebador inverso CEA EcoRI3' 5'-ACAACCATATGCAGTCTAATGGTGATGGTG-3', SEQ ID N.º 4, para crear un sitio NcoI y un sitio EcoRI, respectivamente, en los terminales 5' y 3'. Los amplicones se digirieron junto con el vector pET22b(+), con NcoI y EcoRI a 37 °C durante 2 horas. Los productos digeridos se purificaron y se ligaron entre sí con ADN ligasa T4 a 4 °C durante la noche. La mezcla de ligación se transformó en la cepa JM109 de *E. coli*. Los clones positivos se cribaron para su correcta inserción mediante PCR de colonia.

[0044] La figura 1 adjunta muestra la estructura del constructo de expresión de DIATHIS-1. El gen que codifica el anticuerpo scFv DIATHIS-1 humano a CEA se fusiona en el N-terminal con el péptido de la secuencia líder Pel B y, en el C-terminal, con la etiqueta D3SD3-FLAG-His6, y el constructo resultante se inserta en un vector pET procarionota controlado por el promotor fuerte T7.

[0045] Con el fin de mejorar la estabilidad de los dominios de anticuerpos, la mutación C>W introducida en el clon E8 durante la maduración en la región CD3 de cadena ligera variable (V_L) (1) se invirtió mediante mutagénesis dirigida *in vitro*. De hecho, esta cisteína está implicada en la formación de enlace disulfuro entre las regiones CDR de V_L. El efecto estabilizador de los enlaces disulfuro ha sido analizado de manera experimental (30). Los pocos anticuerpos que son funcionales a pesar de haber perdido uno de los residuos de cisteína conservados mediante mutación somática (31) parecen presentar una estabilidad termodinámica superior a la media tras haber restaurado el enlace disulfuro que falta (32). La secuencia final del nuevo scFv DIATHIS-1 se

obtuvo mediante reacción de secuenciación. Sorprendentemente, se observó que se habían introducido dos nuevas mutaciones en la V_L, probablemente durante la amplificación por PCR para procesos de clonación. Estas son: L>P y R>W.

5 **[0046]** Por lo tanto, se utilizó el clon E8 y se añadió una secuencia líder (Pel B) y 3 nuevas mutaciones, provocando tres cambios de aminoácidos con respecto a la secuencia E8. En concreto, la conversión de W a C proporciona una mayor estabilidad, puesto que esta cisteína está implicada en la formación del enlace disulfuro dentro de la cadena. La secuencia de aminoácidos y la predicción de la estructura secundaria de scFv DIATHIS-1, incluyendo Pel B y la etiqueta D3SD3-FLAG-His6, se representan en la figura 2. El constructo final se transfirió a la cepa hospedadora BL21(DE3) de *E. coli* (F- ompT hsdSB(rB-mB-) gal dcm (DE3))), que contenía una copia cromosómica del gen ARN polimerasa T7 controlada por el promotor *lacUV5* para inducir la expresión de scFv.

10 **[0047]** La figura 2 muestra una representación esquemática del scFv DIATHIS-1 anti-CEA modificado. La secuencia de aminoácidos (AA) y la estructura secundaria predictiva (pred) de scFv DIATHIS-1 anti-CEA. Las mutaciones insertadas en el scFv DIATHIS-1 aparecen subrayadas, y los puentes disulfuro entre dominios de anticuerpos se representan mediante líneas de puntos.

15 **Producción de scFv anti-CEA DIATHIS-1 recombinante**

20 **[0048]** Para la producción a gran escala de scFv DIATHIS-1, se utilizaron cultivos de alta densidad celular de *E. coli* (para consulta, véase 33) y se optimizó una estrategia de alimentación y variables de fermentación que permitían una producción de alto nivel de scFv DIATHIS-1 en los cuerpos de inclusión (figura 3B). El diagrama de flujo del proceso en dirección 5' se representa en la figura 3A. Los cultivos iniciadores nocturnos de *E. coli* BL21 (DE3) se inocularon en un recipiente Biostat C15 que contenía los medios básicos sintéticos del fermentador (pH 7.5): 13,3 g/l de dihidrogenoortofosfato de potasio, 4 g/l de hidrogenofosfato de amonio, 1,7 g/l de ácido cítrico monohidrato, 100,8 mg/l de hierro (III) citrato hidrato, 2,5 mg/l de cloruro de cobalto (II) hexahidratado, 15 mg/l de cloruro de manganeso (II) tetrahidratado, 1,5 mg/l de cloruro de cobre (II) dihidratado, 3,0 mg/l de ácido bórico, 2,1 mg/l de molibdato de sodio dihidratado, 33,8 mg/l de acetato de zinc dihidrato y 14,1 mg/l de EDTA. Posteriormente, se añadieron 100 mg/l de ampicilina, 2,25 mg/l de tiamina, 300 mg/l de solución de Mg, y 7,56 g/l de glucosa. Las bacterias diluidas se incubaron a continuación a 37 °C con aporte exponencial de glucosa hasta conseguir una densidad óptica de al menos 10. Para la expresión de scFv DIATHIS-1, se añadió IPTG 1 mM y sacarosa 40 mM. La fermentación continuó durante 4 horas a 37 °C, y a continuación se recogieron las células mediante centrifugación a 5000 rpm durante 30 min a 4 °C.

30 **[0049]** Para la extracción de DIATHIS-1 de la fracción insoluble del citoplasma, la pasta celular se volvió a suspender en 20 ml/g de gránulo bacteriano en tampón de lisis (tampón fosfato 50 mM; NaCl 50 mM; pH 7.5), y la solución de lisis celular se procesó por medio del microfluidizador para un único paso a 680 bar y se centrifugó a 8000 rpm durante 60 min a 4 °C. Para la solubilización de cuerpos de inclusión, el gránulo se volvió a suspender en 20 ml/g de tampón de solubilización (tampón fosfato 50 mM; NaCl 50 mM; Urea 8 M; pH 7.5) y se incubó durante 16 horas con agitación. El producto procesado se granuló a 8000 rpm durante 1 h a 4 °C. La solución sobrenadante que contenía el scFv DIATHIS-1 se filtró a través de un filtro de 0,45 µm y se procesó para la purificación de proteínas.

35 **[0050]** La figura 3 (A) muestra el diagrama de flujo para el proceso en dirección 5', mientras que (B) muestra el análisis SDS-PAGE al 12 % de la expresión de scFvDIATHIS-1, en el cual: Carril 1: Marcador con peso molecular de rango bajo; Carril 2: 1 µg de scFv estándar; Carril 3: Muestra no inducida; Carril 4: Muestra inducida 2 h; Carril 5: Muestra inducida 3 h; Carril 6: Muestra inducida 4 h.

40 **[0051]** Se desarrolló un método de purificación basado en tres etapas cromatográficas (figura 4). El proceso cromatográfico se llevó a cabo utilizando un sistema de cromatografía con explorador AKTA (GE Healthcare, Bucks, Reino Unido). La primera etapa es de cromatografía DEAE de intercambio aniónico en una columna BPG 100/500 con resina de flujo rápido DEAE. La columna se equilibró con tampón fosfato 50 mM; NaCl 50 mM; urea 8 M; pH 7.5. La solución sobrenadante se cargó en la columna, y se utilizó una etapa de gradiente lineal para eliminar la urea. El material ligado se eluyó con tampón fosfato 50 mM; NaCl 0,5 M; glicerol al 10 %, pH 7.5. La segunda etapa es una cromatografía IMAC en la que se cargó el grupo de eluato DEAE en una columna BPG 100/500 llena de resina de Sepharose IMAC (Ni). La columna se equilibró con tampón fosfato 20 mM; NaCl 0,5 M; imidazol 20 mM, pH 7.5. El material ligado se eluyó con tampón fosfato 20 mM, conteniendo NaCl 0,5 M e imidazol 250 mM, pH 7.5. El grupo de eluato IMAC se diluyó 1:10 en tampón fosfato 20 mM, EDTA 1,5 mM, glicerol al 10 % (v/v), pH 7.5, y se cargó en una columna BPG 100/500 con resina de flujo rápido de Sepharose DEAE para la tercera etapa cromatográfica. La columna se equilibró con tampón fosfato 20 mM que contenía NaCl 50 mM, EDTA 1,5 mM y glicerol al 10 % (v/v), pH 7.5. El scFv DIATHIS-1 se eluyó con tampón fosfato 20 mM, NaCl 0,2 M, y EDTA 1,5 mM y glicerol al 10 % como agentes estabilizadores.

55 **[0052]** La figura 4 expone un diagrama de flujo del proceso en dirección 3' de scFvDIATHIS-1.

Separación de formas oligoméricas estables de DIATHIS-1 con elevada afinidad y multímeros de alto peso molecular con afinidad reducida

[0053] Mientras se desarrollaba una estrategia para purificar DIATHIS-1, se descubrió que se podía obtener una buena recuperación de proteína eluyendo la tercera cromatografía DEAE con NaCl 0,5 M. No obstante, si se eluye primero la muestra con NaCl 0,2 M y a continuación con NaCl 0,5 M en la etapa cromatográfica final, se descubrió que, sorprendentemente, se recuperan dos picos de Diathis-1 (figura 5A). Ambas proteínas eluidas poseen el mismo comportamiento en SDS-PAGE, aunque la pureza estimada mediante análisis densitométrico, así como el rendimiento final, es superior en las que se eluyeron con NaCl 0,2 M (figura 5B, tabla 1). Además, se investigó la configuración de scFv purificados eluidos con NaCl 0,2 M y con NaCl 0,5 M en análisis PAGE con distintas condiciones. En SDS-PAGE, ambas proteínas migran como monómeros con un tamaño esperado de aproximadamente 35 kDa (figura 5 B). En PAGE nativa, la proteína scFv DIATHIS-1 eluida con NaCl 0,2 M migra como tres formas claramente distinguibles, representadas de manera distinta, que muestran una estabilidad inusual tanto en condiciones no reductoras (figura 5C) como reductoras (figura 5D), mientras que aquellas eluidas con NaCl 0,5 M forman agregados de mayor peso molecular (figura 5C y D). El comportamiento del monómero PAGE se restablece mediante la adición de SDS en la muestra (figura 5E). Estos resultados son coherentes con la formación de formas oligoméricas de DIATHIS-1 debido a interacciones no covalentes. Por consiguiente, con el método de purificación optimizado desarrollado, se puede distinguir entre formas oligoméricas y agregados con peso molecular más alto que se eluyen con NaCl 0,5 M (figura 5C-D).

Tabla 1: características de scFv DIATHIS-1 en distintas etapas del proceso de producción. Los valores de rendimiento se refieren a la cantidad total de proteína, y la pureza a DIATHIS-1.

ETAPA DE PURIFICACIÓN	Rendimiento (g)	% de pureza	Contenido de endotoxinas (EU/ μ g)
Urea 8M sobrenadante	3,5 g	40 %	-
Primera etapa cromatográfica	1,5 g	75 %	< 5 EU/ μ g
Segunda etapa cromatográfica	1,2 g	95 %	< 3 EU/ μ g
Tercera etapa cromatográfica NaCl 0,2 M	0,927 g	99 %	< 1 EU/ μ g
Tercera etapa cromatográfica NaCl 0,5 M	0,270 g	90 %	-

[0054] La figura 5 representa (A) Cromatograma de la tercera etapa de purificación, que muestra los dos picos de elución correspondientes a NaCl 0,2 M y NaCl 0,5 M. (B) Análisis SDS-PAGE al 12 % de scFv DIATHIS-1 purificada eluida con NaCl 0,2 M (0,2M) y NaCl 0,5 M (0,5M). (C) Análisis PAGE nativo de las mismas proteínas. (D) Análisis PAGE nativo tras la adición de β -mercaptoetanol como agente reductor en la muestra. (E) Análisis PAGE nativo tras la adición del detergente dodecil sulfato de sodio en la muestra.

[0055] Los dos scFv DIATHIS-1 separados en la etapa cromatográfica final se evaluaron para determinar su eficacia de unión al antígeno CEA puro en ensayos ELISA.

[0056] Se utilizaron distintas concentraciones de scFv para llevar a cabo la titulación sobre 100 ng de antígeno CEA recubierto por pocillo. Los resultados (figura 6) mostraron linealidad y una mejor afinidad a la DIATHIS-1 eluida con NaCl 0,2 M (B) en comparación con la DIATHIS-1 eluida con NaCl 0,5 M (A).

[0057] La figura 6 muestra reconocimiento de antígeno mediante las dos formas de DIATHIS-1. El ensayo ELISA se llevó a cabo con distintas cantidades de DIATHIS-1 0,5 M (A) y 0,2 M (B), respectivamente, sobre placas recubiertas con 100 ng de antígeno CEA.

[0058] La determinación de afinidad de anticuerpo mediante ELISA directo se llevó a cabo de acuerdo con S. Rath *et al.*, 1988, con ligeras modificaciones (34). Las placas de microtitulación se recubrieron con 100 ng del antígeno en tampón PBS y se incubaron durante la noche a 4 °C. Tras tres lavados, las placas se bloquearon con un 2 % de leche en polvo sin grasa (p/v) en PBS, pH 7.4 (PBSM) durante 60 minutos a 37 °C. A continuación, las placas se lavaron y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con 100 μ l de diluciones en serie de scFv DIATHIS-1 NaCl 0,2 M en tampón de bloqueo, junto con 10 μ l de una mezcla recién preparada que consiste en un anticuerpo anti-FLAG M2 y un anticuerpo anti-ratón conjugado con HRP. Tras el período de incubación, las placas se lavaron, y la reacción colorimétrica se desarrolló utilizando ABTS como sustrato, y se leyó el color a 405 nm. Se sustrajo el fondo de los resultados del ELISA directo para explicar la unión no específica, y los datos se ajustaron mejor utilizando un paquete de *software* estadístico, GraphPad4, en una curva hiperbólica de Michaelis-Menten. La EC_{50} (concentración que muestra un 50 % de unión) se calculó en función de los valores de absorbancia obtenidos. También se utilizaron placas de microtitulación recubiertas con

antígeno (preparadas según se ha descrito anteriormente) para el ensayo ELISA competitivo. Se realizaron diluciones en serie (de 300 pg/ml a 100 µg/ml) de CEA libre empleado como inhibidor para la unión de DIATHIS-1 al CEA ligado en tampón de bloqueo, se incubaron con el anticuerpo DIATHIS-1 NaCl 0,2 M con la EC₅₀ determinada (calculada a partir del ELISA directo) y se dejaron reaccionar durante aproximadamente 90 min.

5 **[0059]** Tras la etapa de bloqueo, las soluciones se añadieron en los pocillos designados recubiertos con antígeno, junto con una mezcla recién preparada que consistía en un anticuerpo anti-FLAG M2 y un anticuerpo anti-ratón conjugado con HRP. Las placas de microtitulación se enjuagaron minuciosamente, se aplicó la solución de sustrato, y la reacción enzimática se desarrolló y se midió como ya se ha señalado. Todos los datos se ajustaron mejor con el *software* estadístico GraphPad4 utilizando una ecuación monoexponencial decreciente.

10 A continuación, se determinaron las concentraciones molares de inhibidor necesarias para un 50 % de inhibición (IC₅₀). Se utilizaron los valores de EC₅₀ y de IC₅₀ para calcular la afinidad de anticuerpo media. El scFv DIATHIS-1 eluido con NaCl 0,2 M alcanzó un valor de K_d de 1,88x10⁸ M⁻¹. La K_d de DIATHIS-1 NaCl 0,5 M no se pudo detectar debido a la unión no lineal del anticuerpo. La afinidad del clon E8 de scFv CEA alcanzó un valor de K_d de 1,39x10⁸ M⁻¹ (1).

15 **[0060]** Por lo general, tras la conversión del monómero scFv a diacuerpo, la K_d disminuye 10-15 veces, mostrando una afinidad más alta (35). Sin embargo, el scFv DIATHIS-1 oligomérico presenta una afinidad similar en comparación con el scFv E8 monomérico. Esta es una característica deseable. De hecho, distintos autores han mostrado que la concentración total y la penetración de scFv en el tumor disminuye con la afinidad al antígeno (36, 37), mientras que la citotoxicidad celular aumenta con la afinidad.

20 **[0061]** La afinidad y especificidad de los dos scFv DIATHIS-1 separados frente al antígeno CEACAM1 se determinaron mediante análisis de citometría de flujo en la línea celular primaria de melanoma CEACAM1-positiva MelP5. Se utilizó la línea celular COS1 como control negativo. Las células adherentes en fase de crecimiento exponencial se volvieron a suspender en PBS y en 1 % de BSA (PBSB), y a continuación se contabilizaron. Para el análisis citofluorimétrico, se distribuyeron 5x10⁵ células en el tubo y se recogieron a 1200 rpm durante 10 minutos. El gránulo se volvió a suspender en 200 µl de PBSB añadido con las distintas preparaciones de scFv DIATHIS-1, y se mantuvo a 4 °C durante 60 minutos. Tras los lavados, los gránulos se suspendieron con 200 µl de PBSB, y se añadió un anti-FLAG M2 de ratón diluido 1:400 (Sigma Aldrich) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los complejos inmunes se manifestaron mediante adición de un anticuerpo anti-ratón de cabra conjugado con FITC diluido 1:50. Tras 30 minutos de incubación a temperatura ambiente en la oscuridad, las células se lavaron y se mostró fluorescencia mediante citofluorometría de flujo FACScan.

25 **[0062]** Los resultados mostraron un alto porcentaje de células positivas a ambos scFv en todas las concentraciones analizadas. Los valores medios más elevados, que representan un parámetro para la afinidad del anticuerpo al antígeno, se obtienen utilizando una concentración de scFv de 5 µg/ml, y eran más elevados para el scFv eluido con NaCl 0,2 M en comparación con los obtenidos con elución con 0,5 M (146,6 y 95,27, respectivamente; Tabla 2), mostrando de nuevo la mejor afinidad de DIATHIS-1 0,2 M. La disminución de los valores medios en el aumento de la concentración de scFv se debe a la característica de competencia de unión a antígenos de los anticuerpos monoclonales. Los resultados obtenidos en células CEA-negativas (COS-1) muestran la especificidad de scFv DIATHIS-1 anti-CEA (figura 7).

40 **Tabla 2: Análisis de citometría de flujo de scFv DIATHIS-1.** En esta tabla, se indican los valores porcentuales de células de melanoma fluorescentes MelP5 y COS-1 CEA-negativa reaccionadas con los dos scFv DIATHIS-1 eluidos de manera distinta. En la tercera columna, se indican los valores medios que representan la afinidad de anticuerpos.

	FACScan en células CEA + (Mel P5)		FACScan en células CEA - (COS-1)	
	% de células fluorescentes	Media (afinidad)	% de células fluorescentes	Media (afinidad)
células	0,56	5,21	0,40	4,55
CTR negativo	28,34	19,79	17,66	15,64
5 µg/ml de DIATHIS-1 0,2 M	98,28	146,44	18,16	15,6
10 µg/ml de DIATHIS-1 0,2 M	97,50	114,72	8,58	11,95

	FACScan en células CEA + (Mel P5)		FACScan en células CEA - (COS-1)	
	% de células fluorescentes	Media (afinidad)	% de células fluorescentes	Media (afinidad)
20 µg/ml de DIATHIS-1 0,2 M	95,80	85,23	9,91	13,14
40 µg/ml de DIATHIS-1 0,2 M	95,43	55,45	7,80	12,22
5 µg/ml de DIATHIS-1 0,5 M	95,91	95,27	10,46	14,59
10 µg/ml de DIATHIS-1 0,5 M	97,75	85,63	13,62	14,64
20 µg/ml de DIATHIS-1 0,5 M	96,29	91,67	20,83	16,08
40 µg/ml de DIATHIS-1 0,5 M	91,57	60,3	16,74	16,35

[0063] La figura 7 muestra la especificidad de DIATHIS-1 0,2 M, determinada mediante ensayo de citometría (análisis FacScan). Los citogramas muestran los resultados obtenidos en la población celular de melanoma (picos sólidos) con respecto a las células CEA-negativas COS1 (gris, líneas intermedias). Las líneas negras representan células de melanoma que han recibido únicamente los anticuerpos secundarios.

