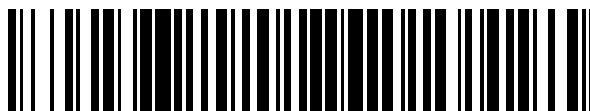


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 425 539**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

**C07K 16/00** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.02.2003 E 10011766 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2013 EP 2329814**

54 Título: **Anticuerpo que tiene una especificidad tipo receptor de células T, con una afinidad aún mayor y el uso del mismo en la detección y el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

**13.02.2002 US 73301**

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

**16.10.2013**

73 Titular/es:

**TECHNION RESEARCH AND DEVELOPMENT  
FOUNDATION, LTD. (100.0%)  
Senate House Technion City  
32000 Haifa, IL**

72 Inventor/es:

**REITER, YORAM y  
DENKBERG, GALIT**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 425 539 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpo que tiene una especificidad tipo receptor de células T, con una afinidad aún mayor y el uso del mismo en la detección y el tratamiento del cáncer.

**Campo y antecedentes de la invención**

5 La presente invención se refiere a las realizaciones como se caracterizan en las reivindicaciones.

Se demostró que la expresión de péptidos específicos en complejo con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I en células estaba asociada con cáncer y enfermedades autoinmunes (1-3) e infecciones víricas. En el cáncer, el descubrimiento de estos péptidos surgía de la observación ahora bien establecida de que las células tumorales humanas expresan con frecuencia antígenos que son reconocidos por linfocitos T citotóxicos (CTL) obtenidos de pacientes (1-5).

Además, se ha demostrado que la respuesta inmune contra el tumor es insuficiente para causar la regresión tumoral y que las células tumorales pueden desarrollar mecanismos eficaces para escapar a dicho ataque inmune (6-9). Por lo tanto, se están desarrollando numerosas estrategias en el campo de la vacunación contra tumores en un intento por aumentar las respuestas inmunes antitumorales, incluyendo vacunas de péptidos contra el cáncer, vacunas autólogas contra el cáncer y la vacuna híbrida de células cancerosas-dendríticas (7, 10, 11).

Debido a que la especificidad de la respuesta inmune está regulada e impuesta por estos complejos de MHC clase I-péptido debería ser posible usar estos marcadores moleculares de superficie celular específicos y únicos como dianas para eliminar las células cancerosas, al tiempo que se evitan las células normales. Pueden emprenderse una estrategia similar para erradicar células infectadas por virus y células que presenten dianas para ataque autoinmune. Por lo tanto, sería muy deseable encontrar nuevas moléculas en una forma soluble que mimeticen la especificidad única refinada del receptor de antígeno de célula T (TCR) para los complejos de MHC-péptido asociados con cáncer/infecciones víricas/enfermedades autoinmunes.

Una estrategia prometedora es generar anticuerpos recombinantes que se unirán al complejo de MHC-péptido expresado en las superficies de células cancerosas con la misma especificidad que el TCR. Estos anticuerpos únicos pueden equiparse posteriormente con un resto citotóxico efector tal como un radioisótopo, un fármaco citotóxico o una toxina. Por ejemplo, se fusionaron genéticamente anticuerpos que se dirigen a células cancerosas con toxinas potentes obtenidas tanto de plantas como de bacterias, generando de este modo moléculas denominadas inmunotoxinas recombinantes (12).

Los anticuerpos con la especificidad de células T restringida por MHC son poco frecuentes y han sido difíciles de generar mediante técnicas de hibridoma convencionales debido a que las células B no aprenden a autorrestringirse por MHC (13-16). Las ventajas de la tecnología de anticuerpos presentados en fagos también hace posible seleccionar grandes repertorios de anticuerpos para anticuerpos únicos y poco frecuentes contra epítomos muy definidos. Esto se ha demostrado por la capacidad para aislar mediante presentación en fagos un anticuerpo restringido similar a TCR contra un H-2K<sup>k</sup> de MHC clase I murino formando un complejo con un epítomo viral (17). Evidentemente, este anticuerpo, que está dirigido al MHC de ratón, es inútil en el tratamiento y diagnóstico de seres humanos. Hasta ahora, han fracasado los intentos realizados por el mismo grupo para desarrollar un anticuerpo restringido similar a TCR contra un MHC clase I humano. Más recientemente se aisló un anticuerpo reactivo con el antígeno de melanoma MAGE-A1 en un complejo con HLA-A1; sin embargo, este anticuerpo presentaba una baja afinidad y podía usarse para detectar los complejos específicos en la superficie de células presentadoras de antígeno sólo cuando se expresan de una forma multimérica en un fago y no como un anticuerpo soluble (18).