- 5 **[0064]** La especificidad de unión al antígeno de scFv DIATHIS-1 se analizó también mediante inmunotinción por microscopía de fluorescencia como método cualitativo. Se cultivaron células MelP5 y COS-1 sobre cubreobjetos de cristal lavados y fijados con un 4 % (v/v) de formaldehído durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se incubaron en PBS que contenía BSA al 1 % (p/v) y gelatina al 0,1 % (p/v) para saturar sitios de unión no específicos. El scFv se suspendió a 5 µg/ml en solución de bloqueo y se añadió a las células. Tras 60 minutos de incubación a temperatura ambiente, se añadió 1 ml de un anticuerpo anti-FLAG M2 de ratón diluido 1:400 (Sigma Aldrich), y las células se incubaron posteriormente durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras el lavado, se añadió en las muestras un conjugado FITC de anticuerpo anti-ratón, diluido 1:200 en solución de bloqueo, y se detectó la fluorescencia utilizando un microscopio de fluorescencia Leica DMLB equipado con una cámara digital CCD DC300F. Los núcleos se tiñeron con solución DAPI diluida 1:10000. Las células de melanoma MelP5 resultaron muy positivas a la tinción de scFv DIATHIS-1, mostrando una clara señal de borde celular proporcional a los inmunocomplejos de la membrana celular, mientras que no se detectó ninguna señal en células COS-1 CEA-negativas, mostrando la especificidad de DIATHIS-1 (figura 8).

[0065] La figura 8 representa la especificidad de DIATHIS-1 a células CEACAM1-positivas.

Pel B es fundamental para la configuración oligomérica de DIATHIS-1

- 20 **[0066]** La formación de estructuras oligoméricas estables fue un descubrimiento inesperado para un scFv que presentaba un conector de 15 aminoácidos. Una diferencia entre el scFv de la invención y el de la técnica es que DIATHIS-1 conserva la secuencia Pel B. Por lo general, los scFv se fusionan con una secuencia líder y, a continuación, se recuperan en el periplasma o en el medio de cultivo, y la secuencia líder se suprime mediante la peptidasa Pel B presente en la membrana plasmática. Al preparar DIATHIS-1, se comenzó por los cuerpos de inclusión, de tal modo que Pel B no se suprime, sino que se conserva, y este hecho puede influir en la formación de oligómeros.

- 30 **[0067]** Con el fin de examinar si la presencia de Pel B puede inducir la formación de scFv oligómeros, se clonó el mismo scFv anti-CEA sin la secuencia Pel B en un vector pET 45b(+) y se purificó esta proteína empleando el mismo método. Para evaluar el comportamiento de los dos anticuerpos recombinantes, se realizó cromatografía de exclusión por tamaño (Superdex 75) con DIATHIS-1 y con la misma proteína sin la secuencia Pel B. Los resultados obtenidos se representan en la figura 9, y muestran una configuración distinta que no depende del conector (es la misma en ambos), sino de la presencia de Pel B. De hecho, mientras que scFv DIATHIS-1 se eluye en dos formas distintas de aproximadamente 30 kDa y 60 kDa, la misma proteína sin el péptido señal Pel B se eluye en un único pico de 33 kDa correspondiente a la forma monomérica.

- 35 **[0068]** La figura 9 muestra cromatografía de exclusión por tamaño ejecutada utilizando un sistema de cromatografía ÄKTA en condición isocrática (tampón fosfato 50 mM pH 7.5 y NaCl 0,15 M). Los pesos moleculares se calcularon en función de la curva estándar obtenida calibrando el sistema con proteínas de peso

molecular conocido: albúmina 67 000 Da, ovoalbúmina 43 000 Da, anhidrasa carbónica 29 000 Da, ribonucleasa 13 700 Da y vitamina B12 1315 Da.

5 **[0069]** La farmacocinética de scFv DIATHIS-1 se determinó en ratones suizos (CD-1 IGS). La radioyodación de scFv anti-CEA con I^{124} se llevó a cabo utilizando la metodología de lodogen. La farmacocinética se determinó tras una inyección intravenosa de dosis única (18 μ g) en la vena de la cola en ratones y se recogieron muestras de sangre transcurridos 0, 5, 10 y 30 minutos y 2, 3, 4, 6, 24, 48 horas desde la inyección para la farmacocinética estimada en intervalos de tiempo cortos y largos (figura 10A) y 2, 3, 4, 6, 24, 48 horas para la farmacocinética estimada en intervalos de tiempo largos (figura 10B). La radiactividad plasmática se midió mediante un contador γ . Muchos estudios han señalado el aclaramiento acelerado de distintos scFv y una semivida corta en circulación. Inesperadamente, el scFv de la presente invención mostró un valor de semivida de $t_{1/2\alpha} = 0,07 \text{ h} \pm 0,013$ y $t_{1/2\beta} = 8,58 \pm 3,15$ similar (o superior) a los obtenidos con scFv bivalente (scFvDb) (Tabla 3).

10 **[0070]** En comparación con otras moléculas anti-CEA scFv, scFv DIATHIS-1 presenta una menor tasa de eliminación en circulación, lo cual puede contribuir a la acumulación de anticuerpos en el tumor. Así, la presencia del péptido Pel B en el N-terminal de scFv DIATHIS-1 parece afectar a la formación de oligómeros en DIATHIS-1, que se muestra como una semivida mejorada en circulación.

15 **[0071]** La figura 10 muestra (A) farmacocinética *in vivo* durante intervalos de tiempo cortos y largos de DIATHIS-1. Semivida estimada $t_{1/2\alpha}$: $0,07 \pm 0,013 \text{ h}$; $t_{1/2\beta}$: $8,58 \pm 3,15 \text{ h}$; AUC_{24h} : 113 ± 15 . (B) Farmacocinética durante un período largo. Semivida $t_{1/2}$: $8,84 \pm 3,3 \text{ h}$ (cálculo realizado con Origin 8.1)

20 **Tabla 3: Diferencias en el rendimiento farmacocinético entre scFv DIATHIS-1 y otros scFv anti-CEA monoméricos o diméricos**

	$t_{1/2} \alpha$ (h)	$t_{1/2} \beta$ (h)	AUC (0-24 h)	Referencias
monómero scFv T84.66/212	$0,12 \pm 0,003 \text{ h}$	$4,8 \pm 0,20$	26	(38)
dímero scFv T84.66/212	$0,15 \pm 0,004$	$3,3 \pm 0,14$	51,72	(38)
diacuerpo scFv T84.66	-	2,89	-	(39)
scFv MFE-23	$0,08 \pm 1$	4 ± 1	18 ± 1	(40)
scDbCEA	$0,17 \pm 3,6 \text{ h}$	$5,6 \pm 1,8$	61 ± 22	(3)
scFv DIATHIS-1	$0,07 \pm 0,013 \text{ h}$	$8,58 \pm 3,15$	113 ± 20	

Biodistribución *in vivo* y estudios de diagnóstico por imágenes en ratones atímicos portadores de tumores

25 **[0072]** Se establecieron xenoinjertos en ratones CD-1 hembra desnudos de 7-8 semanas de edad mediante inoculación subcutánea en la región de flanco de 5×10^6 células humanas Mel P5 cancerosas de melanoma. Tras 20 días, cuando las masas tumorales alcanzaron 200-400 mg de peso, los ratones se trataron con [124 I]-DIATHIS-1. La radioyodación de scFv DIATHIS-1 se llevó a cabo con 124 I con la adición de un NaIO_3/NaI como vehículo, mejorando significativamente el rendimiento de marcaje, utilizando el protocolo MAb recubierto con lodogen (41). Este método ha sido validado para minimizar el daño inducido químicamente, así como por radiación, del MAb (el método de regeneración química ofrece un medio para sincronizar la proporción molar I/MAb y, al mismo tiempo, regenera 124 I en la forma de yoduro. Con la introducción de un método de regeneración, ha sido posible maximizar la eficiencia de marcaje de MAb con 124 I). Para estudios de biodistribución de DIATHIS-1, se inyectaron de manera intravenosa a 10 ratones portadores de tumores 290 μ Ci de [124 I]DIATHIS-1, y se sacrificaron 4 horas después del tratamiento.

30 **[0073]** Los órganos principales (tumor, bazo, hígado, riñones, pulmón, corazón, sangre, tiroides, estómago) se pesaron, y se calculó la radiactividad con contador γ . Los resultados indican una fuerte localización de DIATHIS-1 en la masa tumoral, alcanzando valores de hasta el 35,5 % de dosis inyectada/g (tabla 4; figura 11).

35 **[0074]** Para el diagnóstico por imágenes de tomografía por emisión de positrones (PET), se inyectaron a los ratones 290 μ Cu de [124 I]-DIATHIS-1, y se analizaron transcurridas 4 y 6 horas desde la inyección. El tratamiento y análisis de las imágenes se llevaron a cabo por medio del *software* convencional microPET. Los resultados

señalan que DIATHIS-1 se localiza casi exclusivamente en las masas tumorales, y que se ha logrado un diagnóstico por imágenes satisfactorio (figura 12).

Tabla 4: Biodistribución de ^{124}I DIATHIS-1 en ratones atímicos portadores de xenoinjertos Melp5

Órganos	% de DI/g
Tumor	35,58
Sangre	9,80
Bazo	5,82
Hígado	3,35
Riñones	16,06
Pulmón	7,08
Corazón	6,90
Tiroides	8,16
Estómago	7,20
Proporciones	
Tumor/sangre	3,62
Tumor/riñón	2,21
Tumor/hígado	10,59

5 **[0075]** La figura 11 muestra la biodistribución en ratones desnudos portadores de tumores. A los ratones se les inyectó ^{124}I -DIATHIS-1 por vía intravenosa. La absorción de tejido tumoral y normal se expresó como porcentaje de DI/g.

10 **[0076]** La figura 12 muestra el diagnóstico por imágenes PET de ^{124}I -DIATHIS-1. Se inyectaron por vía intravenosa 290 μCi del anticuerpo ^{124}I -scFv anti-CEACAM en ratones desnudos CD-1 portadores de tumores, y se realizaron imágenes microPET con anestesia con isoflurano. El momento de adquisición de imágenes fue 4 h tras la inyección.

15 **[0077]** El scFv DIATHIS-1 anti-CEA de la presente invención, al evaluarse en un modelo de xenoinjerto tumoral de ratón atímico mediante PET, mostró unas excelentes propiedades de determinación de un objetivo y de diagnóstico por imágenes al marcarse con ^{124}I . El nivel de absorción tumoral transcurridas 4 horas desde la inyección era del 35,5 % de DI/g, y era mucho mayor que los niveles obtenidos por otros grupos con el uso de ^{124}I . En Sundaresan *et al.*, (43) se indicó una absorción tumoral tras 18 h de $4,53 \pm 0,50$ % de DI/g en ratones con xenoinjerto LS174T tratados con diacuerpo ^{124}I T84.66 anti-CEA. El mismo anticuerpo marcado con ^{123}I alcanza un máximo de $13,68 \pm 1,49$ % de DI/g 2 h después de la administración (41), mientras que el formato monomérico marcado con ^{125}I alcanza un máximo de $6,57 \pm 0,68$ % de DI/g 1 h después de la administración y $3,66 \pm 0,62$ % de DI/g tras 6 h (38).

20 **[0078]** El scFv de la presente invención se puede utilizar como agente de diagnóstico por imágenes para complementar las técnicas de diagnóstico existentes, y puede constituir una base para un enfoque terapéutico selectivo de enfermedades malignas.

Tabla 5: Diferencias en los niveles de absorción tumoral entre scFv DIATHIS-1 y otros scFv anti-CEA monoméricos o diméricos

	% de DI/g	Tiempo (h)	Referencias
diacuerpo ¹²⁴ I T84.66 anti-CEA	4,53 ± 0,50	18	(43)
diacuerpo ¹²³ I T84.66 anti-CEA	13,68 ± 1,49	2	(41)
¹²⁵ I scFv T84.66	6,57 ± 0,68	1	(39)
¹²⁴ I scFv DIATHIS-1	35,58 ± 0,13	4	

DERIVADOS DE DIATHIS-1

5 **[0079]** Se han realizado una serie de proteínas de fusión de DIATHIS-1 y compañeros con un potencial interés terapéutico, donde las proteínas de fusión conservan las propiedades de unión de DIATHIS-1. Entre los ejemplos que se muestran a continuación se incluye DIATHIS-1 fusionada con ubiquitina (un pequeño péptido capaz de influir en una serie de propiedades celulares), vpr (una proteína viral capaz de detener el crecimiento celular), citosina desaminasa (una enzima), listeriolisina (una toxina) e interleucina-2 (IL-2, una citocina). Todas las proteínas de fusión conservaron la capacidad para reconocer células de melanoma.

10 scFv DIATHIS-1:ubiquitina

15 **[0080]** La secuencia humana de la ubiquitina se amplificó mediante PCR a partir del ADNc insertado en el vector pET3a con el cebador directo Ub WT NotI5': 5'-GAAGGAGCGGCCGCTATGCAGATCTTC-3', SEQ ID N.º 5, y el cebador inverso UbWTNotI3': 5'- CAAGAATGCGGCCGACCTCTTAGTCTTA-3', SEQ ID N.º 6, que introducen un sitio de restricción para la endonucleasa NotI en ambos terminales de la ubiquitina. La secuencia amplificada se insertó en el vector pET22b(+) en el C-terminal del scFvDIATHIS-1 anti-CEA. Esta incluía únicamente la etiqueta His 6, ya que las otras etiquetas se suprimieron durante el proceso de clonación a causa de la digestión del vector con la enzima de restricción NotI. Esto se aplica también a los subsiguientes constructos que se ilustran a continuación. El constructo ensamblado se transfirió a BL21(DE3) de *E. coli* para la expresión proteica.

[0081] Por lo que respecta a las siguientes proteínas de fusión, la estructura se muestra en la figura 13.

20 scFv DIATHIS-1:vpr de VIH-1

25 **[0082]** La secuencia de Vpr de VIH-1 se amplificó mediante PCR a partir del ADNc insertado en pGEX-2T (GE Healthcare) con el cebador directo VPRNotI+link5': 5'-TTCCGCGTGC GGCCGCATCTTCCTCATCGGGTAGTAGCTCTTCCGGCATGGAACAAGCC CCAGAAGACCA-3', SEQ ID N.º 7, que añade un sitio de restricción para la endonucleasa NotI, y a continuación un conector (SSSSG)₂ en el terminal 5' de la secuencia de Vpr, y el cebador inverso VPRNotI3': 5'-ATTCCCGGGGCGGCCGCGGATCTACTGGCTCCATTT-3', SEQ ID N.º 8, que introduce un sitio de restricción para la endonucleasa NotI en el terminal 3' de vpr. La secuencia amplificada se insertó en el vector pET22b en el C-terminal del scFvDIATHIS-1 anti-CEA. El constructo ensamblado se transfirió a BL21(DE3) de *E. coli* para la expresión proteica.

30 scFv DIATHIS-1:citosina desaminasa de levadura (YCD)

35 **[0083]** La secuencia de citosina desaminasa de levadura (YCD) que incluía el conector (SSSSG)₃ en el terminal 5' se amplificó mediante PCR a partir del constructo scFvE8:YCD (Zamboni *et al.*, 2008; Int. J. Oncol.) insertado en el pQE30Xa con el cebador directo LinYCD NotI 5': 5'-CTAGGCGCGGCCGCTTCCCATCGGGT-3', SEQ ID N.º 9, y con el cebador inverso YCD NotI3': 5'-GGCTGCGCGGCCGCTCAGGAATATCT-3', SEQ ID N.º 10, que introduce un sitio de restricción para la endonucleasa NotI en ambos. La secuencia amplificada se insertó en el vector pET22b(+) en el C-terminal del scFvDIATHIS-1 anti-CEA. El constructo ensamblado se transfirió a BL21(DE3) de *E. coli* para la expresión proteica.

scFv DIATHIS-1:listeriolisina-O (LLO) Δ PEST

40 **[0084]** La secuencia de listeriolisina-O LLO, que carece de la señal de degradación PEST, se amplificó mediante PCR a partir del ADNc insertado en el vector pET3d con el cebador directo LLONotI+link5':5'-TGACCGTCTAGGCTCTTCCTCATCGGGTAGTAGCTCTTCCGGCTCATCGTCCAGCGGC TCCATGGAAATCG-3', SEQ ID N.º 11, que añade un sitio de restricción para la endonucleasa NotI, y a continuación un conector (SSSSG)₃ en el terminal 5' de la secuencia de LLO, y con el cebador inverso LLONotI3': 5'-ATCGAAGCGGCCGCGAGCTAGCATGACTGGTG-3', SEQ ID N.º 12, que introduce un sitio de restricción para

la endonucleasa NotI en el terminal 3' de LLO. La secuencia amplificada se insertó en el vector pET22b(+) en el C-terminal del scFvDIATHIS-1 anti-CEA. El constructo ensamblado se transfirió a BL21(DE3) de *E. coli* para la expresión proteica.

scFv DIATHIS-1:interleucina 2 (IL-2)

5 **[0085]** La secuencia de interleucina 2 (IL-2) que incluía el conector (SSSSG)₃ en el terminal 5' se amplificó mediante PCR a partir del constructo scFvE8:IL-2 insertado en el vector pcDNA3.1 eucariota con el cebador directo Lin-IL2 NotI 5' 5'-CTGACCGCGGCCGCTCTTCCTCATCGGGTAGTAG-3', SEQ ID N.º 13, y con el cebador inverso IL2-NotI 3':5'-AGACTCGGCGGCCGAGTCAGTGTTGAGATGAT-3', SEQ ID N.º 14, que introduce un sitio de restricción para la endonucleasa NotI en ambos terminales. La secuencia amplificada se insertó en el vector pET22b(+) en el C-terminal del scFvDIATHIS-1 anti-CEA. El constructo ensamblado se transfirió a BL21(DE3) de *E. coli* para la expresión proteica.

Actividad de unión a CEA de proteínas de fusión seleccionadas

15 **[0086]** La figura 14 adjunta muestra la afinidad y especificidad al antígeno CEA de derivados de scFv DIATHIS-1, determinadas mediante citometría de flujo (panel izquierdo) y análisis por inmunofluorescencia (panel derecho) en la línea celular primaria de melanoma CEA-positiva Melp5. Se utilizó la línea celular COS1 como control CEA-negativo. (A) Datos obtenidos con la proteína de fusión scFvDIATHIS-1:ubiquitina. (B) Datos obtenidos con la proteína de fusión scFvDIATHIS-1:vpr de VIH-1. (C) Datos obtenidos con la proteína de fusión scFvDIATHIS-1:YCD.

REFERENCIAS

- 20 **[0087]**
1. Pavoni E, Flego M, Dupuis ML, Barca S, Petronzelli F, Anastasi AM, D'Alessio V, Pelliccia A, Vaccaro P, Monteriù G, Ascione A, De Santis R, Felici F, Cianfriglia M, Minenkova O. Selection, affinity maturation, and characterization of a human scFv antibody against CEA protein. *BMC Cancer*. 2006 24;6:41.
 - 25 2. Alexander A. Kortt, Olan Dolezal, Narbara E. Power y Peter J. Hudson. "Diameric and trimeric antibodies: high avidity scFvs for cancer targeting". *Biomolecular Engineering* 2001 18:95-108.
 3. Roland Srtork, Kirstin A. Zettlitz, Dafne Muller, Miriam Rether, Franz-Georg Hanisch y Roland E. Kontermann. N-Glycosylation as Novel Strategy to improve pharmacokinetic Properties of Bispecific Single-Chain Diabodies. *The journal of biological chemistry* 2008; 283: 7804-7812.
 4. Carter PJ. Potent antibody therapeutics by design. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(5):343-57.
 - 30 5. Sharkey RM y Goldenberg DM. Targeted therapy of cancer: new prospects for antibodies and immunoconjugates. *CA Cancer J Clin*. 2006;56(4):226-43.
 6. Skerra A, Pluckthun A. Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science* 1988; 240: 1038-1041.
 - 35 7. Milenic DE, Yokota T, Filpula DR, Finkelman MA, Dodd SW, Wood JF, Whitlow M, Snoy P, Schlom J. Construction, binding properties, metabolism, and tumor targeting of a single-chain Fv derived from the pancarcinoma monoclonal antibody CC49. *Cancer Res*. 1991;51:6363-71.
 8. Yokota T, Milenic DE, Whitlow M, Schlom J. Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms. *Cancer Res*. 1992;52(12):3402-8.
 - 40 9. Adams GP, McCartney JE, Tai MS, Oppermann H, Huston JS, Stafford WF 3.º, Bookman MA, Fand I, Houston LL, Weiner LM. Highly specific in vivo tumor targeting by monovalent and divalent forms of 741F8 anti-c-erbB-2 single-chain Fv. *Cancer Res*. 1993;53(17):4026-34.
 10. George AJ, Titus JA, Jost CR, Kurucz I, Perez P, Andrew SM, Nicholls PJ, Huston JS, Segal DM. Redirection of cellular cytotoxicity. A two-step approach using recombinant single-chain Fv molecules. *Cell Biophys*. 1995;26(3):153-65.
 - 45 11. Albrecht H, Burke PA, Natarajan A, Xiong CY, Kalicinsky M, DeNardo GL, DeNardo SJ. Production of soluble ScFvs with C-terminal-free thiol for site-specific conjugation or stable dimeric ScFvs on demand. *Bioconjug Chem*. 2004;15(1):16-26.
 12. Kim S J, Park Y, y Hong H J. Antibody Engineering for the Development of Therapeutic Antibodies. *Mol. Cells*, 2005;20:17-29.
 - 50 13. Holliger P, Prospero T, Winter G. "Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90:6444-8.

14. Hu S, Shively L, Raubitschek A, Sherman M, Williams LE, Wong JY, Shively JE, Wu AM. Minibody: A novel engineered anti-carcinoembryonic antigen antibody fragment (single-chain Fv-CH3) which exhibits rapid, high-level targeting of xenografts. *Cancer Res.* 1996;56:3055-61.
- 5 15. Nolan, O. y O'Kennedy, R. Bifunctional antibodies: concept, production and applications. *Biochim. Biophys. Acta.* 1990;1040:1.
16. Hammarstrom, S. The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Semin Cancer Biol.* 1999;9:67-81.
17. Thies A, Schachner M, Moll I, Berger J, Schulze HJ, Brunner G, Schumacher U. Overexpression of the cell adhesion molecule L1 is associated with metastasis in cutaneous malignant melanoma. *Eur J Cancer.* 10 2002;38:1708-16.
18. Oliveira-Ferrer L, Tilki D, Ziegeler G, Hauschild J, Loges S, Irmak S, Kilic E, Huland H, Friedrich M, Ergün S. Dual role of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 in angiogenesis and invasion of human urinary bladder cancer. *Cancer Res.* 2004 15;64:8932-8.
19. Laack E, Nikbakht H, Peters A, Kugler C, Jasiewicz Y, Edler L, Brümmer J, Schumacher U, Hossfeld DK. Expression of CEACAM1 in adenocarcinoma of the lung: a factor of independent prognostic significance. *J Clin Oncol.* 15 2002;20:4279-84.
20. Mirick GR, Bradt BM, Denardo SJ, Denardo GL. A review of human anti-globulin antibody (HAGA, HAMA, HACA, HAAH) responses to monoclonal antibodies. Not four letter words. *QJ Nucl MedMol Imaging.* 2004;48(4):251-7.
21. Hoogenboom, HR. Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat Biotechnol.* 20 2005;23(9):1105-16.
22. Benhar I. Design of synthetic antibody libraries. *Expert Opin Biol Ther.* 2007;7(5):763-79.
23. Graumann K y Premstaller A. Manufacturing of recombinant therapeutic proteins in microbial systems. *Biotechnol J.* 2006;1(2):164-86.
24. Holliger P, Hudson PJ. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol.* 25 2005;23: 1126-1136.
25. Viti F, Nilsson F, Demartis S, Huber A, Neri D. Design and use of phage display libraries for the selection of antibodies and enzymes. *Methods Enzymol* 2000, 326: 480-505.
26. Neri D, Petrul H, Winter G, Light Y, Marais R, Britton KE, Creighton AM. Radioactive labeling of recombinant antibody fragments by phosphorylation using human casein kinase II and [γ - 32 P]-ATP. *Nat Biotechnol.* 30 1996; 14(4):485-90.
27. Better, M., Chang, C. P., Robinson, R. R. y Horwitz, A. H. (1988) *Escherichia coli* secretion of an active chimeric antibody fragment. *Science* 240, 1041-1043.
28. Paetzel M, Karla A, Strynadka NC, Dalbey RE. Signal peptidases. *Chem Rev.* 2002;102:4549-4580.
29. Sletta H, Tøndervik A, Hakvåg S, Aune TE, Nedal A, Aune R, Evensen G, Valla S, Ellingsen TE, Brautaset T. The presence of N-terminal secretion signal sequences leads to strong stimulation of the total expression levels of three tested medically important proteins during high-cell-density cultivations of *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 35 2007;73(3):906-12.
30. Goto, Y. y Hamaguchi, K. The role of the intrachain disulfide bond in the conformation and stability of the constant fragment of the immunoglobulin light chain. *J. Biochem.* 1979; 86, 1433:1441.
31. Rudikoff, S. y Pumphrey, J. G. Functional antibody lacking a variable-region disulfide bridge. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 1986; 83, 7875±7878.
32. Proba, K., Honegger, A. y Pluckthun, A. A natural antibody missing a cysteine in VH: consequences for thermodynamic stability and folding. *J. Mol. Biol.* 1997; 265, 161±172.
33. Choi JH, Keum KC y Lee SY. Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. *Chem Eng Science* 2006;61:876-885.
34. S. Rath, C.M. Stanley y M.W. Steward. An inhibition enzyme immunoassay for estimating relative antibody affinity and affinity heterogeneity. *J Immunol Methods.* 1988 10;106(2):245-9.
35. SI Rudnick y Adams GP. Affinity and avidity in Antibody-Based Tumor Targeting. *Cancer Biother Radiopharm.* 50 2009;24(2):155-61.

36. Adams GP, Schier R, McCall AM, Crawford RS, Wolf EJ, Weiner LM, Marks JD. Prolonged in vivo tumor retention of a human diabody targeting the extracellular domain of humanHER2/neu. *Br j. Cancer* 1998;77:1405.
- 5 37. Verel I, Heider KH, Siegmund M, Ostermann E, Patzelt E, Sproll M, Snow GB, Adolf GR, van Dongen GA. Tumor targeting of antibodies with different affinity for target antigen CD44V6 in nude mice bearing head and neck cancer xenograft. *Int J Cancer* 2002;99:396-402.
38. Wu AM, Chen W, Raubitschek A, Williams LE, Neumaier M, Fischer R, Hu SZ, Odom-Maryon T, Wong JY, Shively JE. Tumor localization of anti-CEA single-chain Fvs: improved targeting by non-covalent dimers. *Immunotechnology* 1996;2:21-36.
- 10 39. Yazaki, P.J., Wu, A.M., Tsai, S.W., Williams, L.E., Ikler, D.N., Wong, J.Y., Shively, J.E. y Raubitschek, A.A. Tumor targeting of radiometal labeled anti-CEA recombinant T84.66 diabody and t84.66 minibody: comparison to radiiodinated fragments. *Bioconjug. Chem.*, 2001; 12,220-228.
40. Muller D, Karle A, Meißburger B, Ho I, Stork R y Konterman RE. Improved Pharmacokinetics of Recombinant Bispecific Antibody Molecules by Fusion to Human Serum Albumin. *J biological chemistry* 15 2007;282: 12650-12660.
41. Wu AM, Williams LE, *et al.* Anti-carcinoembryonic antigen (CEA) diabody for rapid tumor targeting and imaging. *Tumor Targeting* 1999;4:47-58.
42. Olafsen T, Cheung CW, Yazaki PJ, Li L, Sundaresan G, Gambhir SS, Sherman MA, Williams LE, Shively JE, Raubitschek AA, Wu AM. Covalent disulfide-linked anti-CEA diabody allows site-specific conjugation and radiolabeling for tumor targeting applications. *Protein Eng Des Sel.* 2004 Ene;17(1):21-7.
- 20 43. Sundaresan G, Yazaki P J., Shively J E., Finn R D., Larson SM, Raubitschek A A., Williams LE, Chatzioannou A F., Gambhir SS, y Wu AM, 124I-Labeled Engineered Anti-CEA Minibodies and Diabodies Allow High-Contrast, Antigen- Specific Small-Animal PET Imaging of Xenografts in Athymic Mice. *J Nucl Med* 2003; 44:1962-1969.

25 LISTA DE SECUENCIAS

[0088]

- <110> Istituto Superiore di sanità
- <120> DERIVADOS DE ANTICUERPOS
- 30 <130> PN791902WO
- <150> 1010389.3
- <151> 2010-06-21
- <160> 24
- <170> PatentIn versión 3.5
- 35 <210> 1
- <211> 864
- <212> ADN
- <213> Artificial
- 40 <220>
- <223> SCFvDIATHIS-1
- <220>
- 45 <221> CDS
- <222> (1)..(864)

ES 2 706 409 T3

<400> 1

atg aaa tac ctg ctg ccg acg gct gct gct ggt ctg ctg ctc ctc gct Met Lys Tyr Leu Leu 5 Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala Ala 1	48
gcc cag ccg gcg atg gcc atg gcc gag gtg cag ctg gcg gag tct ggg Ala Gln Pro Ala Met Ala Met Ala Glu Val Gln Leu Ala Glu Ser Gly 20 25 30	96
gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg tcc ctg aga ctc tcc tgt gcc gcc Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala 35 40 45	144
tct gga ttc acc ttt agc agc gat gcc atg agc tgg gtc cgc cag gct Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Asp Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala 50 55 60	192
cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc tca gct att agt ggt agt ggt ggt Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly 65 70 80	240
agc aca tac tac gca gac tcc gtg aag ggc cgg ttc acc atc tcc aga Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg 85 90 95	288
gac aat tcc aag aac acg ctg tat ctg caa atg aac agc ctg aga gcc Asp Asn Ser Lys 100 Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala 105 110	336
gag gac acg gcc gta tat tac tgt gcg aaa agt aat gag ttt ctt ttt Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Ser Asn Glu Phe Leu Phe 115 120 125	384
gac tac tgg ggc cag gga act ctg gtc acc gtg tcg aga ggt gga ggc Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Arg Gly Gly Gly 130 135 140	432
ggt tca ggc gga ggt ggc tct ggc ggt ggc gga tcg tct gag ctg act Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Glu Leu Thr 145 150 155 160	480
cag gac cct gct gtg tct gtg gcc ttg gga cag aca gtc agg atc aca Gln Asp Pro Ala Val 165 Ser Val Ala Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr 170 175	528
tgc caa gga gac agc ctc aga agc tct tat gca agc tgg tac cgg cag Cys Gln Gly Asp 180 Ser Leu Arg Ser Tyr Ala Ser Trp Tyr Arg Gln 185 190	576
agg cca gga cag gcc cct gta cct gtc atc tat ggt aag aac aac tgg Arg Pro Gly Gln Ala Pro Val Pro Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Trp 195 200 205	624
ccc tca ggg atc cca gac cgg ttc tct ggc tcc agc tca gga aac aca Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr 210 215 220	672
gct tcc ttg acc atc act ggg gct cag gcg gaa gat gag gct gac tat Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr 225 230 235 240	720
tac tgt aac tcc tct tat gcg tgg ctg ccc tat gtg gta ttc ggc gga Tyr Cys Asn Ser Ser Tyr Ala Trp Leu Pro 250 Tyr Val Val Phe Gly Gly 245 255	768
ggg acc aag ctg acc gtc cta ggc gcg gcc gca gat gac gat tcc gac Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala Asp Asp Asp Ser Asp 260 265 270	816
gac gat gac tac aag gac gac gat gac aag cac cat cac cat cac cat Asp Asp Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys His His His His His His 275 280 285	864

<210> 2

ES 2 706 409 T3

<211> 288

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 2

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

ES 2 706 409 T3

Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met⁻ Asn Ser Leu Arg Ala
 100 105 110
 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Ser Asn Glu Phe Leu Phe
 115 120
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Arg Gly Gly Gly
 130 135 140
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Glu Leu Thr
 145 150 155 160
 Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr
 165 170 175
 Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Ser Tyr Ala Ser Trp Tyr Arg Gln
 180 185 190
 Arg Pro Gly Gln Ala Pro Val Pro Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Trp
 195 200 205
 Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr
 210 215 220
 Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr
 225 230 235 240
 Tyr Cys Asn Ser Ser Tyr Ala Trp Leu Pro Tyr Val Val Phe Gly Gly
 245 250 255
 Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala Asp Asp Asp Ser Asp
 260 265 270
 Asp Asp Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys His His His His His His
 275 280 285

<210> 3

<211> 22

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador directo aCEANcol5'

<400> 3

ccagccggcc atggccgagg tg 22

<210> 4

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

ES 2 706 409 T3

<220>

<223> cebador inverso CEA EcoRI3'

<400> 4

acaaccatat gcagtctaatt ggtgatggg 30

<210> 5

<211> 27

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador directo Ub WT NotI5'

<400> 5

gaaggagcgg ccgctatgca gatcttc 27

<210> 6

<211> 29

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador inverso ubWTNotI3'

<400> 6

caagaatgcg gccgcacctc ttagtctta 29

<210> 7

<211> 70

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador directo VPRNotI+link5'

<400> 7

ttccgcgtgc ggccgatct tcctcatcgg gtagtagctc ttccggcatg gaacaagccc 60

cagaagacca 70

ES 2 706 409 T3

<210> 8

<211> 36

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador inverso VPRNotI3'

<400> 8

attcccgggg cggccgcgga tctactggct ccattt 36

<210> 9

<211> 26

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador directo LinYCD NotI 5'

<400> 9

ctaggcgcgg ccgcttcca tcgggt 26

<210> 10

<211> 27

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador inverso YCD NotI3'

<400> 10

ggctgcgcg cgcctcagg aatatct 27

<210> 11

<211> 72

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador directo LLONotI+link5'

ES 2 706 409 T3

<400> 11

tgaccgtcct aggctcttcc tcatacgggta gtagctcttc cggctcatcg tccagcggct 60
ccatggaaat cg 72

<210> 12

<211> 31

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador inverso LLONotI3'

<400> 12

atcgaagcgg ccgcagctag catgactggg g 31

<210> 13

<211> 35

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador directo Lin-IL2 NotI 5'

<400> 13

ctgaccgcgg ccgcctcttc ctcatcgggt agtag 35

<210> 14

<211> 33

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador inverso IL2-NotI 3'

<400> 14

agactcggcg gccgcagtca gtgttgagat gat 33

<210> 15

<211> 1059

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> scFvDIATHIS-1:ubiquitina

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1059)

<400> 15

ES 2 706 409 T3

atg Met 1	aaa Lys	tac Tyr	ctg Leu 5	ctg Leu	ccg Pro	acg Thr	gct Ala	gct Ala 10	gct Ala	ggt Gly	ctg Leu	ctg Leu	ctc Leu 15	ctc Leu 15	gct Ala	48
gcc Ala	cag Gln	ccg Pro	gcg Ala 20	atg Met	gcc Ala	atg Met	gcc Ala	gag Glu 25	gtg Val	cag Gln	ctg Leu	gcg Ala	gag Glu 30	tct Ser	ggg Gly	96
gga Gly	ggc Gly	ttg Leu 35	gta Val	cag Gln	cct Pro	ggg Gly	ggg Gly 40	tcc Ser	ctg Leu	aga Arg	ctc Leu	tcc Ser 45	tgt Cys	gcc Ala	gcc Ala	144
tct Ser	gga Gly 50	ttc Phe	acc Thr	ttt Phe	agc Ser	agc Ser 55	gat Asp	gcc Ala	atg Met	agc Ser	tgg Trp 60	gtc Val	cgc Arg	cag Gln	gct Ala	192
cca Pro 65	ggg Gly	aag Lys	ggg Gly	ctg Leu 70	gag Glu	tgg Trp	gtc Val	tca Ser	gct Ala	att Ile 75	agt Ser	ggt Gly	agt Ser	ggt Gly	ggt Gly 80	240
agc Ser	aca Thr	tac Tyr	tac Tyr	gca Ala 85	gac Asp	tcc Ser	gtg Val	aag Lys	ggc Gly 90	cgg Arg	ttc Phe	acc Thr	atc Ile	tcc Ser 95	aga Arg	288
gac Asp	aat Asn	tcc Ser	aag Lys 100	aac Asn	acg Thr	ctg Leu	tat Tyr	ctg Leu 105	caa Gln	atg Met	aac Asn	agc Ser	ctg Leu 110	aga Arg	gcc Ala	336
gag Glu	gac Asp	acg Thr 115	gcc Ala	gta Val	tat Tyr	tac Tyr	tgt Cys 120	gcg Ala	aaa Lys	agt Ser	aat Asn	gag Glu 125	ttt Phe	ctt Leu	ttt Phe	384
gac Asp	tac Tyr 130	tgg Trp	ggc Gly	cag Gln	gga Gly	act Thr 135	ctg Leu	gtc Val	acc Thr	gtg Val	tcg Ser 140	aga Arg	ggt Gly	gga Gly	ggc Gly	432
ggt Gly 145	tca Ser	ggc Gly	gga Gly	ggt Gly 150	ggc Gly	tct Ser	ggc Gly	ggt Gly	ggc Gly	gga Gly 155	tcg Ser	tct Ser	gag Glu	ctg Leu	act Thr 160	480
cag Gln	gac Asp	cct Pro	gct Ala	gtg Val 165	tct Ser	gtg Val	gcc Ala	ttg Leu	gga Gly 170	cag Gln	aca Thr	gtc Val	agg Arg	atc Ile 175	aca Thr	528
tgc Cys	caa Gln	gga Gly	gac Asp 180	agc Ser	ctc Leu	aga Arg	agc Ser	tct Ser 185	tat Tyr	gca Ala	agc Ser	tgg Trp	tac Tyr 190	cgg Arg	cag Gln	576
agg Arg	cca Pro	gga Gly 195	cag Gln	gcc Ala	cct Pro	gta Val	cct Pro 200	gtc Val	atc Ile	tat Tyr	ggt Gly	aag Lys 205	aac Asn	aac Asn	tgg Trp	624
ccc Pro	tca Ser	ggg Gly	atc Ile	cca Pro	gac Asp	cgg Arg 215	ttc Phe	tct Ser	ggc Gly	tcc Ser	agc Ser 220	tca Ser	gga Gly	aac Asn	aca Thr	672
gct Ala 225	tcc Ser	ttg Leu	acc Thr	atc Ile	act Thr 230	ggg Gly	gct Ala	cag Gln	gcg Ala	gaa Glu 235	gat Asp	gag Glu	gct Ala	gac Asp	tat Tyr 240	720
tac Tyr	tgt Cys	aac Asn	tcc Ser	tct Ser	tat Tyr	gcg Ala	tgg Trp	ctg Leu	ccc Pro	tat Tyr	gtg Val	gta Val	ttc Phe	ggc Gly	gga Gly	768

ES 2 706 409 T3

	245		250		255		
ggg acc aag ctg acc gtc cta ggc gcg gcc gca atg cag atc ttc gtc							816
Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Met Gln Ile Phe Val	260		265		270		
aag acg tta acc ggt aaa acc ata act cta gaa gtt gaa cca tcc gat							864
Lys Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu Val Glu Pro Ser Asp	275		280		285		
acc atc gaa aac gtt aag gct aaa att caa gac aag gaa ggc att cca							912
Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp Lys Glu Gly Ile Pro	290		295		300		
cct gat caa caa aga ttg atc ttt gcc ggt aag cag ctc gag gac ggt							960
Pro Asp Gln Gln Arg Leu Ile Phe Ala Gly Lys Gln Leu Glu Asp Gly	305		310		315		
aga acg ctg tct gat tac aac att cag aag gag tcg acc tta cat ctt							1008
Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Gln Lys Glu Ser Thr Leu His Leu	325		330		335		
gtc tta aga cta aga ggt gcg gcc gca ctc gag cac cac cac cac cac							1056
Val Leu Arg Leu Arg Gly Ala Ala Ala Leu Glu His His His His His	340		345		350		
cac							1059
His							