El documento WO-A-9702342 describe un procedimiento para producir un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que reconozca específicamente un complejo de péptido-MHC. También se refiere a anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de acuerdo con la invención que están conjugados con un agente farmacéutico o con un superantígeno. Además, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de acuerdo con la invención para la prevención o tratamiento de enfermedades infecciosas y autoinmunes y del cáncer, y a composiciones para el diagnóstico de dichas enfermedades.

El documento WO-A-91/12332 se refiere a anticuerpos monoclonales restringidos caracterizados por su capacidad para reconocer específicamente un complejo que consiste en un péptido, que es característico de un antígeno de agente patógeno o un trastorno celular, y una molécula del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) que tiene la capacidad de reconocer y fijar este péptido, siendo dichos anticuerpos monoclonales restringidos en el sentido de que son incapaces de reconocer dicho péptido combinado con una molécula de MHC de haplotipo inespecífico de péptido. Estos anticuerpos pueden usarse para diagnosticar afecciones causadas por agentes infecciosos o trastornos celulares que se encontrarán, por ejemplo, en tumores o enfermedades autoinmunes.

Chames y col describe la selección directa de un fragmento de anticuerpo humano dirigido contra el epítomo de célula T tumoral HLA-A1-MAGE-A1 a partir de una biblioteca no inmunizada de fagos-Fab, PROC. NATL. ACAD. SCI. USA vol. 97, no. 14, 05 Julio 2000, páginas 7969-7974.

Por lo tanto existe la necesidad ampliamente reconocida, y sería altamente ventajoso, de tener un anticuerpo restringido similar a TCR contra un MHC clase I humano desprovisto de las limitaciones anteriores.

### **Sumario de la invención**

5 En los últimos años, se han aislado muchos péptidos restringidos por MHC asociados con cáncer, asociados con infecciones víricas y enfermedades autoinmunes, y debido a su especificidad refinada altamente restringida, son dianas deseables para nuevas estrategias en inmunoterapia e inmunodiagnóstico. Los anticuerpos que son capaces de reconocer complejos de MHC-péptido asociados con cáncer, asociados con infecciones víricas y enfermedades autoinmunes, con la misma especificidad que el receptor de antígeno de célula T serían reactivos valiosos para estudiar la presentación de antígenos por células tumorales, células infectadas por virus y células relacionadas con enfermedades autoinmunes, para visualizar complejos de MHC-péptido en dichas células y, en última instancia, para desarrollar nuevos agentes de direccionamiento para inmunoterapia e inmunodiagnóstico del cáncer, infecciones víricas y enfermedades autoinmunes.

15 Cuando se reduce la presente invención a la práctica, y para generar moléculas ejemplares con una especificidad refinada única de este tipo, se inmunizaron ratones transgénicos HLA-A2 con un HLA-A2 de cadena sencilla soluble, formando un complejo con un epítipo restringido por HLA-A2 de célula T antigénico común obtenido del antígeno de diferenciación de melanoma gp100. Usando presentación en fagos, se aisló un anticuerpo scFv recombinante de alta afinidad que presenta una especificidad de unión similar a TCR característica con el epítipo derivado de gp100, aunque a diferencia de los TCR, lo hace con una afinidad en el intervalo nanomolar. El anticuerpo similar a TCR reconoce el complejo de MHC-péptido nativo expresado en la superficie de células presentadoras de antígeno.

20 Además, cuando se fusionaba con una molécula efectora citotóxica muy potente en forma de una toxina bacteriana truncada, era capaz de destruir específicamente células presentadoras de antígeno de una forma dependiente de péptido y con una especificidad similar a TCR. Estos resultados demuestran por primera vez la capacidad para aislar anticuerpos recombinantes humanos de alta afinidad con la especificidad restringida por MHC específica de antígeno de células T dirigida hacia epítopos de células T cancerosas humanas. Los anticuerpos similares a TCR seleccionados son útiles para controlar y visualizar la expresión de complejos de MHC-péptido específicos en la superficie de células tumorales, otras células que presentan antígenos y tejidos linfoides, así como para desarrollar una nueva familia de agentes de direccionamiento para inmunoterapia.