<210> 16

<211> 353

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 16

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

ES 2 706 409 T3

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Ser Asn Glu Phe Leu Phe
 115 120 125
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Arg Gly Gly Gly
 130 135 140
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Glu Leu Thr
 145 150 155 160
 Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr
 165 170 175
 Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Ser Tyr Ala Ser Trp Tyr Arg Gln
 180 185 190
 Arg Pro Gly Gln Ala Pro Val Pro Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Trp
 195 200 205
 Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr
 210 215 220
 Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr
 225 230 235 240
 Tyr Cys Asn Ser Ser Tyr Ala Trp Leu Pro Tyr Val Val Phe Gly Gly
 245 250 255
 Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala Met Gln Ile Phe Val
 260 265 270
 Lys Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu Val Glu Pro Ser Asp
 275 280 285
 Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp Lys Glu Gly Ile Pro
 290 295 300
 Pro Asp Gln Gln Arg Leu Ile Phe Ala Gly Lys Gln Leu Glu Asp Gly
 305 310 315 320
 Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Gln Lys Glu Ser Thr Leu His Leu
 325 330 335
 Val Leu Arg Leu Arg Gly Ala Ala Ala Leu Glu His His His His His
 340 345 350

His

<210> 17

<211> 1152

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> scFvDIATHIS-1:vpr de VIH

ES 2 706 409 T3

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1152)

<400> 17

atg aaa tac ctg ctg ccg acg gct gct gct ggt ctg ctg ctc ctc gct Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala 1 5 10 15	48
gcc cag ccg gcg atg gcc atg gcc gag gtg cag ctg gcg gag tct ggg Ala Gln Pro Ala Met Ala Met Ala Glu Val Gln Leu Ala Glu Ser Gly 20 25 30	96
gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg tcc ctg aga ctc tcc tgt gcc gcc Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala 35 40 45	144
tct gga ttc acc ttt agc agc gat gcc atg agc tgg gtc cgc cag gct Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Asp Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala 50 55 60	192
cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc tca gct att agt agt ggt ggt ggt Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly 65 70 75 80	240
agc aca tac tac gca gac tcc gtg aag ggc cgg ttc acc atc tcc aga Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg 85 90 95	288
gac aat tcc aag aac acg ctg tat ctg caa atg aac agc ctg aga gcc Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala 100 105 110	336
gag gac acg gcc gta tat tac tgt gcg aaa agt aat gag ttt ctt ttt Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Ser Asn Glu Phe Leu Phe 115 120 125	384
gac tac tgg ggc cag gga act ctg gtc acc gtg tcg aga ggt gga ggc Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Arg Gly Gly Gly 130 135 140	432
ggt tca ggc gga ggt ggc tct ggc ggt ggc gga tcg tct gag ctg act Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Glu Leu Thr 145 150 155 160	480
cag gac cct gct gtg tct gtg gcc ttg gga cag aca gtc agg atc aca Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr 165 170 175	528
tgc caa gga gac agc ctc aga agc tct tat gca agc tgg tac cgg cag Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Ser Tyr Ala Ser Trp Tyr Arg Gln 180 185 190	576
agg cca gga cag gcc cct gta cct gtc atc tat ggt aag aac aac tgg Arg Pro Gly Gln Ala Pro Val Pro Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Trp 195 200 205	624
ccc tca ggg atc cca gac cgg ttc tct ggc tcc agc tca gga aac aca Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr 210 215 220	672
gct tcc ttg acc atc act ggg gct cag gcg gaa gat gag gct gac tat	720

ES 2 706 409 T3

Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr
 225 230 235 240
 tac tgt aac tcc tct tat gcg tgg ctg ccc tat gtg gta ttc ggc gga 768
 Tyr Cys Asn Ser Ser Tyr Ala Trp Leu Pro Tyr Val Val Phe Gly Gly
 245 250 255
 ggg acc aag ctg acc gtc cta ggc gcg gcc gca tct tcc tca tcg ggt 816
 Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Ser Ser Ser Ser Gly
 260 265 270
 agt agc tct tcc ggc atg gaa caa gcc cca gaa gac caa ggg cca cag 864
 Ser Ser Ser Ser Gly Met Glu Gln Ala Pro Glu Asp Gln Gly Pro Gln
 275 280 285
 agg gag cca cac aat gaa tgg aca cta gag ctt tta gag gag ctt aag 912
 Arg Glu Pro His Asn Glu Trp Thr Leu Glu Leu Glu Glu Leu Lys
 290 295 300
 aat gaa gct gtt aga cat ttt cct agg att tgg ctc cat ggc tta ggg 960
 Asn Glu Ala Val Arg His Phe Pro Arg Ile Trp Leu His Gly Leu Gly
 305 310 315 320
 caa cat atc tat gaa act tat ggg gat act tgg gca gga gtg gaa gcc 1008
 Gln His Ile Tyr Glu Thr Tyr Gly Asp Thr Trp Ala Gly Val Glu Ala
 325 330 335
 ata ata aga att ctg caa caa ctg ctg ttt atc cat ttc aga att ggg 1056
 Ile Ile Arg Ile Leu Gln Gln Leu Leu Phe Ile His Phe Arg Ile Gly
 340 345 350
 tgt cga cat agc aga ata ggc gtt act caa cag agg aga gca aga aat 1104
 Cys Arg His Ser Arg Ile Gly Val Thr Gln Gln Arg Arg Ala Arg Asn
 355 360 365
 gga gcc agt aga tcc gcg gcc gca ctc gag cac cac cac cac cac 1152
 Gly Ala Ser Arg Ser Ala Ala Leu Glu His His His His His
 370 375 380

<210> 18

<211> 384

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 18

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

ES 2 706 409 T3

Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
85 90 95

Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
100 105 110

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Ser Asn Glu Phe Leu Phe
115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Arg Gly Gly Gly
130 135 140

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Glu Leu Thr
145 150 155

Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr
165 170 175

Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Ser Tyr Ala Ser Trp Tyr Arg Gln
180 185 190

Arg Pro Gly Gln Ala Pro Val Pro Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Trp
195 200 205

Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr
210 215 220

Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr
225 230 235 240

Tyr Cys Asn Ser Ser Tyr Ala Trp Leu Pro Tyr Val Val Phe Gly Gly
245 250 255

Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala Ser Ser Ser Ser Gly
260 265 270

Ser Ser Ser Ser Gly Met Glu Gln Ala Pro Glu Asp Gln Gly Pro Gln
275 280 285

Arg Glu Pro His Asn Glu Trp Thr Leu Glu Leu Leu Glu Glu Leu Lys
290 295 300

Asn Glu Ala Val Arg His Phe Pro Arg Ile Trp Leu His Gly Leu Gly
305 310 315 320

Gln His Ile Tyr Glu Thr Tyr Gly Asp Thr Trp Ala Gly Val Glu Ala
325 330 335

Ile Ile Arg Ile Leu Gln Gln Leu Leu Phe Ile His Phe Arg Ile Gly
340 345 350

Cys Arg His Ser Arg Ile Gly Val Thr Gln Gln Arg Arg Ala Arg Asn
355 360 365

Gly Ala Ser Arg Ser Ala Ala Ala Leu Glu His His His His His His
370 375 380

<210> 19

<211> 1353

ES 2 706 409 T3

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> scFvDIATHIS-1:YCD

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1353)

<400> 19

atg	aaa	tac	ctg	ctg	ccg	acg	gct	gct	gct	ggt	ctg	ctg	ctc	ctc	gct	48
Met	Lys	Tyr	Leu	Leu	Pro	Thr	Ala	Ala	Ala	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Ala	
1			5				10						15			
gcc	cag	ccg	gcg	atg	gcc	atg	gcc	gag	gtg	cag	ctg	gcg	gag	tct	ggg	96
Ala	Gln	Pro	Ala	Met	Ala	Met	Ala	Glu	Val	Gln	Leu	Ala	Glu	Ser	Gly	
			20				25						30			
gga	ggc	ttg	gta	cag	cct	ggg	ggg	tcc	ctg	aga	ctc	tcc	tgt	gcc	gcc	144
Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	
		35				40						45				
tct	gga	ttc	acc	ttt	agc	agc	gat	gcc	atg	agc	tgg	gtc	cgc	cag	gct	192
Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Asp	Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	
50						55					60					
cca	ggg	aag	ggg	ctg	gag	tgg	gtc	tca	gct	att	agt	ggt	agt	ggt	ggt	240
Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	
65					70					75				80		
agc	aca	tac	tac	gca	gac	tcc	gtg	aag	ggc	cgg	ttc	acc	atc	tcc	aga	288
Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	
				85					90					95		
gac	aat	tcc	aag	aac	acg	ctg	tat	ctg	caa	atg	aac	agc	ctg	aga	gcc	336
Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	
			100					105					110			
gag	gac	acg	gcc	gta	tat	tac	tgt	gcg	aaa	agt	aat	gag	ttt	ctt	ttt	384
Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	Ser	Asn	Glu	Phe	Leu	Phe	
		115					120					125				
gac	tac	tgg	ggc	cag	gga	act	ctg	gtc	acc	gtg	tcg	aga	ggt	gga	ggc	432
Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Arg	Gly	Gly	Gly	
	130					135					140					
ggt	tca	ggc	gga	ggt	ggc	tct	ggc	ggt	ggc	gga	tcg	tct	gag	ctg	act	480
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ser	Glu	Leu	Thr	
145					150					155				160		
cag	gac	cct	gct	gtg	tct	gtg	gcc	ttg	gga	cag	aca	gtc	agg	atc	aca	528
Gln	Asp	Pro	Ala	Val	Ser	Val	Ala	Leu	Gly	Gln	Thr	Val	Arg	Ile	Thr	
				165					170					175		

ES 2 706 409 T3

tgc caa gga gac agc ctc aga agc tct tat gca agc tgg tac cgg cag Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Ser Tyr Ala Ser Trp Tyr Arg Gln 180 185 190	576
agg cca gga cag gcc cct gta cct gtc atc tat ggt aag aac aac tgg Arg Pro Gly Gln Ala Pro Val Pro Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Trp 195 200 205	624
ccc tca ggg atc cca gac cgg ttc tct ggc tcc agc tca gga aac aca Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr 210 215 220	672
gct tcc ttg acc atc act ggg gct cag gcg gaa gat gag gct gac tat Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr 225 230 240	720
tac tgt aac tcc tct tat gcg tgg ctg ccc tat gtg gta ttc ggc gga Tyr Cys Asn Ser Ser Tyr Ala Trp Leu Pro Tyr Val Val Phe Gly Gly 245 250 255	768
ggg acc aag ctg acc gtc cta ggc gcg gcc gca tct tcc tca tcg ggt Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala Ser Ser Ser Ser Gly 260 265 270	816
agt agc tct tcc ggc tca tcg tcc agc ggc atg gtg aca ggg gga atg Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Met Val Thr Gly Gly Met 275 280 285	864
gca agc aag tgg gat cag aaa ggc atg gac att gcc tat gaa gag gcc Ala Ser Lys Trp Asp Gln Lys Gly Met Asp Ile Ala Tyr Glu Glu Ala 290 295 300	912
gca ctg ggc tac aaa gaa ggc ggt gtg ccg att ggc ggt tgt ctg atc Ala Leu Gly Tyr Lys Gln Gly Gly Val Pro Ile Gly Gly Cys Leu Ile 305 310 315 320	960
aat aac aaa gac ggc tcc gtg ctg ggc cgt ggg cac aac atg cgc ttc Asn Asn Lys Asp Gly Ser Val Leu Gly Arg Gly His Asn Met Arg Phe 325 330 335	1008
cag aaa ggc agc gcc acc ctg cac ggc gaa atc tcc acc ctg gaa aac Gln Lys Gly Ser Ala Thr Leu His Gly Glu Ile Ser Thr Leu Glu Asn 340 345 350	1056
tgc ggg cgt ctc gag ggc aaa gtg tac aaa gat acc acc ctg tat acg Cys Gly Arg Leu Glu Gly Lys Val Tyr Lys Asp Thr Thr Leu Tyr Thr 355 360 365	1104
acc ctg agc ccg tgc gac atg tgt acg ggc gcc atc atc atg tac ggc Thr Leu Ser Pro Cys Asp Met Cys Thr Gly Ala Ile Ile Met Tyr Gly 370 375 380	1152
att cca cgc tgc gtg gtc ggc gaa aac gtg aat ttc aaa tcc aag ggc Ile Pro Arg Cys Val Val Gly Glu Asn Val Asn Phe Lys Ser Lys Gly 385 390 400	1200
gag aaa tac ctg cag acc cgc ggc cac gaa gtg gtc gtg gtg gac gat Glu Lys Tyr Leu Gln Thr Arg Gly His Glu Val Val Val Val Asp Asp 405 410 415	1248
gaa cgc tgc aaa aag atc atg aaa cag ttc atc gat gag cgt cca cag Glu Arg Cys Lys Lys Ile Met Lys Gln Phe Ile Asp Glu Arg Pro Gln 420 425 430	1296
gat tgg ttt gaa gat att cct gag gcg gcc gca ctc gag cac cac cac Asp Trp Phe Glu Asp Ile Pro Glu Ala Ala Ala Leu Glu His His His 435 440 445	1344
PN791902WO_ST25	
cac cac cac His His His 450	1353

<210> 20
<211> 451
<212> PRT

ES 2 706 409 T3

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 20

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

ES 2 706 409 T3

210	215	220
Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr 225 230 235 240		
Tyr Cys Asn Ser Ser Tyr Ala Trp Leu Pro Tyr Val Val Phe Gly Gly 245 250 255		
Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala Ser Ser Ser Ser Gly 260 265 270		
Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Met Val Thr Gly Gly Met 275 280 285		
Ala Ser Lys Trp Asp Gln Lys Gly Met Asp Ile Ala Tyr Glu Glu Ala 290 295 300		
Ala Leu Gly Tyr Lys Glu Gly Gly Val Pro Ile Gly Gly Cys Leu Ile 305 310 315 320		
Asn Asn Lys Asp Gly Ser Val Leu Gly Arg Gly His Asn Met Arg Phe 325 330 335		
Gln Lys Gly Ser Ala Thr Leu His Gly Glu Ile Ser Thr Leu Glu Asn 340 345 350		
Cys Gly Arg Leu Glu Gly Lys Val Tyr Lys Asp Thr Thr Leu Tyr Thr 355 360 365		
Thr Leu Ser Pro Cys Asp Met Cys Thr Gly Ala Ile Ile Met Tyr Gly 370 375 380		
Ile Pro Arg Cys Val Val Gly Glu Asn Val Asn Phe Lys Ser Lys Gly 385 390 395 400		
Glu Lys Tyr Leu Gln Thr Arg Gly His Glu Val Val Val Val Asp Asp 405 410 415		
Glu Arg Cys Lys Lys Ile Met Lys Gln Phe Ile Asp Glu Arg Pro Gln 420 425 430		
Asp Trp Phe Glu Asp Ile Pro Glu Ala Ala Ala Leu Glu His His His 435 440 445		
His His His 450		

<210> 21

<211> 2292

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> scFvDIATHIS-1:LLO PEST

ES 2 706 409 T3

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2292)

<400> 21

atg aaa tac ctg ctg ccg acg gct gct gct ggt ctg ctg ctc ctc gct Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala 1 5 10 15	48
gcc cag ccg gcg atg gcc atg gcc gag gtg cag ctg gcg gag tct ggg Ala Gln Pro Ala Met Ala Met Ala Glu Val Gln Leu Ala Glu Ser Gly 20 25 30	96
gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg tcc ctg aga ctc tcc tgt gcc gcc Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala 35 40 45	144
tct gga ttc acc ttt agc agc gat gcc atg agc tgg gtc cgc cag gct Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Asp Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala 50 55 60	192
cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc tca gct att agt agt ggt ggt ggt Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly 65 70 75 80	240
agc aca tac tac gca gac tcc gtg aag ggc cgg ttc acc atc tcc aga Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg 85 90 95	288
gac aat tcc aag aac acg ctg tat ctg caa atg aac agc ctg aga gcc Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala 100 105 110	336
gag gac acg gcc gta tat tac tgt gcg aaa agt aat gag ttt ctt ttt Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Ser Asn Glu Phe Leu Phe 115 120 125	384
gac tac tgg ggc cag gga act ctg gtc acc gtg tcg aga ggt gga ggc Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Arg Gly Gly Gly 130 135 140	432
ggt tca ggc gga ggt ggc tct ggc ggt ggc gga tcg tct gag ctg act Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Glu Leu Thr 145 150 155 160	480
cag gac cct gct gtg tct gtg gcc ttg gga cag aca gtc agg atc aca Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr 165 170 175	528
tgc caa gga gac agc ctc aga agc tct tat gca agc tgg tac cgg cag Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Ser Tyr Ala Ser Trp Tyr Arg Gln 180 185 190	576
agg cca gga cag gcc cct gta cct gtc atc tat ggt aag aac aac tgg Arg Pro Gly Gln Ala Pro Val Pro Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Trp 195 200 205	624
ccc tca ggg atc cca gac cgg ttc tct ggc tcc agc tca gga aac aca Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr 210 215 220	672
gct tcc ttg acc atc act ggg gct cag gcg gaa gat gag gct gac tat Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr 225 230 235 240	720

ES 2 706 409 T3

tac Tyr	tgt Cys	aac Asn	tcc Ser	tct Ser 245	tat Tyr	gcg Ala	tgg Trp	ctg Leu	ccc Pro 250	tat Tyr	gtg Val	gta Val	ttc Phe	ggc Gly 255	gga Gly	768
ggg Gly	acc Thr	aag Lys	ctg Leu 260	acc Thr	gtc Val	cta Leu	ggc Gly 265	gcg Ala	gcc Ala	gca Ala	tct Ser	tcc Ser	tca Ser 270	tcg Ser	ggt Gly	816
agt Ser	agc Ser	tct Ser 275	tcc Ser	ggc Gly	tca Ser	tcg Ser	tcc Ser 280	agc Ser	ggc Gly	atg Met	gaa Glu	atc Ile 285	gat Asp	aag Lys	tat Tyr	864
ata Ile	caa Gln 290	gga Gly	ttg Leu	gat Asp	tac Tyr	aat Asn 295	aaa Lys	aac Asn	aat Asn	gta Val	tta Leu 300	gta Val	tac Tyr	cac His	gga Gly	912
gat Asp 305	gca Ala	gtg Val	aca Thr	aat Asn	gtg Val 310	ccg Pro	cca Pro	aga Arg	aaa Lys	ggt Gly 315	tac Tyr	aaa Lys	gat Asp	gga Gly	aat Asn 320	960
gaa Glu	tat Tyr	atc Ile	gtt Val 325	gtg Val	gag Glu	aaa Lys	aag Lys	aag Lys	aaa Lys 330	tcc Ser	atc Ile	aat Asn	caa Gln	aat Asn 335	aat Asn	1008
gca Ala	gac Asp	atc Ile	caa Gln 340	gtt Val	gta Val	aat Asn	gca Ala	att Ile 345	tcg Ser	agc Ser	cta Leu	aca Thr	tat Tyr 350	cca Pro	ggt Gly	1056
gct Ala	ctc Leu	gta Val 355	aaa Lys	gcg Ala	aat Asn	tcg Ser	gaa Glu 360	tta Leu	gta Val	gaa Glu	aat Asn	caa Gln 365	cca Pro	gat Asp	gtt Val	1104
ctc Leu	cct Pro 370	gta Val	aaa Lys	cg Arg	gat Asp	tca Ser 375	tta Leu	aca Thr	ctt Leu	agc Ser	atc Ile 380	gat Asp	ttg Leu	cca Pro	gga Gly	1152
atg Met 385	act Thr	aat Asn	caa Gln	gac Asp	aat Asn 390	aaa Lys	atc Ile	gtt Val	gta Val	aaa Lys 395	aat Asn	gct Ala	act Thr	aaa Lys	tcg Ser 400	1200
aat Asn	gtt Val	aac Asn	aac Asn	gca Ala 405	gta Val	aat Asn	aca Thr	tta Leu	gtg Val 410	gaa Glu	aga Arg	tgg Trp	aat Asn	gaa Glu 415	aaa Lys	1248
tat Tyr	gct Ala	caa Gln	gct Ala 420	tat Tyr	ccg Pro	aat Asn	gta Val	agt Ser 425	gca Ala	aaa Lys	att Ile	gat Asp	tat Tyr 430	gat Asp	gac Asp	1296
gaa Glu 465	atg Met	gct Ala 435	tac Tyr	agt Ser	gaa Glu	tca Ser	caa Gln 440	tta Leu	att Ile	gca Ala	aaa Lys	ttt Phe 445	ggt Gly	act Thr	gca Ala	1344
ttt Phe	aaa Lys 450	gct Ala	gta Val	aat Asn	aat Asn	agt Ser 455	ttg Leu	aat Asn	gta Val	aac Asn	ttc Phe 460	ggc Gly	gca Ala	atc Ile	agt Ser	1392
gaa Glu 465	ggg Gly	aaa Lys	atg Met	caa Gln	gaa Glu 470	gaa Glu	gtc Val	att Ile	agt Ser	ttt Phe 475	aaa Lys	caa Gln	att Ile	tac Tyr	tat Tyr 480	1440
aac Asn	gtg Val	aat Asn	gtt Val	aat Asn 485	gaa Glu	cct Pro	aca Thr	aga Arg	cct Pro 490	tcc Ser	aga Arg	ttt Phe	ttc Phe	ggc Gly 495	aaa Lys	1488
gct Ala	gtt Val	act Thr	aaa Lys 500	gag Glu	cag Gln	ttg Leu	caa Gln	gcg Ala 505	ctt Leu	gga Gly	gta Val	aat Asn	gca Ala 510	gaa Glu	aat Asn	1536

ES 2 706 409 T3

cct cct gca tat atc tca agt gtg gca tac ggc cgt caa gtt tat ttg 1584
 Pro Pro Ala Tyr Ile Ser Ser Val Ala Tyr Gly Arg Gln Val Tyr Leu
 515 520 525

aaa tta tcg act aat tcc cat agt act aaa gta aaa gct gct ttt gat 1632
 Lys Leu Ser Thr Asn Ser His Ser Thr Lys Val Lys Ala Ala Phe Asp
 530 535 540

gct gcc gta agt ggg aaa tct gtc tca ggt gat gta gaa tta aca aat 1680
 Ala Ala Val Ser Gly Lys Ser Val Ser Gly Asp Val Glu Leu Thr Asn
 545 550 555

atc atc aaa aat tct tcc ttc aaa gcc gta att tac ggt ggt tcc gca 1728
 Ile Ile Lys Asn Ser Ser Phe Lys Ala Val Ile Tyr Gly Gly Ser Ala
 565 570

aaa gat gaa gtt caa atc atc gat ggc aac ctc gga gac tta cga gat 1776
 Lys Asp Glu Val Gln Ile Ile Asp Gly Asn Leu Gly Asp Leu Arg Asp
 580 585 590

att ttg aaa aaa ggt gct act ttt aat cga gaa aca cca gga gtt ccc 1824
 Ile Leu Lys Lys Gly Ala Thr Phe Asn Arg Glu Thr Pro Gly Val Pro
 595 600 605

att gct tat aca aca aat ttc tta aaa gac aat gaa tta gct gtt att 1872
 Ile Ala Tyr Thr Thr Asn Phe Leu Lys Asp Asn Glu Leu Ala Val Ile
 610 615 620

aaa aac aac tca gaa tat att gaa aca act tca aaa gct tat aca gat 1920
 Lys Asn Asn Ser Glu Tyr Ile Glu Thr Thr Ser Lys Ala Tyr Thr Asp
 625 630 635 640

gga aaa att aat att gat cac tct gga ggc tac gtt gct caa ttc aac 1968
 Gly Lys Ile Asn Ile Asp His Ser Gly Tyr Val Ala Gln Phe Asn
 645 650 655

atc tct tgg gat gaa ata aat tat gat cct gaa ggt aac gaa att gtt 2016
 Ile Ser Trp Asp Glu Ile Asn Tyr Asp Pro Glu Gly Asn Glu Ile Val
 660 665 670

caa cat aaa aac tgg agc gaa aac aat aaa agc aag cta gct cat ttc 2064
 Gln His Lys Asn Trp Ser Glu Asn Asn Lys Ser Lys Leu Ala His Phe
 675 680 685

aca tcg tcc atc tat ttg cca ggt aac gca aga aat att aat gtt tac 2112
 Thr Ser Ser Ile Tyr Leu Pro Gly Asn Ala Arg Asn Ile Asn Val Tyr
 690 695 700

gcc aaa gaa tgc act ggt tta gct tgg gaa tgg tgg aga acg gta att 2160
 Ala Lys Glu Cys Thr Gly Leu Ala Trp Glu Trp Trp Arg Thr Val Ile
 705 710 715 720

gat gac cgg aac tta cca ctt gtg aaa aat aga aat atc tcc atc tgg 2208
 Asp Asp Arg Asn Leu Pro Leu Val Lys Asn Arg Asn Ile Ser Ile Trp
 725 730 735

ggc act acg ctt tat ccg aaa tat agt aat agt gta gat aat cca atc 2256
 Gly Thr Thr Leu Tyr Pro Lys Tyr Ser Asn Ser Val Asp Asn Pro Ile
 740 745 750

gaa gcg gcc gca ctc gag cac cac cac cac cac cac 2292
 Glu Ala Ala Ala Leu Glu His His His His His
 755 760

<210> 22

<211> 764

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

ES 2 706 409 T3

<400> 22

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

ES 2 706 409 T3

Tyr Cys Asn Ser Ser Tyr Ala Trp Leu Pro Tyr Val Val Phe Gly Gly
 245 250 255
 Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala Ser Ser Ser Ser Gly
 260 265 270
 Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Met Glu Ile Asp Lys Tyr
 275 280 285
 Ile Gln Gly Leu Asp Tyr Asn Lys Asn Asn Val Leu Val Tyr His Gly
 290 295 300
 Asp Ala Val Thr Asn Val Pro Pro Arg Lys Gly Tyr Lys Asp Gly Asn
 305 310 315 320
 Glu Tyr Ile Val Val Glu Lys Lys Lys Lys Ser Ile Asn Gln Asn Asn
 325 330 335
 Ala Asp Ile Gln Val Val Asn Ala Ile Ser Ser Leu Thr Tyr Pro Gly
 340 345 350
 Ala Leu Val Lys Ala Asn Ser Glu Leu Val Glu Asn Gln Pro Asp Val
 355 360 365
 Leu Pro Val Lys Arg Asp Ser Leu Thr Leu Ser Ile Asp Leu Pro Gly
 370 375 380
 Met Thr Asn Gln Asp Asn Lys Ile Val Val Lys Asn Ala Thr Lys Ser
 385 390 395 400
 Asn Val Asn Asn Ala Val Asn Thr Leu Val Glu Arg Trp Asn Glu Lys
 405 410 415
 Tyr Ala Gln Ala Tyr Pro Asn Val Ser Ala Lys Ile Asp Tyr Asp Asp
 420 425 430
 Glu Met Ala Tyr Ser Glu Ser Gln Leu Ile Ala Lys Phe Gly Thr Ala
 435 440 445
 Phe Lys Ala Val Asn Asn Ser Leu Asn Val Asn Phe Gly Ala Ile Ser
 450 455 460
 Glu Gly Lys Met Gln Glu Glu Val Ile Ser Phe Lys Gln Ile Tyr Tyr
 465 470 475 480
 Asn Val Asn Val Asn Glu Pro Thr Arg Pro Ser Arg Phe Phe Gly Lys
 485 490 495
 Ala Val Thr Lys Glu Gln Leu Gln Ala Leu Gly Val Asn Ala Glu Asn
 500 505 510

ES 2 706 409 T3

Pro Pro Ala Tyr Ile Ser Ser Val Ala Tyr Gly Arg Gln Val Tyr Leu
515 520 525

Lys Leu Ser Thr Asn Ser His Ser Thr Lys Val Lys Ala Ala Phe Asp
530 535 540

Ala Ala Val Ser Gly Lys Ser Val Ser Gly Asp Val Glu Leu Thr Asn
545 550 555 560

Ile Ile Lys Asn Ser Phe Lys Ala Val Ile Tyr Gly Gly Ser Ala
565 570 575

Lys Asp Glu Val Gln Ile Ile Asp Gly Asn Leu Gly Asp Leu Arg Asp
580 585 590

Ile Leu Lys Lys Gly Ala Thr Phe Asn Arg Glu Thr Pro Gly Val Pro
595 600 605

Ile Ala Tyr Thr Thr Asn Phe Leu Lys Asp Asn Glu Leu Ala Val Ile
610 615 620

Lys Asn Asn Ser Glu Tyr Ile Glu Thr Thr Ser Lys Ala Tyr Thr Asp
625 630 635 640

Gly Lys Ile Asn Ile Asp His Ser Gly Gly Tyr Val Ala Gln Phe Asn
645 650 655

Ile Ser Trp Asp Glu Ile Asn Tyr Asp Pro Glu Gly Asn Glu Ile Val
660 665 670

Gln His Lys Asn Trp Ser Glu Asn Asn Lys Ser Lys Leu Ala His Phe
675 680 685

Thr Ser Ser Ile Tyr Leu Pro Gly Asn Ala Arg Asn Ile Asn Val Tyr
690 695 700

Ala Lys Glu Cys Thr Gly Leu Ala Trp Glu Trp Trp Arg Thr Val Ile
705 710 715 720

Asp Asp Arg Asn Leu Pro Leu Val Lys Asn Arg Asn Ile Ser Ile Trp
725 730 735

Gly Thr Thr Leu Tyr Pro Lys Tyr Ser Asn Ser Val Asp Asn Pro Ile
740 745 750

Glu Ala Ala Ala Leu Glu His His His His His His
755 760

<210> 23

<211> 1278

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> scFvDIATHIS-1:IL-2

ES 2 706 409 T3

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1278)

<400> 23

atg	aaa	tac	ctg	ctg	ccg	acg	gct	gct	gct	ggt	ctg	ctg	ctc	ctc	gct	48
Met	Lys	Tyr	Leu	Leu	Pro	Thr	Ala	Ala	Ala	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Ala	
1			5					10					15			
gcc	cag	ccg	gcg	atg	gcc	atg	gcc	gag	gtg	cag	ctg	gcg	gag	tct	ggg	96
Ala	Gln	Pro	Ala	Met	Ala	Met	Ala	Glu	Val	Gln	Leu	Ala	Glu	Ser	Gly	
			20					25					30			
gga	ggc	ttg	gta	cag	cct	ggg	ggg	tcc	ctg	aga	ctc	tcc	tgt	gcc	gcc	144
Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	
		35				40						45				
tct	gga	ttc	acc	ttt	agc	agc	gat	gcc	atg	agc	tgg	gtc	cgc	cag	gct	192
Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Asp	Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	
	50					55				60						
cca	ggg	aag	ggg	ctg	gag	tgg	gtc	tca	gct	att	agt	ggt	agt	ggt	ggt	240
Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	
65					70					75					80	
agc	aca	tac	tac	gca	gac	tcc	gtg	aag	ggc	cgg	ttc	acc	atc	tcc	aga	288
Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	
				85					90					95		
gac	aat	tcc	aag	aac	acg	ctg	tat	ctg	caa	atg	aac	agc	ctg	aga	gcc	336
Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	
			100					105					110			
gag	gac	acg	gcc	gta	tat	tac	tgt	gcg	aaa	agt	aat	gag	ttt	ctt	ttt	384
Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	Ser	Asn	Glu	Phe	Leu	Phe	
		115				120						125				
gac	tac	tgg	ggc	cag	gga	act	ctg	gtc	acc	gtg	tcg	aga	ggt	gga	ggc	432
Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Arg	Gly	Gly	Gly	
	130				135						140					
ggt	tca	ggc	gga	ggt	ggc	tct	ggc	ggt	ggc	gga	tcg	tct	gag	ctg	act	480
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ser	Glu	Leu	Thr	
145				150					155					160		
cag	gac	cct	gct	gtg	tct	gtg	gcc	ttg	gga	cag	aca	gtc	agg	atc	aca	528
Gln	Asp	Pro	Ala	Val	Ser	Val	Ala	Leu	Gly	Gln	Thr	Val	Arg	Ile	Thr	
			165					170						175		
tgc	caa	gga	gac	agc	ctc	aga	agc	tct	tat	gca	agc	tgg	tac	cgg	cag	576
Cys	Gln	Gly	Asp	Ser	Leu	Arg	Ser	Ser	Tyr	Ala	Ser	Trp	Tyr	Arg	Gln	
			180				185						190			
agg	cca	gga	cag	gcc	cct	gta	cct	gtc	atc	tat	ggt	aag	aac	aac	tgg	624
Arg	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Val	Pro	Val	Ile	Tyr	Gly	Lys	Asn	Asn	Trp	
		195			200							205				
ccc	tca	ggg	atc	cca	gac	cgg	ttc	tct	ggc	tcc	agc	tca	gga	aac	aca	672
Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	Asn	Thr	
	210				215					220						
gct	tcc	ttg	acc	atc	act	ggg	gct	cag	gcg	gaa	gat	gag	gct	gac	tat	720
Ala	Ser	Leu	Thr	Ile	Thr	Gly	Ala	Gln	Ala	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	

ES 2 706 409 T3

225		230		235		240														
tac	tgt	aac	tcc	tct	tat	gcg	tgg	ctg	ccc	tat	gtg	gta	ttc	ggc	gga					768
Tyr	Cys	Asn	Ser	Ser	Tyr	Ala	Trp	Leu	Pro	Tyr	Val	Val	Phe	Gly	Gly					
				245					250					255						
ggg	acc	aag	ctg	acc	gtc	cta	ggc	gcg	gcc	gca	tct	tcc	tca	tcg	ggt					816
Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Ala	Ala	Ala	Ser	Ser	Ser	Ser	Gly					
			260				265						270							
agt	agc	tct	tcc	ggc	tca	tcg	tcc	agc	ggc	gca	cct	act	tca	agt	tct					864
Ser	Ser	Ser	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Ser	Gly	Ala	Pro	Thr	Ser	Ser	Ser					
		275					280					285								
aca	aag	aaa	aca	cag	cta	caa	ctg	gag	cat	tta	ctg	ctg	gat	tta	cag					912
Thr	Lys	Lys	Thr	Gln	Leu	Gln	Leu	Glu	His	Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Gln					
		290				295					300									
atg	att	ttg	aat	gga	att	aat	aat	tac	aag	aat	ccc	aaa	ctc	acc	agg					960
Met	Ile	Leu	Asn	Gly	Ile	Asn	Asn	Tyr	Lys	Asn	Pro	Lys	Leu	Thr	Arg					
				305		310				315					320					
atg	ctc	aca	ttt	aag	ttt	tac	atg	ccc	aag	aag	gcc	aca	gaa	ctg	aaa					1008
Met	Leu	Thr	Phe	Lys	Phe	Tyr	Met	Pro	Lys	Lys	Ala	Thr	Glu	Leu	Lys					
				325					330					335						
cat	ctt	cag	tgt	cta	gaa	gaa	gaa	ctc	aaa	cct	ctg	gag	gaa	gtg	cta					1056
His	Leu	Gln	Cys	Leu	Glu	Glu	Glu	Leu	Lys	Pro	Leu	Glu	Glu	Val	Leu					
			340					345					350							
aat	tta	gct	caa	agc	aaa	aac	ttt	cac	tta	aga	ccc	agg	gac	tta	atc					1104
Asn	Leu	Ala	Gln	Ser	Lys	Asn	Phe	His	Leu	Arg	Pro	Arg	Asp	Leu	Ile					
		355					360					365								
agc	aat	atc	aac	gta	ata	gtt	ctg	gaa	cta	aag	gga	tct	gaa	aca	aca					1152
Ser	Asn	Ile	Asn	Val	Ile	Val	Leu	Glu	Leu	Lys	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr					
		370				375					380									
ttc	atg	tgt	gaa	tat	gct	gat	gag	aca	gca	acc	att	gta	gaa	ttt	ctg					1200
Phe	Met	Cys	Glu	Tyr	Ala	Asp	Glu	Thr	Ala	Thr	Ile	Val	Glu	Phe	Leu					
					390					395					400					
aac	aga	tgg	att	acc	ttt	tgt	caa	agc	atc	atc	tca	aca	ctg	act	gcg					1248
Asn	Arg	Trp	Ile	Thr	Phe	Cys	Gln	Ser	Ile	Ile	Ser	Thr	Leu	Thr	Ala					
				405					410					415						
gcc	gca	ctc	gag	cac	cac	cac	cac	cac	cac											1278
Ala	Ala	Leu	Glu	His	His	His	His	His	His											
			420					425												

<210> 24

<211> 426

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 24

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala Met Ala Glu Val Gln Leu Ala Glu Ser Gly
20 25 30

ES 2 706 409 T3

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

ES 2 706 409 T3

Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg
 305 310 315 320

Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys
 325 330 335

His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu
 340 345 350

Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile
 355 360 365

Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr
 370 375 380

Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu
 385 390 400

Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr Ala
 405 410 415

Ala Ala Leu Glu His His His His His His
 420 425

REIVINDICACIONES

1. Proteína de fusión comprendiendo un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) específico para cada uno del antígeno carcinoembrionario (CEA) y la molécula de adhesión celular asociada a CEA 1 (CEACAM1), y una secuencia líder, comprendiendo dicha secuencia líder la totalidad, o al menos 18 de los 22 aminoácidos, de la secuencia líder Pel B de *E. coli*, donde la porción scFV comprende la secuencia de aminoácidos de la porción V_H y V_L de la SEQ ID N.º 2 o donde la porción scFV comprende la secuencia de aminoácidos de la porción V_H y V_L de la SEQ ID N.º 2 con el Trp en la posición 208 mutado a Arg.
2. Proteína de fusión de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, comprendiendo la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 2.
3. Proteína de fusión de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, donde la secuencia líder es escindible de dicha proteína de fusión mediante la peptidasa Pel B de *E. coli* y/o donde se conserva la funcionalidad de la secuencia líder.
4. Proteína de fusión de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, comprendiendo además una etiqueta, preferiblemente donde la etiqueta comprende cualquiera o varios de los componentes, Asp3SerAsp3 (D3SD3), FLAG e His6.
5. Proteína de fusión de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que está radiomarcada, por ejemplo, mediante radioyodación.
6. Proteína de fusión de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, comprendiendo además un efector que es vpr de VIH1, listeriolisina O delta PEST (LLOΔPEST), citosina desaminasa de levadura (YCD), ubiquitina; o IL2.
7. Proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 6, donde se presenta una secuencia de enlace entre dicho scFv y dicho efector, y donde dicho efector está en dirección 3' de dicho scFv.
8. Proteína de fusión de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, donde dicho scFv consiste en una cadena V_H, una cadena V_L, y un conector, enlazando dicho conector tales cadenas V_H y V_L, preferiblemente donde dicho conector consta, incluso, de entre 5 y 15 residuos de aminoácidos de longitud.
9. Proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 8, donde dicho conector incluye una o más unidades de GGGGS o donde dicho conector incluye una, dos o tres unidades de GGGGS.
10. Secuencia de ácido nucleico, preferiblemente ADN, que codifica una proteína de fusión definida en cualquier reivindicación anterior.
11. Secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 10, comprendiendo la secuencia de la SEQ ID N.º 1.
12. Secuencia de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, incorporada en un plásmido de expresión adecuado, tal como el vector pET22b(+).
13. Vector de acuerdo con la reivindicación 12, comprendiendo el promotor del bacteriófago T7 en relación operativa con la secuencia codificante de ácido nucleico.
14. Proceso para preparar una proteína de fusión según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, comprendiendo dicho proceso transformar el hospedador con un vector de expresión destinado a ello, cultivar el hospedador en condiciones permisivas hasta una densidad óptica (DO) suficientemente elevada y recoger y romper las células, por ejemplo, mediante sonicación u homogeneización, y recoger la proteína de fusión como cuerpos de inclusión en el hospedador.
15. Proceso de acuerdo con la reivindicación 14, donde el proceso comprende además
 - a. aplicar sobrenadante que contenga los cuerpos de inclusión en una columna de cromatografía cargada con resina de flujo rápido DEAE, y eluida con tampón salino para volver a plegar la proteína de fusión;
 - b. someter el eluyente a cromatografía IMAC y eluir con un tampón salino y diluir el eluyente con un tampón sin sal; y
 - c. cargar el eluyente diluido en una resina de flujo rápido Sepharose en una columna, y eluir con un tampón salino,
 preferiblemente donde el tampón salino final es de aproximadamente 0,2 M, de aproximadamente 0,5 M, o de aproximadamente 0,2 M y a continuación de aproximadamente 0,5 M.