25 Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto de la presente invención se proporciona una molécula aislada que comprende un anticuerpo que puede unirse específicamente con una afinidad de unión inferior a 20 nanomolar, a un complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I humano que está formando un complejo con un antígeno de tirosinasa restringido por HLA, como se define en las reivindicaciones adjuntas.

30 De acuerdo con características adicionales en realizaciones preferidas de la invención que se describe a continuación, la molécula aislada comprende además un resto identificable que se conjuga con el anticuerpo.

35 De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la molécula aislada comprende además un resto terapéutico que se conjuga con el anticuerpo.

También se desvela un anticuerpo que es un anticuerpo de cadena sencilla que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEC ID N°:9.

40 También se desvela una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula que comprende un anticuerpo que puede unirse específicamente con una afinidad de unión inferior a 20 nanomolar a un complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I humano que está formando un complejo con un antígeno restringido por HLA, comprendiendo la molécula además un resto terapéutico que se conjuga con el anticuerpo. Preferentemente, la composición farmacéutica comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

45 También se desvela una composición de diagnóstico que comprende una molécula que comprende un anticuerpo como se ha definido anteriormente, que puede unirse específicamente con una afinidad de unión inferior a 20 nanomolar a un complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I humano que forman un complejo con un antígeno restringido por HLA, comprendiendo la molécula además un resto identificable que se conjuga con el anticuerpo.

50 También se desvela una molécula aislada que comprende un primer polinucleótido que codifica un anticuerpo que puede unirse específicamente con una afinidad de unión inferior a 20 nanomolar a un complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I humano que está formando un complejo con un antígeno restringido por HLA.

En un ejemplo, el primer polinucleótido codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEC ID N°:9. En un ejemplo específico, el primer polinucleótido tiene una secuencia de ácido nucleico como se expone en la SEC ID N°:8.

55 De acuerdo con características adicionales de la divulgación, la molécula aislada comprende además un segundo polinucleótido que se une al primer polinucleótido y que codifica un resto terapéutico.

De acuerdo con características alternativas de la divulgación, la molécula aislada de la reivindicación 24 comprende además un segundo polinucleótido que se une al primer polinucleótido y que codifica un resto identificable.

De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones referidas descritas, el resto identificable se selecciona del grupo que consiste en un miembro de un par de unión y un marcador.

- 5 De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el miembro del par de unión es un antígeno.

De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas el marcador se selecciona del grupo que consiste en una proteína fluorescente y una enzima.

- 10 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención se proporciona un procedimiento de producción de un anticuerpo que puede unirse específicamente con una afinidad de unión inferior a 20 nanomolar a un complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I humano que está formando un complejo con un antígeno de tirosinasa restringido por HLA, como se define en las reivindicaciones.

De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el mamífero no humano está desprovisto de moléculas de MHC clase I propias.

- 15 También se desvela un procedimiento para tratar un cáncer, comprendiendo el procedimiento administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula que comprende un anticuerpo que puede unirse específicamente con una afinidad de unión inferior a 20 nanomolar a un complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I humano que está formando un complejo con un antígeno restringido por HLA tumoral que caracteriza al cáncer, comprendiendo la molécula además un resto terapéutico que está conjugado con el anticuerpo, seleccionándose la molécula del MHC clase I que coincide con el MHC clase I endógeno del sujeto.

- 20 También se desvela un procedimiento para tratar una infección viral, comprendiendo el procedimiento administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula que comprende un anticuerpo que puede unirse específicamente con una afinidad de unión inferior a 20 nanomolar a un complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I humano que está formando un complejo con un antígeno restringido por HLA viral que caracteriza un virus causante de la infección viral, comprendiendo la molécula además un resto terapéutico que está conjugado con el anticuerpo, seleccionándose la molécula del MHC clase I que coincide con el MHC clase I endógeno del sujeto.

- 25 También se desvela un procedimiento para tratar una enfermedad autoinmune, comprendiendo el procedimiento administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula que comprende un anticuerpo que puede unirse específicamente con una afinidad de unión inferior a 20 nanomolar a un complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I humano que está formando un complejo con un antígeno restringido por HLA autoinmune, comprendiendo la molécula además un resto terapéutico que está conjugado con el anticuerpo, seleccionándose la molécula del MHC clase I que coincide con el MHC clase I endógeno del sujeto.