Fig. 1

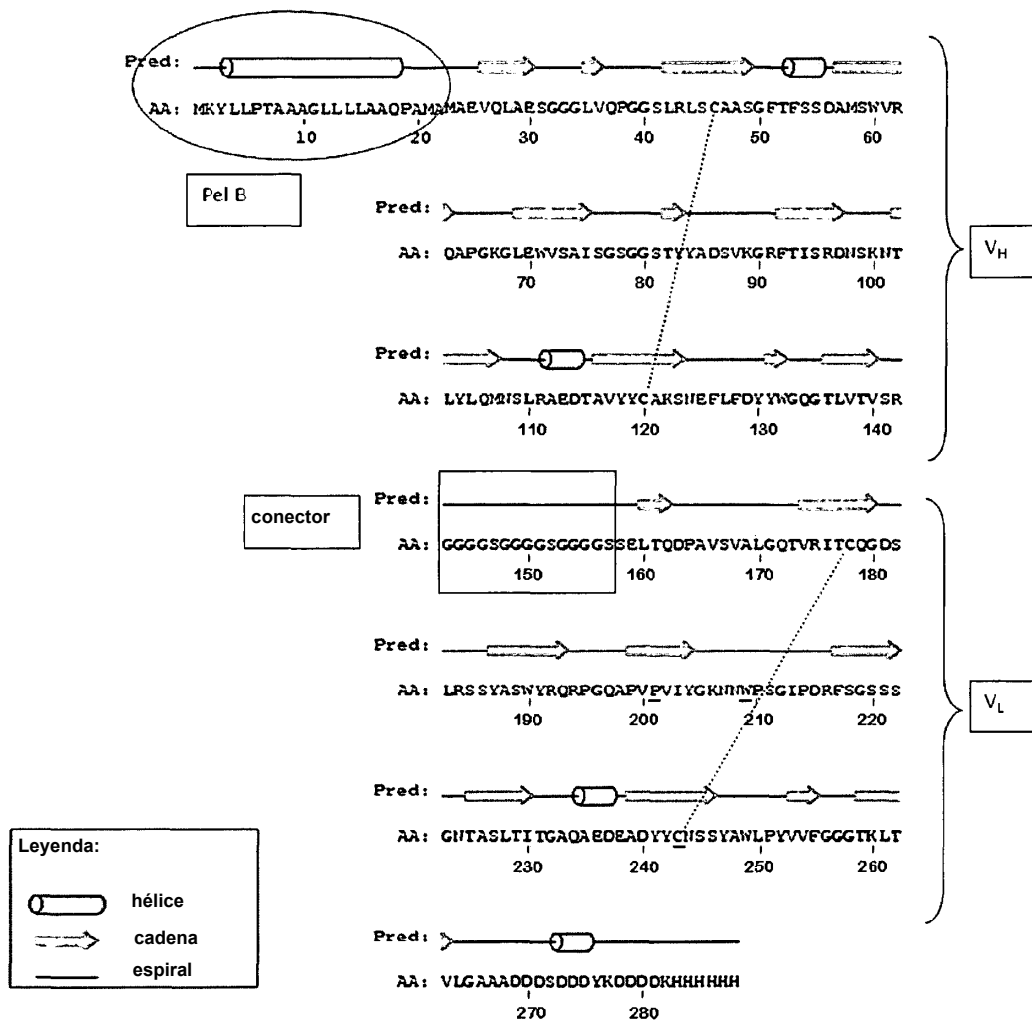


Fig. 2

Diagrama de flujo de procesos en dirección 5'

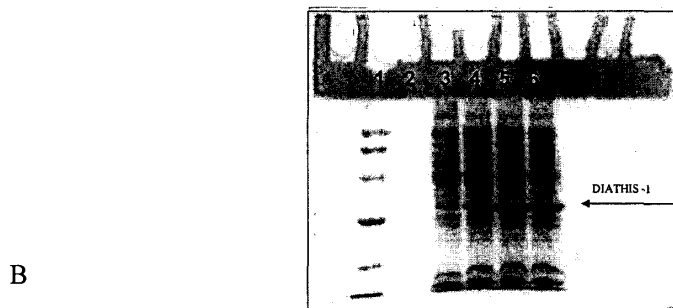
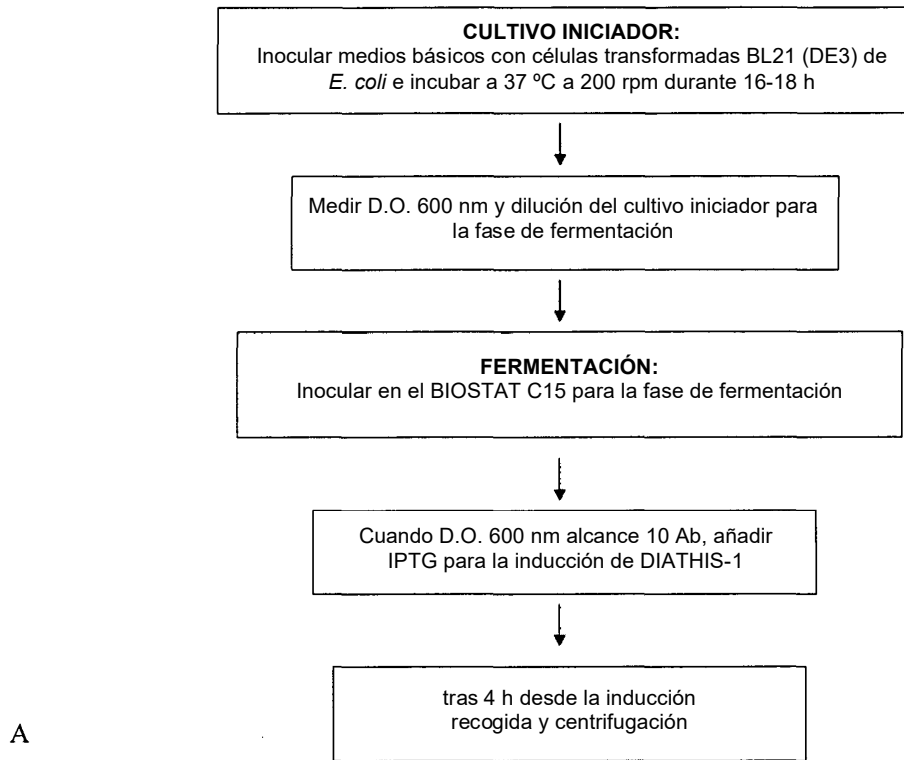


Fig. 3

Diagrama de flujo de procesos en dirección 3'

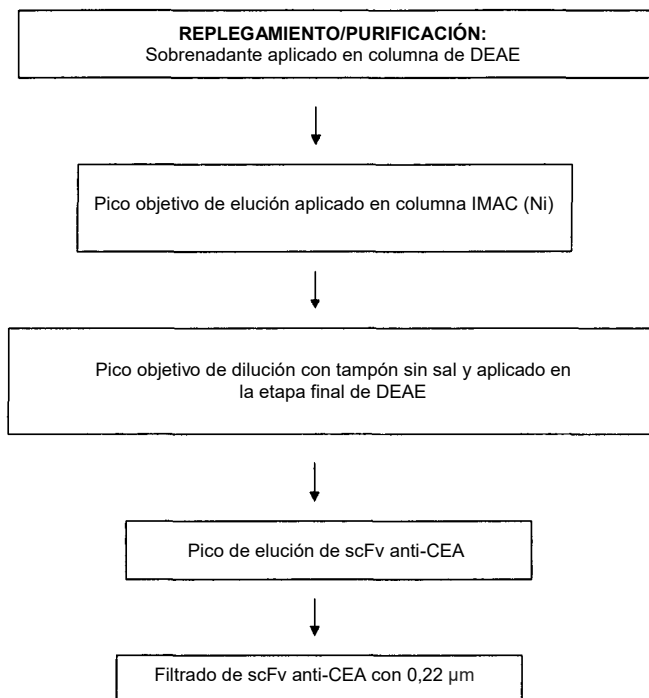


Fig. 4

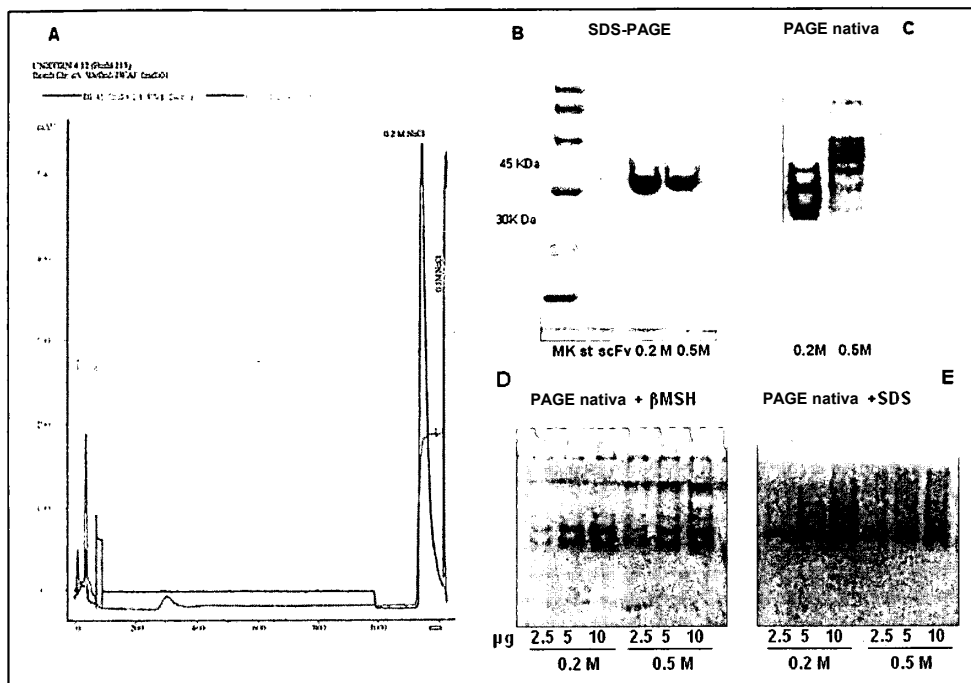


Fig. 5

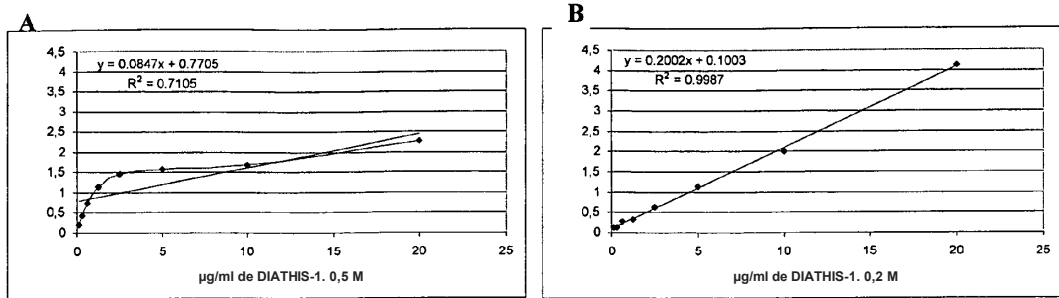


Fig. 6

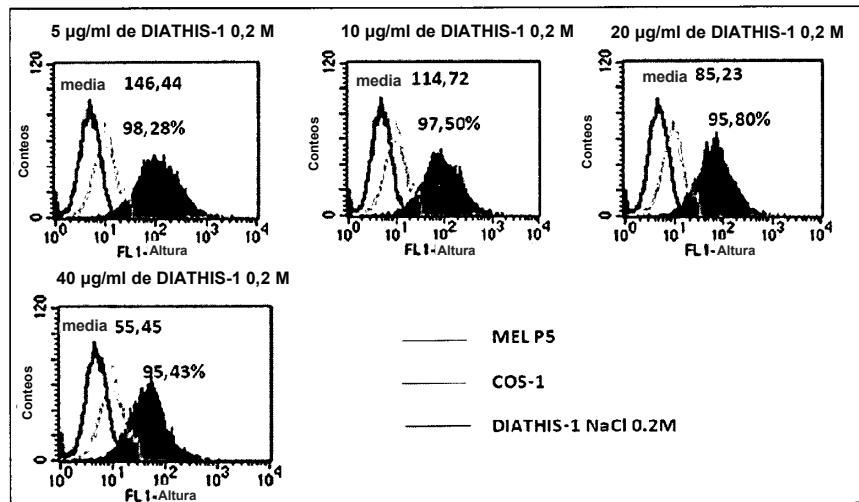


Fig. 7

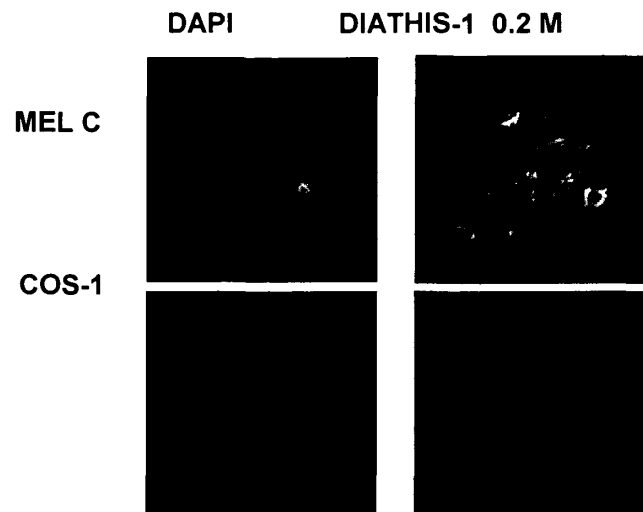
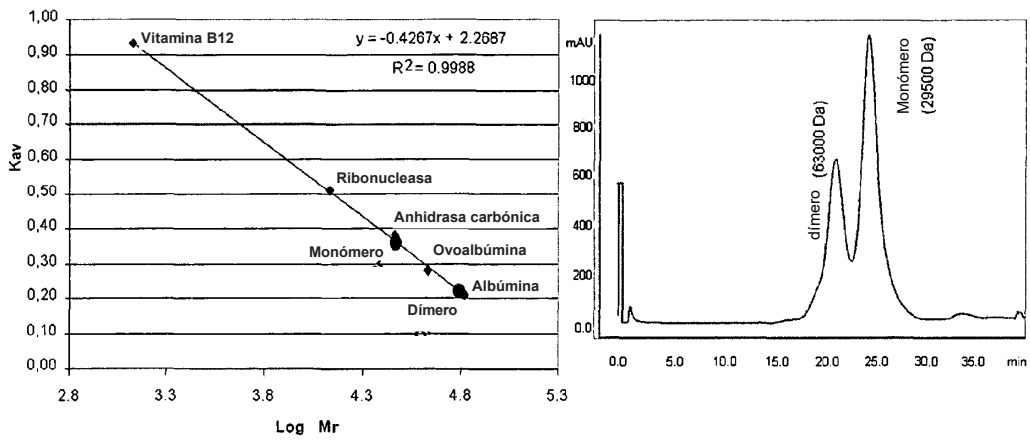


Fig. 8

DIATHIS1 0,2M NaCl



DIATHIS1 sin PeIB 0.2M NaCl

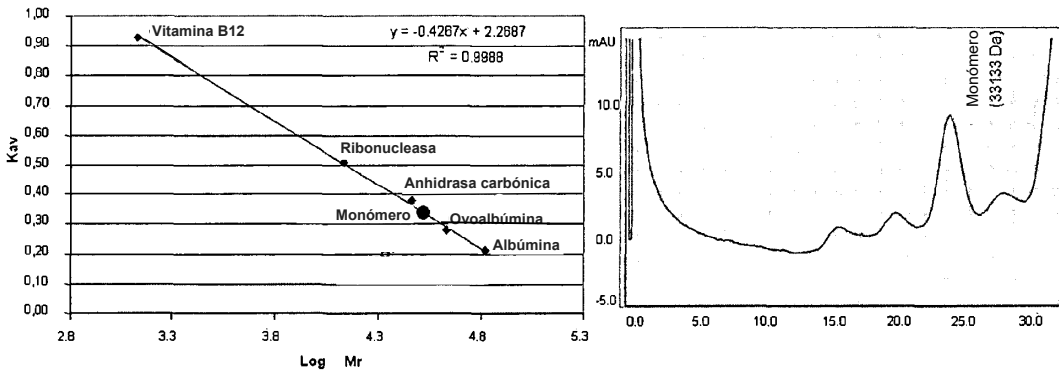


Fig. 9

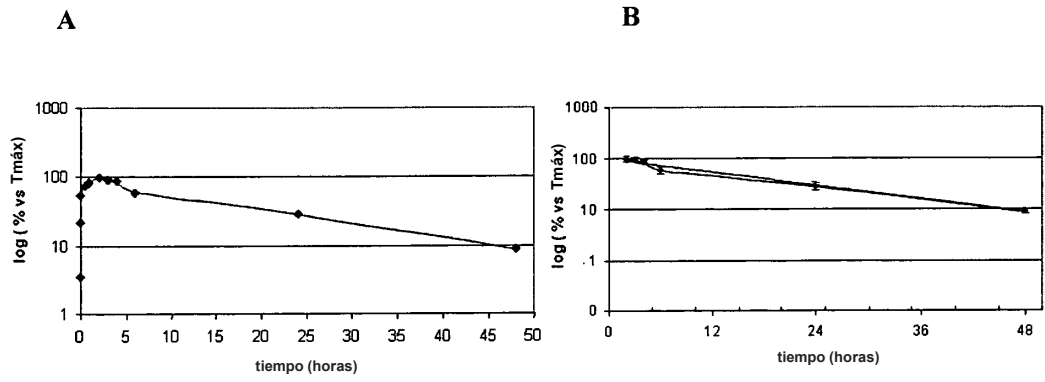


Fig. 10

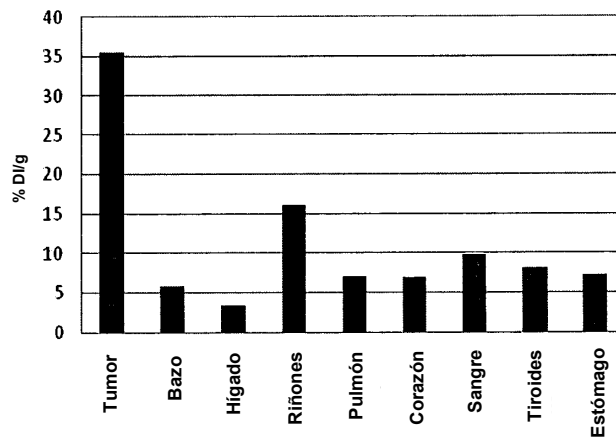


Fig. 11

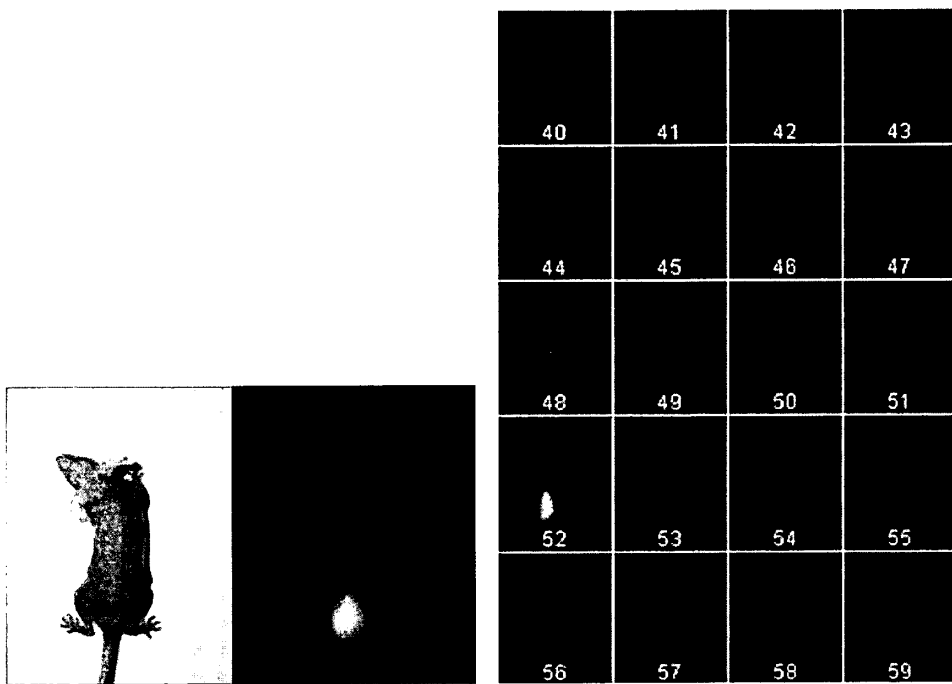


Fig. 12

scFv DIATHIS-1:ubiquitina



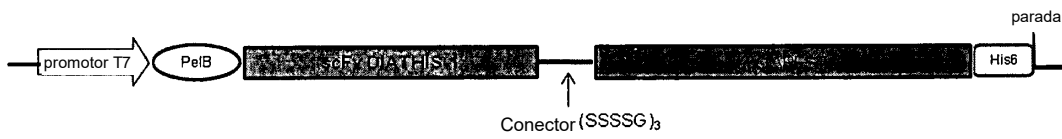
scFv DIATHIS-1: vpr de VIH-1



scFv DIATHIS-1: citosina desaminasa de levadura (YCD)



scFv DIATHIS-1:listeriolisina-O (LLO) delta PEST



scFv DIATHIS-1:interleucina 2 (IL-2)