De acuerdo con características adicionales en realizaciones preferidas de la invención descrita a continuación, la molécula de MHC clase I se selecciona del grupo que consiste en HLA-A2, HLA-A1, HLA-A3 y HLA-A24.

- 35 De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el resto terapéutico se selecciona del grupo que consiste en un resto citotóxico, un resto tóxico, un resto de citocina y un resto de anticuerpo biespecífico.

- 40 También se desvela un procedimiento de preparación de una inmunotoxina, comprendiendo el procedimiento ligar un primer polinucleótido que codifica un anticuerpo que puede unirse específicamente con una afinidad de unión inferior a 20 nanomolar a un complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I humano que está formando un complejo con un antígeno restringido por HLA en fase de lectura con un segundo polinucleótido que codifica un resto de toxina, para obtener un polinucleótido ligado y expresar el polinucleótido ligado en un sistema de expresión para obtener la inmunotoxina.

- 45 También se desvela un procedimiento de preparación de un inmunomarcador, comprendiendo el procedimiento ligar un primer polinucleótido que codifica un anticuerpo, que puede unirse específicamente con una afinidad de unión inferior a 20 nanomolar a un complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I humano que está formando un complejo con un antígeno restringido por HLA en fase de lectura con un segundo polinucleótido que codifica un resto identificable, para obtener un polinucleótido ligado y expresar el polinucleótido ligado en un sistema de expresión para obtener el inmunomarcador.

- 50 También se desvela un procedimiento de detección de la presencia y/o nivel de células presentadoras de antígeno que presentan un antígeno restringido por HLA en una muestra de células, comprendiendo el procedimiento hacer interaccionar las células de la muestra con un anticuerpo que puede unirse específicamente con una afinidad de unión inferior a 20 nanomolar a un complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I humano que está formando un complejo con un antígeno restringido por HLA; y controlar la interacción, detectando por lo tanto la presencia y/o nivel de las células presentadoras de antígeno que presentan el antígeno restringido por HLA.

Dependiendo de la aplicación, el antígeno restringido por HLA se selecciona del grupo que consiste en un antígeno restringido por HLA tumoral, un antígeno restringido por HLA viral y un antígeno restringido por HLA autoinmune.

La presente invención aborda con éxito los defectos de las configuraciones actualmente conocidas proporcionando un anticuerpo que tiene una especificidad de receptor de célula T y alta afinidad con su antígeno.

## 5 **Breve descripción de los dibujos**

La invención se describe en este documento, a modo de ejemplo solamente, con referencia a los dibujos adjuntos. Con referencia específica ahora a los dibujos en detalle, se insiste en que las particularidades que se muestran son a modo de ejemplo y con el fin de una discusión ilustrativa de las realizaciones preferidas de la presente invención solamente, y se presentan con motivo de proporcionar la que se piensa que es la descripción más útil y fácilmente entendible de los principios y aspectos conceptuales de la invención. A este respecto, no se pretende mostrar detalles estructurales de la invención en más detalle que el necesario para un entendimiento fundamental de la invención, haciendo evidente la descripción tomada con los dibujos para los especialistas en la técnica cómo las varias formas de la invención pueden incorporarse en la práctica.

En los dibujos:

15 Las Figuras 1A-B muestran gráficas de barras que demuestran ELISA de fagos policlonal en complejos de scHLA-A2-péptido recombinantes. Las placas se recubrieron con el complejo de scMHC-péptido indicado como se describe en la sección de Ejemplos a continuación. Se muestra la unión de la población de fagos policlonal de la biblioteca inicial (L) o fagos eluidos después de cada ronda de selección (I-IV). Figura 1A - fagos de la biblioteca pCANTAB scFv; Figura 1B - fagos de la biblioteca scFv-CBD. Se realizaron estudios de especificidad de unión mediante ELISA usando complejos de scMHC-péptido biotinilados. Se recubrieron placas de ELISA (Falcon) durante una noche con BSA-biotina (1 µg/pocillo), se lavaron, se incubaron (1 h, temperatura ambiente) con estreptavidina (1 µg/pocillo), se lavaron de nuevo exhaustivamente y se incubaron adicionalmente (1 h, temperatura ambiente) con 0,5 µg de complejos de MHC/péptido. Las placas se bloquearon con PBS/leche al 2 % (30 min, temperatura ambiente) o se incubaron con clones de fagos (~10<sup>9</sup> fagos/pocillo, 1 h, temperatura ambiente) o 0,5-1 µg de scFv o scFv-PE38 soluble, y después se lavaron con anti-M13 conjugado con HRP, anticuerpo anti-myc o anticuerpo anti-PE, 1:1000, respectivamente. Los péptidos restringidos por HLA-A2 usados para estudios de especificidad son gp100 (154): KTWGQYWQV (SEC ID N°:1); gp100 (209): IMDQVPFSV (SEC ID N°:2); gp100 (280): YLEPGPVTV (SEC ID N°:3); MUC1: LLLTVLTVL (SEC ID N°:4); HTLV-1 (TAX): LLFGYPVYV (SEC ID N°:5); hTERT (540): ILAKFLHWL (SEC ID N°:6); hTERT (865): RLVDDFLLV (SEC ID N°:7).

Las Figuras 2A-B muestran gráficas de barras que demuestran la unión diferencial de clones de fagos monoclonales a complejos de scHLA-A2/gp100. Se ensayó un fago monoclonal para determinar la unión a scHLA-A2 inmovilizado que está formando un complejo con los epítopos derivados de gp100. Figura 2A - G9-209M; Figura 2B - G9-280V. Los ensayos se realizaron de forma similar a la descrita en la Figura 1 anterior.

35 La Figura 3A muestra las secuencias de ácido nucleico (SEC ID N°: 8) y aminoácidos (SEC ID N°:9) del anticuerpo G1 scFv. Las CDR están marcadas en negrita, el péptido enlazador que conecta los dominios VH y VL está subrayado.

Las Figuras 3B-C muestran el análisis de SDS-PAGE de G1scFv purificado y G1scFv-PE38. El gen de G1 scFv se rescató del clon de fagos por PCR y se subclonó en el vector fagémido pCANTAB6 mediante los sitios de clonación *Sfil-NotI*. Se fusionaron unos marcadores Myc y hexahistidina con el extremo C-terminal del gen de scFv. El anticuerpo scFv se expresó en células BL21 /IDE3 como se ha descrito anteriormente (29) y se purificó a partir de la fracción periplásmica mediante cromatografía de afinidad por iones metálicos. Para la expresión de la proteína de fusión G1scFv-PE38, el gen de scFv se subclonó como un fragmento *NcoI-NotI* en el plásmido pIB-NN, que codifica los dominios de translocación y ADP-ribosilación de PE (PE38). La expresión en células BL21 /IDE3, el replegamiento a partir de cuerpos de inclusión y la purificación de G1scFv-PE38 se realizaron como se ha descrito anteriormente (30).

La Figura 4 es una gráfica de barras que demuestra la especificidad de unión de G1 scFv-PE38. Se recubrieron inmunoplaquetas con diversos complejos de scHLA-A2-péptido indicados como se describe y se detectó la unión del G1 scFv-PE38 a complejos inmovilizados con anticuerpo anti-PE.

50 Las Figuras 5A-B muestran representaciones que demuestran las características de unión del G1 scFv similar a TCR. 5A - ELISA de titulación de G1 scFv soluble purificado. Se recubrieron pocillos con los complejos de MHC-péptido como se describe en la sección de Ejemplos a continuación. 5B - Análisis de unión competitiva de la capacidad de G1 scFv-PE38 purificado para inhibir la unión de G1 scFv-PE38 marcado con <sup>125</sup>I al complejo de HLA-A2/G9-209M. La afinidad de unión aparente del scFv recombinante se determinó como la concentración de competidor (G1scFv-PE38 purificado soluble) necesaria para una inhibición del 50 % de la unión del indicador marcado con <sup>125</sup>I. Se recubrieron placas de ELISA flexibles con BSA-biotina y se inmovilizaron complejos de scMHC-péptido (10 µg en 100 µl) como se ha descrito anteriormente. El G1scFv-PE38 recombinante se marcó con [<sup>125</sup>I] usando el reactivo de Bolton-Hunter. Se añadió proteína marcada a pocillos como indicador (3-5 x 10<sup>5</sup>

CPM/pocillo) en presencia de concentraciones crecientes de G1scFv-PE38 frío como competidor y se incubó a temperatura ambiente durante 1 h en PBS. Las placas se lavaron minuciosamente con PBS y se determinó la radiactividad unida mediante un contador gamma. La afinidad aparente del G1scFv-PE38 se determinó por extrapolación de la concentración de un competidor necesario para conseguir una inhibición del 50 % de la unión de G1scFv-P38 marcado con [<sup>125</sup>I] al complejo de scMHC-péptido inmovilizado. Se determinó la unión inespecífica por adición de un exceso de 20-40 veces de Fab sin marcar.