Fig. 13

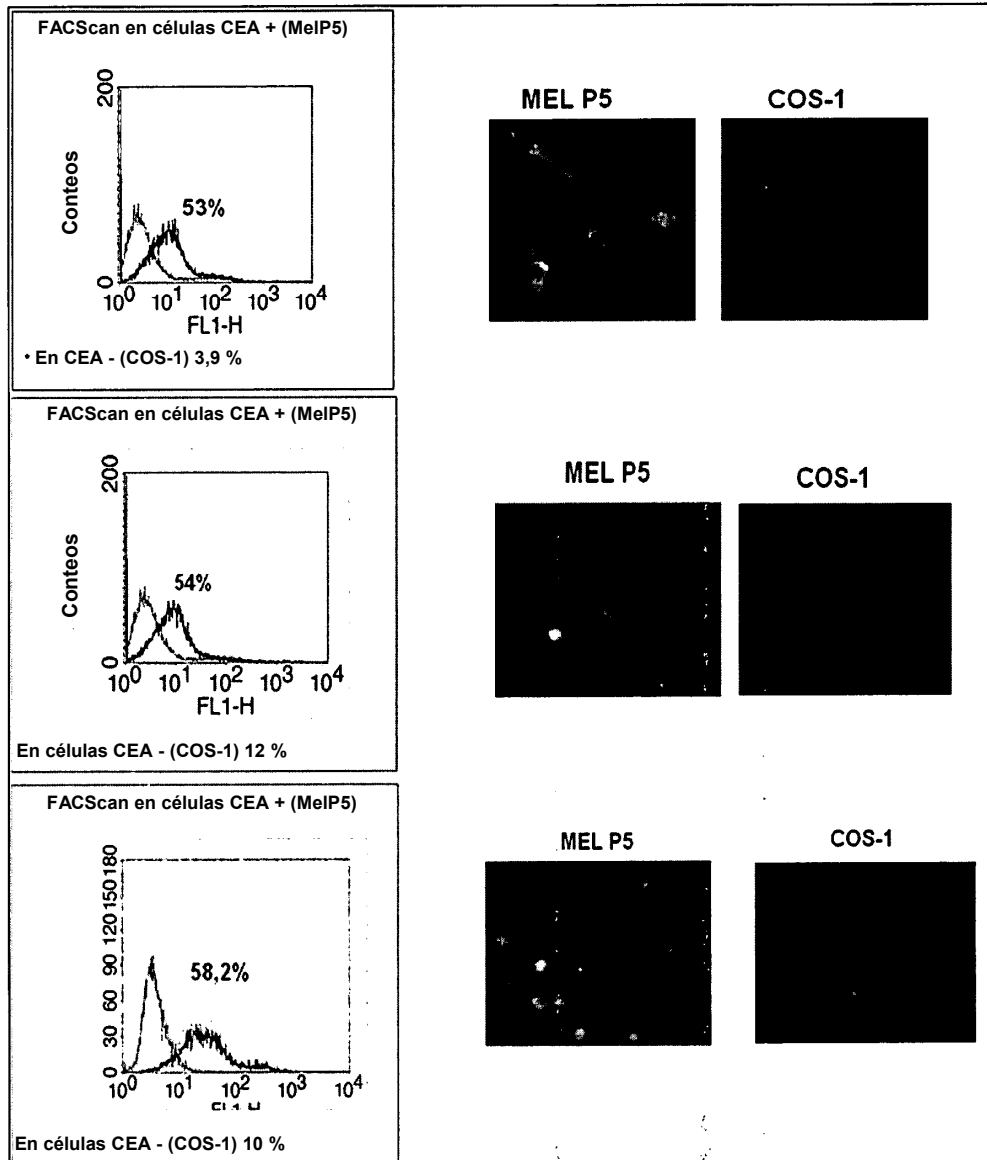


Fig. 14

scFvDIATHIS-1:

secuencia líder Pel B

1 ATG AAA TAC CTG CTG CCG ACG GCT GCT GCT GGT CTG CTG CTC CTC
GCT GCC CAG CCG GCG 60

1 Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu
Ala Ala Gln Pro Ala 20

61 ATG GCC 66

21 Met Ala 22

VH

67 ATG GCC GAG GTG CAG CTG GCG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG
CCT GGG GGG TCC CTG 126

23 Met Ala Glu Val Gln Leu Ala Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
Pro Gly Gly Ser Leu 42

127 AGA CTC TCC TGT GCC GCC TCT GGA TTC ACC TTT AGC AGC GAT GCC
ATG AGC TGG GTC CGC 186

43 Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Asp Ala
Met Ser Trp Val Arg 62

187 CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTC TCA GCT ATT AGT GGT
AGT GGT GGT AGC ACA 246

63 Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly
Ser Gly Gly Ser Thr 82

247 TAC TAC GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGG TTC ACC ATC TCC AGA GAC
AAT TCC AAG AAC ACG 306

83 Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
Asn Ser Lys Asn Thr 102

307 CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCC GTA
TAT TAC TGT GCG AAA 366

103 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
Tyr Tyr Cys Ala Lys 122

367 AGT AAT GAG TTT CTT TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACT CTG GTC
ACC GTG TCG AGA 423

123 Ser Asn Glu Phe Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
Thr Val Ser Arg 141

Conector:

424 GGT GGA GGC GGT TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG
468

142 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
156

VL

469 TCT GAG CTG ACT CAG GAC CCT GCT GTG TCT GTG GCC TTG GGA CAG
ACA GTC AGG ATC ACA 528

157 Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
 Thr Val Arg Ile Thr 176

529 TGC CAA GGA GAC AGC CTC AGA AGC TCT TAT GCA AGC TGG TAC CGG
 CAG AGG CCA GGA CAG 588

177 Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Ser Tyr Ala Ser Trp Tyr Arg
 Gln Arg Pro Gly Gln 196

589 GCC *CCT GTA CCT GTC ATC TAT GGT AAG AAC AAC *TGG CCC TCA GGG
 ATC CCA GAC CGG TTC 648

197 Ala *Pro Val Pro Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn *Trp Pro Ser Gly
 Ile Pro Asp Arg Phe 216

649 TCT GGC TCC AGC TCA GGA AAC ACA GCT TCC TTG ACC ATC ACT GGG
 GCT CAG GCG GAA GAT 708

217 Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly
 Ala Gln Ala Glu Asp 236

709 GAG GCT GAC TAT TAC *TGT AAC TCC TCT TAT GCG TGG CTG CCC TAT
 GTG GTA TTC GGC GGA 768

237 Glu Ala Asp Tyr Tyr *Cys Asn Ser Ser Tyr Ala Trp Leu Pro Tyr
 Val Val Phe Gly Gly 256

769 GGG ACC AAG CTG ACC GTC CTA GGC GCG GCC GCA 801

257 Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala 267

Etiqueta D3SD3-FLAG-His6

802 GAT GAC GAT TCC GAC GAC GAT GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAC AAG
 CAC CAT CAC CAT CAC 861

268 Asp Asp Asp Ser Asp Asp Asp Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 His His His His His 287

862 CAT 864

288 His 288

Fig. 15

scFvDIATHIS-1: ubiquitina

secuencia líder Pel B

1 ATG AAA TAC CTG CTG CCG ACG GCT GCT GCT GGT CTG CTG CTC CTC
GCT GCC CAG CCG GCG 60

1 Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu
Ala Ala Gln Pro Ala 20

61 ATG GCC 66

21 Met Ala 22

VH

67 ATG GCC GAG GTG CAG CTG GCG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG
CCT GGG GGG TCC CTG 126

23 Met Ala Glu Val Gln Leu Ala Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
Pro Gly Gly Ser Leu 42

127 AGA CTC TCC TGT GCC GCC TCT GGA TTC ACC TTT AGC AGC GAT GCC
ATG AGC TGG GTC CGC 186

43 Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Asp Ala
Met Ser Trp Val Arg 62

187 CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTC TCA GCT ATT AGT GGT
AGT GGT GGT AGC ACA 246

63 Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly
Ser Gly Gly Ser Thr 82

247 TAC TAC GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGG TTC ACC ATC TCC AGA GAC
AAT TCC AAG AAC ACG 306

83 Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
Asn Ser Lys Asn Thr 102

307 CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCC GTA
TAT TAC TGT GCG AAA 366

103 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
Tyr Tyr Cys Ala Lys 122

367 AGT AAT GAG TTT CTT TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACT CTG GTC
ACC GTG TCG AGA 423

123 Ser Asn Glu Phe Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
Thr Val Ser Arg 141

Conector:

424 GGT GGA GGC GGT TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG
468

142 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
156

VL

469 TCT GAG CTG ACT CAG GAC CCT GCT GTG TCT GTG GCC TTG GGA CAG
ACA GTC AGG ATC ACA 528

157 Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
Thr Val Arg Ile Thr 176

529 TGC CAA GGA GAC AGC CTC AGA AGC TCT TAT GCA AGC TGG TAC CGG
 CAG AGG CCA GGA CAG 588
 177 Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Ser Tyr Ala Ser Trp Tyr Arg
 Gln Arg Pro Gly Gln 196

589 GCC *CCT GTA CCT GTC ATC TAT GGT AAG AAC AAC *TGG CCC TCA GGG
 ATC CCA GAC CGG TTC 648
 197 Ala *Pro Val Pro Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn *Trp Pro Ser Gly
 Ile Pro Asp Arg Phe 216

649 TCT GGC TCC AGC TCA GGA AAC ACA GCT TCC TTG ACC ATC ACT GGG
 GCT CAG GCG GAA GAT 708
 217 Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly
 Ala Gln Ala Glu Asp 236

709 GAG GCT GAC TAT TAC *TGT AAC TCC TCT TAT GCG TGG CTG CCC TAT
 GTG GTA TTC GGC GGA 768
 237 Glu Ala Asp Tyr Tyr *Cys Asn Ser Ser Tyr Ala Trp Leu Pro Tyr
 Val Val Phe Gly Gly 256

769 GGG ACC AAG CTG ACC GTC CTA GGC GCG GCC GCA 801
 257 Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala 267

Ubiquitina:

802 ATG CAG ATC TTC GTC AAG ACG TTA ACC GGT AAA ACC ATA ACT CTA
 GAA GTT GAA CCA TCC 861
 268 Met Gln Ile Phe Val Lys Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu
 Glu Val Glu Pro Ser 287

862 GAT ACC ATC GAA AAC GTT AAG GCT AAA ATT CAA GAC AAG GAA GGC
 ATT CCA CCT GAT CAA 921
 288 Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp Lys Glu Gly
 Ile Pro Pro Asp Gln 307

922 CAA AGA TTG ATC TTT GCC GGT AAG CAG CTC GAG GAC GGT AGA ACG
 CTG TCT GAT TAC AAC 981
 308 Gln Arg Leu Ile Phe Ala Gly Lys Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr
 Leu Ser Asp Tyr Asn 327

982 ATT CAG AAG GAG TCG ACC TTA CAT CTT GTC TTA AGA CTA AGA GGT
 GCG GCC GCA CTC GAG 1041
 328 Ile Gln Lys Glu Ser Thr Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly
 Ala Ala Ala Leu Glu 347

Etiqueta His 6:

1042 CAC CAC CAC CAC CAC CAC 1059
 348 His His His His His His 353

Fig. 16

scFvDIATHIS-1:vpr de VIH

secuencia líder Pel B

1 ATG AAA TAC CTG CTG CCG ACG GCT GCT GCT GGT CTG CTG CTC CTC
GCT GCC CAG CCG GCG 60

1 Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu
Ala Ala Gln Pro Ala 20

61 ATG GCC 66

21 Met Ala 22

VH

67 ATG GCC GAG GTG CAG CTG GCG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG
CCT GGG GGG TCC CTG 126

23 Met Ala Glu Val Gln Leu Ala Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
Pro Gly Gly Ser Leu 42

127 AGA CTC TCC TGT GCC GCC TCT GGA TTC ACC TTT AGC AGC GAT GCC
ATG AGC TGG GTC CGC 186

43 Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Asp Ala
Met Ser Trp Val Arg 62

187 CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTC TCA GCT ATT AGT GGT
AGT GGT GGT AGC ACA 246

63 Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly
Ser Gly Gly Ser Thr 82

247 TAC TAC GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGG TTC ACC ATC TCC AGA GAC
AAT TCC AAG AAC ACG 306

83 Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
Asn Ser Lys Asn Thr 102

307 CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCC GTA
TAT TAC TGT GCG AAA 366

103 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
Tyr Tyr Cys Ala Lys 122

367 AGT AAT GAG TTT CTT TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACT CTG GTC
ACC GTG TCG AGA 423

123 Ser Asn Glu Phe Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
Thr Val Ser Arg 141

Conector:

424 GGT GGA GGC GGT TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG
468

142 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
156

VL

469 TCT GAG CTG ACT CAG GAC CCT GCT GTG TCT GTG GCC TTG GGA CAG
ACA GTC AGG ATC ACA 528

157 Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
Thr Val Arg Ile Thr 176

ES 2 706 409 T3

529 TGC CAA GGA GAC AGC CTC AGA AGC TCT TAT GCA AGC TGG TAC CGG
 CAG AGG CCA GGA CAG 588
 177 Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Ser Tyr Ala Ser Trp Tyr Arg
 Gln Arg Pro Gly Gln 196

589 GCC *CCT GTA CCT GTC ATC TAT GGT AAG AAC AAC *TGG CCC TCA GGG
 ATC CCA GAC CGG TTC 648
 197 Ala *Pro Val Pro Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn *Trp Pro Ser Gly
 Ile Pro Asp Arg Phe 216

649 TCT GGC TCC AGC TCA GGA AAC ACA GCT TCC TTG ACC ATC ACT GGG
 GCT CAG GCG GAA GAT 708
 217 Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly
 Ala Gln Ala Glu Asp 236

709 GAG GCT GAC TAT TAC *TGT AAC TCC TCT TAT GCG TGG CTG CCC TAT
 GTG GTA TTC GGC GGA 768
 237 Glu Ala Asp Tyr Tyr *Cys Asn Ser Ser Tyr Ala Trp Leu Pro Tyr
 Val Val Phe Gly Gly 256

769 GGG ACC AAG CTG ACC GTC CTA GGC GCG GCC GCA 801
 257 Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala 267

Conector:

802 TCT TCC TCA TCG GGT AGT AGC TCT TCC GGC 831
 268 Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly 277

vpr de VIH

832 ATG GAA CAA GCC CCA GAA GAC CAA GGG CCA CAG AGG GAG CCA CAC
 AAT GAA TGG ACA CTA 891
 278 Met Glu Gln Ala Pro Glu Asp Gln Gly Pro Gln Arg Glu Pro His
 Asn Glu Trp Thr Leu 297

892 GAG CTT TTA GAG GAG CTT AAG AAT GAA GCT GTT AGA CAT TTT CCT
 AGG ATT TGG CTC CAT 951
 298 Glu Leu Leu Glu Glu Leu Lys Asn Glu Ala Val Arg His Phe Pro
 Arg Ile Trp Leu His 317

852 GGC TTA GGG CAA CAT ATC TAT GAA ACT TAT GGG GAT ACT TGG GCA
 GGA GTG GAA GCC ATA 1011
 318 Gly Leu Gly Gln His Ile Tyr Glu Thr Tyr Gly Asp Thr Trp Ala
 Gly Val Glu Ala Ile 337

1012 ATA AGA ATT CTG CAA CAA CTG CTG TTT ATC CAT TTC AGA ATT GGG
 TGT CGA CAT AGC AGA 1071
 338 Ile Arg Ile Leu Gln Gln Leu Leu Phe Ile His Phe Arg Ile Gly
 Cys Arg His Ser Arg 357

1072 ATA GGC GTT ACT CAA CAG AGG AGA GCA AGA AAT GGA GCC AGT AGA
 TCC GCG GCC GCA CTC 1131
 358 Ile Gly Val Thr Gln Gln Arg Arg Ala Arg Asn Gly Ala Ser Arg
 Ser Ala Ala Ala Leu 377

1132 GAG 1134
 378 Glu 378
His6
 1135 CAC CAC CAC CAC CAC CAC 1152
 379 His His His His His His 384

Fig. 17

scFvDIATHIS-1:YCD

secuencia líder PeI B

1 ATG AAA TAC CTG CTG CCG ACG GCT GCT GCT GGT CTG CTG CTC CTC
 GCT GCC CAG CCG GCG 60

1 Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu
 Ala Ala Gln Pro Ala 20

61 ATG GCC 66

21 Met Ala 22

VH

67 ATG GCC GAG GTG CAG CTG GCG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG
 CCT GGG GGG TCC CTG 126

23 Met Ala Glu Val Gln Leu Ala Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 Pro Gly Gly Ser Leu 42

127 AGA CTC TCC TGT GCC GCC TCT GGA TTC ACC TTT AGC AGC GAT GCC
 ATG AGC TGG GTC CGC 186

43 Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Asp Ala
 Met Ser Trp Val Arg 62

187 CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTC TCA GCT ATT AGT GGT
 AGT GGT GGT AGC ACA 246

63 Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly
 Ser Gly Gly Ser Thr 82

247 TAC TAC GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGG TTC ACC ATC TCC AGA GAC
 AAT TCC AAG AAC ACG 306

83 Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 Asn Ser Lys Asn Thr 102

307 CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCC GTA
 TAT TAC TGT GCG AAA 366

103 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 Tyr Tyr Cys Ala Lys 122

367 AGT AAT GAG TTT CTT TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACT CTG GTC
 ACC GTG TCG AGA 423

123 Ser Asn Glu Phe Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 Thr Val Ser Arg 141

Conector:

424 GGT GGA GGC GGT TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG
 468
 142 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 156

VL

469 TCT GAG CTG ACT CAG GAC CCT GCT GTG TCT GTG GCC TTG GGA CAG
 ACA GTC AGG ATC ACA 528
 157 Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
 Thr Val Arg Ile Thr 176

529 TGC CAA GGA GAC AGC CTC AGA AGC TCT TAT GCA AGC TGG TAC CGG
 CAG AGG CCA GGA CAG 588
 177 Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Ser Tyr Ala Ser Trp Tyr Arg
 Gln Arg Pro Gly Gln 196