Las Figuras 6A-C muestran representaciones que demuestran la unión de G1 scFv a APC. Se cargaron células RMAS-HHD o JY con los péptidos restringidos por HLA-A2 indicados. Después, las células cargadas con péptido se incubaron con el anticuerpo G1 scFv purificado soluble. La detección de la unión era con anti-Myc marcado con FITC. Las células RMAS-HHD se cargaron con los péptidos G9-209 y G9-280 y se tiñeron junto con células sin cargar de control con el anticuerpo anti-HLA w6/32 (6A) o el anticuerpo anti-HLA-A2 BB7.2 (6B) para demostrar la estabilización/expresión de complejos de HLA-A2 en la superficie de péptido cargado pero no en células no cargadas con péptido. Las células cargadas con los péptidos G9-209 o G9-280 se tiñeron con G1 scFv y se muestra la tinción diferencial (6C). La línea de células B RMAS-HHD transfectada con un gen de p2M-HLA-A2 de cadena sencilla (26) o las células JY linfoblásticas B transformadas con EBV (10<sup>6</sup> células) se lavaron dos veces con RPMI sin suero y se incubaron durante una noche a 26 °C o 37 °C, respectivamente, en medio que contenía 100 μM del péptido. Las APC se incubaron posteriormente a 37 °C durante 2-3 horas para estabilizar la expresión en superficie celular de complejos de MHC-péptido seguido de incubación con scFv recombinante (10-50 μg/ml, 60-90 minutos, 4 °C) en 100 μl. Después las células se lavaron, se incubaron con anticuerpo anti-Myc marcado con FITC (30-45 minutos, 4 °C) y por último se lavaron y se analizaron mediante un citómetro de flujo FACStar (Becton Dickinson). Las células de melanoma se estimularon a 37 °C con 1-10 μM de péptido y después se tiñeron con el scFv como se describe en este documento.

Las Figuras 7A-C muestran representaciones y una gráfica de barras que demuestra la actividad citotóxica de G1 scFv-PE38 sobre APC cargadas con péptido. Se cargaron células RMAS-HHD (7A) o JY (7B) con los péptidos restringidos por HLA-A2 como se indica, seguido de incubación con concentraciones crecientes de G1 scFv-PE38. Se determinó la síntesis de proteína por incorporación de <sup>3</sup>H-leucina en proteínas celulares. Se añadió un exceso (0,15-0,25 mg/ml) (7C) del complejo de scHLA-A2-péptido indicado a los pocillos antes de la adición de G1 scFv-PE38 (25-50 ng/ml). Se cargaron APC RMAS-HHD y JY con el péptido G9-209 y péptidos de control como se ha descrito anteriormente. Las células cargadas con péptido se incubaron posteriormente con concentraciones crecientes de G1scFv-PE38 y la inhibición de la síntesis de proteína se determinó por medición de la captación de <sup>3</sup>H-leucina en proteínas celulares, como se ha descrito anteriormente (30). Se determinó la CI<sub>50</sub> como la concentración de G1scFv-PE38 necesaria para inhibir la síntesis de proteína en el 50 %. En ensayos de competición, se añadieron excesos de complejos de HLA-A2-péptido específicos e inespecíficos (35-50 μg/pocillo) a pocillos 15 minutos antes de la adición de G1scFv-PE38.

### **Descripción de las realizaciones preferidas**

La presente invención es de un anticuerpo que tiene una especificidad de receptor de célula T y una afinidad aún mayor, conjugados del mismo con restos identificables y/o terapéuticos, para generar inmunotoxinas e inmunomarcadores, y un procedimiento de generación del anticuerpo como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Los principios y el funcionamiento de la presente invención pueden entenderse mejor con referencia a los dibujos y descripciones adjuntas.

El sistema inmune está controlado y regulado por el receptor de células T (TCR) que reconoce específicamente péptido/moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC).