589 GCC *CCT GTA CCT GTC ATC TAT GGT AAG AAC AAC *TGG CCC TCA GGG
 ATC CCA GAC CGG TTC 648
 197 Ala *Pro Val Pro Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn *Trp Pro Ser Gly
 Ile Pro Asp Arg Phe 216

649 TCT GGC TCC AGC TCA GGA AAC ACA GCT TCC TTG ACC ATC ACT GGG
 GCT CAG GCG GAA GAT 708
 217 Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly
 Ala Gln Ala Glu Asp 236

709 GAG GCT GAC TAT TAC *TGT AAC TCC TCT TAT GCG TGG CTG CCC TAT
 GTG GTA TTC GGC GGA 768
 237 Glu Ala Asp Tyr Tyr *Cys Asn Ser Ser Tyr Ala Trp Leu Pro Tyr
 Val Val Phe Gly Gly 256

769 GGG ACC AAG CTG ACC GTC CTA GGC GCG GCC GCA 801
 257 Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala 267

Conector

802 TCT TCC TCA TCG GGT AGT AGC TCT TCC GGC TCA TCG TCC AGC GGC
 846
 268 Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly
 282

YCD

847 ATG GTG ACA GGG GGA ATG GCA AGC AAG TGG GAT CAG AAA GGC ATG
 GAC ATT GCC TAT GAA 906
 283 Met Val Thr Gly Gly Met Ala Ser Lys Trp Asp Gln Lys Gly Met
 Asp Ile Ala Tyr Glu 302

907 GAG GCC GCA CTG GGC TAC AAA GAA GGC GGT GTG CCG ATT GGC GGT
 TGT CTG ATC AAT AAC 966
 303 Glu Ala Ala Leu Gly Tyr Lys Glu Gly Gly Val Pro Ile Gly Gly
 Cys Leu Ile Asn Asn 322

967 AAA GAC GGC TCC GTG CTG GGC CGT GGG CAC AAC ATG CGC TTC CAG
 AAA GGC AGC GCC ACC 1026
 323 Lys Asp Gly Ser Val Leu Gly Arg Gly His Asn Met Arg Phe Gln
 Lys Gly Ser Ala Thr 342

1027 CTG CAC GGC GAA ATC TCC ACC CTG GAA AAC TGC GGG CGT CTC GAG
 GGC AAA GTG TAC AAA 1086
 343 Leu His Gly Glu Ile Ser Thr Leu Glu Asn Cys Gly Arg Leu Glu
 Gly Lys Val Tyr Lys 362

1087 GAT ACC ACC CTG TAT ACG ACC CTG AGC CCG TGC GAC ATG TGT ACG
 GGC GCC ATC ATC ATG 1146
 363 Asp Thr Thr Leu Tyr Thr Thr Leu Ser Pro Cys Asp Met Cys Thr
 Gly Ala Ile Ile Met 382

1147 TAC GGC ATT CCA CGC TGC GTG GTC GGC GAA AAC GTG AAT TTC AAA
 TCC AAG GGC GAG AAA 1206
 383 Tyr Gly Ile Pro Arg Cys Val Val Gly Glu Asn Val Asn Phe Lys
 Ser Lys Gly Glu Lys 402

1207 TAC CTG CAG ACC CGC GGC CAC GAA GTG GTC GTG GTG GAC GAT GAA
 CGC TGC AAA AAG ATC 1266
 403 Tyr Leu Gln Thr Arg Gly His Glu Val Val Val Val Asp Asp Glu
 Arg Cys Lys Lys Ile 422

1267 ATG AAA CAG TTC ATC GAT GAG CGT CCA CAG GAT TGG TTT GAA GAT
 ATT CCT GAG GCG GCC 1326
 423 Met Lys Gln Phe Ile Asp Glu Arg Pro Gln Asp Trp Phe Glu Asp
 Ile Pro Glu Ala Ala 442

1327 GCA CTC GAG 1335
 443 Ala Leu Glu 445

His6
 1336 CAC CAC CAC CAC CAC CAC 1353
 446 His His His His His His 451

Fig. 18

scFvDIATHIS-1:LLOAPEST

secuencia líder PeI B

1 ATG AAA TAC CTG CTG CCG ACG GCT GCT GCT GGT CTG CTG CTC CTC
 GCT GCC CAG CCG GCG 60

1 Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu
 Ala Ala Gln Pro Ala 20

61 ATG GCC 66

21 Met Ala 22

VH

67 ATG GCC GAG GTG CAG CTG GCG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG
 CCT GGG GGG TCC CTG 126

23 Met Ala Glu Val Gln Leu Ala Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 Pro Gly Gly Ser Leu 42

ES 2 706 409 T3

127 AGA CTC TCC TGT GCC GCC TCT GGA TTC ACC TTT AGC AGC GAT GCC
 ATG AGC TGG GTC CGC 186
 43 Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Asp Ala
 Met Ser Trp Val Arg 62

187 CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTC TCA GCT ATT AGT GGT
 AGT GGT GGT AGC ACA 246
 63 Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly
 Ser Gly Gly Ser Thr 82

247 TAC TAC GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGG TTC ACC ATC TCC AGA GAC
 AAT TCC AAG AAC ACG 306
 83 Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 Asn Ser Lys Asn Thr 102

307 CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCC GTA
 TAT TAC TGT GCG AAA 366
 103 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 Tyr Tyr Cys Ala Lys 122

367 AGT AAT GAG TTT CTT TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACT CTG GTC
 ACC GTG TCG AGA 423
 123 Ser Asn Glu Phe Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 Thr Val Ser Arg 141

Conector:

424 GGT GGA GGC GGT TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG
 468
 142 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 156

VL

469 TCT GAG CTG ACT CAG GAC CCT GCT GTG TCT GTG GCC TTG GGA CAG
 ACA GTC AGG ATC ACA 528
 157 Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
 Thr Val Arg Ile Thr 176

529 TGC CAA GGA GAC AGC CTC AGA AGC TCT TAT GCA AGC TGG TAC CGG
 CAG AGG CCA GGA CAG 588
 177 Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Ser Tyr Ala Ser Trp Tyr Arg
 Gln Arg Pro Gly Gln 196

589 GCC *CCT GTA CCT GTC ATC TAT GGT AAG AAC AAC *TGG CCC TCA GGG
 ATC CCA GAC CGG TTC 648
 197 Ala *Pro Val Pro Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn *Trp Pro Ser Gly
 Ile Pro Asp Arg Phe 216

649 TCT GGC TCC AGC TCA GGA AAC ACA GCT TCC TTG ACC ATC ACT GGG
 GCT CAG GCG GAA GAT 708

ES 2 706 409 T3

217 Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly
Ala Gln Ala Glu Asp 236

709 GAG GCT GAC TAT TAC *TGT AAC TCC TCT TAT GCG TGG CTG CCC TAT
GTG GTA TTC GGC GGA 768

237 Glu Ala Asp Tyr Tyr *Cys Asn Ser Ser Tyr Ala Trp Leu Pro Tyr
Val Val Phe Gly Gly 256

769 GGG ACC AAG CTG ACC GTC CTA GGC GCG GCC GCA 801
257 Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala 267

Conector

802 TCT TCC TCA TCG GGT AGT AGC TCT TCC GGC TCA TCG TCC AGC GGC
846

268 Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly
282

LLOAPEST

847 ATG GAA ATC GAT AAG TAT ATA CAA GGA TTG GAT TAC AAT AAA AAC
AAT GTA TTA GTA TAC 906

283 Met Glu Ile Asp Lys Tyr Ile Gln Gly Leu Asp Tyr Asn Lys Asn
Asn Val Leu Val Tyr 302

907 CAC GGA GAT GCA GTG ACA AAT GTG CCG CCA AGA AAA GGT TAC AAA
GAT GGA AAT GAA TAT 966

303 His Gly Asp Ala Val Thr Asn Val Pro Pro Arg Lys Gly Tyr Lys
Asp Gly Asn Glu Tyr 322

967 ATC GTT GTG GAG AAA AAG AAG AAA TCC ATC AAT CAA AAT AAT GCA
GAC ATC CAA GTT GTA 1026

323 Ile Val Val Glu Lys Lys Lys Lys Ser Ile Asn Gln Asn Asn Ala
Asp Ile Gln Val Val 342

1027 AAT GCA ATT TCG AGC CTA ACA TAT CCA GGT GCT CTC GTA AAA GCG
AAT TCG GAA TTA GTA 1086

343 Asn Ala Ile Ser Ser Leu Thr Tyr Pro Gly Ala Leu Val Lys Ala
Asn Ser Glu Leu Val 362

1087 GAA AAT CAA CCA GAT GTT CTC CCT GTA AAA CGT GAT TCA TTA ACA
CTT AGC ATC GAT TTG 1146

363 Glu Asn Gln Pro Asp Val Leu Pro Val Lys Arg Asp Ser Leu Thr
Leu Ser Ile Asp Leu 382

1147 CCA GGA ATG ACT AAT CAA GAC AAT AAA ATC GTT GTA AAA AAT GCT
ACT AAA TCG AAT GTT 1206

383 Pro Gly Met Thr Asn Gln Asp Asn Lys Ile Val Val Lys Asn Ala
Thr Lys Ser Asn Val 402

1207 AAC AAC GCA GTA AAT ACA TTA GTG GAA AGA TGG AAT GAA AAA TAT
GCT CAA GCT TAT CCG 1266

403 Asn Asn Ala Val Asn Thr Leu Val Glu Arg Trp Asn Glu Lys Tyr
Ala Gln Ala Tyr Pro 422

ES 2 706 409 T3

1267 AAT GTA AGT GCA AAA ATT GAT TAT GAT GAC GAA ATG GCT TAC AGT
 GAA TCA CAA TTA ATT 1326
 423 Asn Val Ser Ala Lys Ile Asp Tyr Asp Asp Glu Met Ala Tyr Ser
 Glu Ser Gln Leu Ile 442

1327 GCA AAA TTT GGT ACT GCA TTT AAA GCT GTA AAT AAT AGT TTG AAT
 GTA AAC TTC GGC GCA 1386
 443 Ala Lys Phe Gly Thr Ala Phe Lys Ala Val Asn Asn Ser Leu Asn
 Val Asn Phe Gly Ala 462

1387 ATC AGT GAA GGG AAA ATG CAA GAA GAA GTC ATT AGT TTT AAA CAA
 ATT TAC TAT AAC GTG 1446
 463 Ile Ser Glu Gly Lys Met Gln Glu Glu Val Ile Ser Phe Lys Gln
 Ile Tyr Tyr Asn Val 482

1447 AAT GTT AAT GAA CCT ACA AGA CCT TCC AGA TTT TTC GGC AAA GCT
 GTT ACT AAA GAG CAG 1506
 483 Asn Val Asn Glu Pro Thr Arg Pro Ser Arg Phe Phe Gly Lys Ala
 Val Thr Lys Glu Gln 502

1507 TTG CAA GCG CTT GGA GTA AAT GCA GAA AAT CCT CCT GCA TAT ATC
 TCA AGT GTG GCA TAC 1566
 503 Leu Gln Ala Leu Gly Val Asn Ala Glu Asn Pro Pro Ala Tyr Ile
 Ser Ser Val Ala Tyr 522

1567 GGC CGT CAA GTT TAT TTG AAA TTA TCG ACT AAT TCC CAT AGT ACT
 AAA GTA AAA GCT GCT 1626
 523 Gly Arg Gln Val Tyr Leu Lys Leu Ser Thr Asn Ser His Ser Thr
 Lys Val Lys Ala Ala 542

1627 TTT GAT GCT GCC GTA AGT GGG AAA TCT GTC TCA GGT GAT GTA GAA
 TTA ACA AAT ATC ATC 1686
 543 Phe Asp Ala Ala Val Ser Gly Lys Ser Val Ser Gly Asp Val Glu
 Leu Thr Asn Ile Ile 562

1687 AAA AAT TCT TCC TTC AAA GCC GTA ATT TAC GGT GGT TCC GCA AAA
 GAT GAA GTT CAA ATC 1746
 563 Lys Asn Ser Ser Phe Lys Ala Val Ile Tyr Gly Gly Ser Ala Lys
 Asp Glu Val Gln Ile 582

1747 ATC GAT GGC AAC CTC GGA GAC TTA CGA GAT ATT TTG AAA AAA GGT
 GCT ACT TTT AAT CGA 1806
 583 Ile Asp Gly Asn Leu Gly Asp Leu Arg Asp Ile Leu Lys Lys Gly
 Ala Thr Phe Asn Arg 602

1807 GAA ACA CCA GGA GTT CCC ATT GCT TAT ACA ACA AAT TTC TTA AAA
 GAC AAT GAA TTA GCT 1866
 603 Glu Thr Pro Gly Val Pro Ile Ala Tyr Thr Thr Asn Phe Leu Lys
 Asp Asn Glu Leu Ala 622

1867 GTT ATT AAA AAC AAC TCA GAA TAT ATT GAA ACA ACT TCA AAA GCT
TAT ACA GAT GGA AAA 1926
623 Val Ile Lys Asn Asn Ser Glu Tyr Ile Glu Thr Thr Ser Lys Ala
Tyr Thr Asp Gly Lys 642

1927 ATT AAT ATT GAT CAC TCT GGA GGC TAC GTT GCT CAA TTC AAC ATC
TCT TGG GAT GAA ATA 1986
643 Ile Asn Ile Asp His Ser Gly Gly Tyr Val Ala Gln Phe Asn Ile
Ser Trp Asp Glu Ile 662

1987 AAT TAT GAT CCT GAA GGT AAC GAA ATT GTT CAA CAT AAA AAC TGG
AGC GAA AAC AAT AAA 2046
663 Asn Tyr Asp Pro Glu Gly Asn Glu Ile Val Gln His Lys Asn Trp
Ser Glu Asn Asn Lys 682

2047 AGC AAG CTA GCT CAT TTC ACA TCG TCC ATC TAT TTG CCA GGT AAC
GCA AGA AAT ATT AAT 2106
683 Ser Lys Leu Ala His Phe Thr Ser Ser Ile Tyr Leu Pro Gly Asn
Ala Arg Asn Ile Asn 702

2107 GTT TAC GCC AAA GAA TGC ACT GGT TTA GCT TGG GAA TGG TGG AGA
ACG GTA ATT GAT GAC 2166
703 Val Tyr Ala Lys Glu Cys Thr Gly Leu Ala Trp Glu Trp Trp Arg
Thr Val Ile Asp Asp 722

2167 CGG AAC TTA CCA CTT GTG AAA AAT AGA AAT ATC TCC ATC TGG GGC
ACT ACG CTT TAT CCG 2226
723 Arg Asn Leu Pro Leu Val Lys Asn Arg Asn Ile Ser Ile Trp Gly
Thr Thr Leu Tyr Pro 742

2227 AAA TAT AGT AAT AGT GTA GAT AAT CCA ATC GAA GCG GCC GCA CTC
GAG 2274
743 Lys Tyr Ser Asn Ser Val Asp Asn Pro Ile Glu Ala Ala Ala Leu
Glu 758
His6
2275 CAC CAC CAC CAC CAC CAC 2292
759 His His His His His His 764

Fig. 19

**scFvDIATHIS-1:IL-2
secuencia líder Pel B**

1 ATG AAA TAC CTG CTG CCG ACG GCT GCT GCT GGT CTG CTG CTC CTC
GCT GCC CAG CCG GCG 60
1 Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu
Ala Ala Gln Pro Ala 20

61 ATG GCC 66
21 Met Ala 22
VH

ES 2 706 409 T3

67 ATG GCC GAG GTG CAG CTG GCG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG
 CCT GGG GGG TCC CTG 126
 23 Met Ala Glu Val Gln Leu Ala Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 Pro Gly Gly Ser Leu 42

127 AGA CTC TCC TGT GCC GCC TCT GGA TTC ACC TTT AGC AGC GAT GCC
 ATG AGC TGG GTC CGC 186
 43 Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Asp Ala
 Met Ser Trp Val Arg 62

187 CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTC TCA GCT ATT AGT GGT
 AGT GGT GGT AGC ACA 246
 63 Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly
 Ser Gly Gly Ser Thr 82

247 TAC TAC GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGG TTC ACC ATC TCC AGA GAC
 AAT TCC AAG AAC ACG 306
 83 Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 Asn Ser Lys Asn Thr 102

307 CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCC GTA
 TAT TAC TGT GCG AAA 366
 103 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 Tyr Tyr Cys Ala Lys 122

367 AGT AAT GAG TTT CTT TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACT CTG GTC
 ACC GTG TCG AGA 423
 123 Ser Asn Glu Phe Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 Thr Val Ser Arg 141

Conector:

424 GGT GGA GGC GGT TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG
 468
 142 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 156

VL

469 TCT GAG CTG ACT CAG GAC CCT GCT GTG TCT GTG GCC TTG GGA CAG
 ACA GTC AGG ATC ACA 528
 157 Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
 Thr Val Arg Ile Thr 176

529 TGC CAA GGA GAC AGC CTC AGA AGC TCT TAT GCA AGC TGG TAC CGG
 CAG AGG CCA GGA CAG 588
 177 Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Ser Tyr Ala Ser Trp Tyr Arg
 Gln Arg Pro Gly Gln 196

589 GCC *CCT GTA CCT GTC ATC TAT GGT AAG AAC AAC *TGG CCC TCA GGG
 ATC CCA GAC CGG TTC 648
 197 Ala *Pro Val Pro Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn *Trp Pro Ser Gly
 Ile Pro Asp Arg Phe 216

ES 2 706 409 T3

649 TCT GGC TCC AGC TCA GGA AAC ACA GCT TCC TTG ACC ATC ACT GGG
 GCT CAG GCG GAA GAT 708
 217 Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly
 Ala Gln Ala Glu Asp 236

709 GAG GCT GAC TAT TAC *TGT AAC TCC TCT TAT GCG TGG CTG CCC TAT
 GTG GTA TTC GGC GGA 768
 237 Glu Ala Asp Tyr Tyr *Cys Asn Ser Ser Tyr Ala Trp Leu Pro Tyr
 Val Val Phe Gly Gly 256

769 GGG ACC AAG CTG ACC GTC CTA GGC GCG GCC GCA 801
 257 Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala 267

Conector

802 TCT TCC TCA TCG GGT AGT AGC TCT TCC GGC TCA TCG TCC AGC GGC
 846
 268 Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly
 282

IL-2

847 GCA CCT ACT TCA AGT TCT ACA AAG AAA ACA CAG CTA CAA CTG GAG
 CAT TTA CTG CTG GAT 906
 283 Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu
 His Leu Leu Leu Asp 302

907 TTA CAG ATG ATT TTG AAT GGA ATT AAT AAT TAC AAG AAT CCC AAA
 CTC ACC AGG ATG CTC 966
 303 Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys
 Leu Thr Arg Met Leu 322

967 ACA TTT AAG TTT TAC ATG CCC AAG AAG GCC ACA GAA CTG AAA CAT
 CTT CAG TGT CTA GAA 1026
 323 Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His
 Leu Gln Cys Leu Glu 342

1027 GAA GAA CTC AAA CCT CTG GAG GAA GTG CTA AAT TTA GCT CAA AGC
 AAA AAC TTT CAC TTA 1086
 343 Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser
 Lys Asn Phe His Leu 362

1087 AGA CCC AGG GAC TTA ATC AGC AAT ATC AAC GTA ATA GTT CTG GAA
 CTA AAG GGA TCT GAA 1146
 363 Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu
 Leu Lys Gly Ser Glu 382

1147 ACA ACA TTC ATG TGT GAA TAT GCT GAT GAG ACA GCA ACC ATT GTA
 GAA TTT CTG AAC AGA 1206
 383 Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val
 Glu Phe Leu Asn Arg 402

1207 TGG ATT ACC TTT TGT CAA AGC ATC ATC TCA ACA CTG ACT GCG GCC
 GCA CTC GAG 1260

403 Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr Ala Ala
Ala Leu Glu 420

His6

1261 CAC CAC CAC CAC CAC CAC 1278

421 His His His His His His 426

Fig. 20