La llegada de la aplicación de complejos de MHC clase I-péptido recombinantes y sus matrices tetraméricas permite ahora detectar y estudiar poblaciones poco frecuentes de células T específicas de antígeno (25, 35, 36). Sin embargo, todavía están sin respuesta cuestiones fundamentales en inmunología en general, y en inmunología tumoral en particular, respecto a la presentación de antígenos debido a la ausencia de reactivos que permitan un análisis fenotípico de la presentación de antígenos (MHC-péptido), la otra cara de la moneda para interacciones de MHC-péptido-TCR. Un modo de generar dichos reactivos es generando anticuerpos similares a TCR; sin embargo, sólo unas pocas publicaciones han descrito la generación de anticuerpos autorrestringidos por MHC por medios convencionales tales como la tecnología del hibridoma (13-16). La razón principal para estas dificultades del pasado puede encontrarse en la naturaleza molecular y las estructuras resueltas de los complejos de MHC-péptido. Más específicamente, los péptidos están profundamente enterrados en el interior de la hendidura de unión a MHC y por lo tanto se presentan como mosaicos extendidos de restos peptídicos entremezclados con los restos de MHC. Se ha demostrado que no más de 100-300 Å<sup>2</sup> de péptido unido a MHC clase I mira hacia fuera y, por lo tanto, está disponible para reconocimiento directo, mientras que los anticuerpos que reconocen moléculas proteicas se acoplan con aproximadamente 800 Å<sup>2</sup> de su ligando (17). Por lo tanto, cuando se generan anticuerpos similares a TCR, presumiblemente estas moléculas reconocerán el péptido pero también tendrán que estar dominadas por el MHC.

Hasta ahora, se han generado anticuerpos con especificidad similar a TCR contra complejos de MHC murino-péptido empleando diversas estrategias de inmunización (17). Recientemente, se usó una gran biblioteca de Fab humanos

para seleccionar anticuerpos de unión específicos de HLA-A1-MAGE-A1 (18). Se seleccionó un clon específico, G8, que presentaba especificidad similar a TCR pero puso de manifiesto una afinidad relativamente reducida de 250 nM.

5 Cuando se reduce la presente invención a la práctica, se demostró la capacidad para seleccionar a partir de un repertorio inmune de fragmentos scFv murinos un anticuerpo de alta afinidad dirigido hacia un epítipo de célula T humano.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención se proporciona un procedimiento de producción de un anticuerpo que puede unirse específicamente con una afinidad de unión inferior a 20 nanomolar a un complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I humano que está formando un complejo con un antígeno de tirosinasa restringido por HLA como se define en las reivindicaciones adjuntas.

10 El material genético del aislado de fago se usa después para preparar un anticuerpo de cadena sencilla u otras formas de anticuerpos como se describe adicionalmente en este documento a continuación. El material genético del aislado de fago se usa después para preparar un anticuerpo de cadena sencilla u otras formas de anticuerpos como se describe adicionalmente en este documento a continuación, y que se conjugan con restos identificables o terapéuticos. Preferentemente, el mamífero no humano está desprovisto de moléculas de MHC clase I propias. Más  
15 preferentemente, la forma soluble de una molécula de MHC clase I es un polipéptido MHC clase I de cadena sencilla que incluye una secuencia de aminoácidos de  $\beta$ -2 microglobulina humana funcional unida covalentemente directa o indirectamente a una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de MHC clase I humano funcional.

20 Por lo tanto, de acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una molécula aislada que comprende un anticuerpo que puede unirse específicamente con una afinidad de unión inferior a nanomolar a un complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I humano que está formando un complejo con un antígeno restringido por HLA. Dicho anticuerpo tiene una especificidad de receptor de célula T, y una afinidad aún mayor. También se desvela un anticuerpo que es un anticuerpo de cadena sencilla que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEC ID N°:9, codificada, por ejemplo, por el polinucleótido como se expone en la SEC ID N°:8.

25 Una vez que se clona un polinucleótido que codifica un anticuerpo que tiene una especificidad de receptor de célula T como se describe en este documento, puede modificarse de una de muchas formas para producir un espectro de productos relacionados.

30 En un ejemplo, el polinucleótido que codifica un anticuerpo que tiene una especificidad de receptor de célula T se liga con un segundo polinucleótido que codifica un resto identificable para producir un anticuerpo que tiene una especificidad de receptor de célula T conjugado con el resto identificable, un inmunomarcador. Dicho conjugado o inmunomarcador puede usarse en un procedimiento de detección de la presencia y/o nivel de células presentadoras de antígeno que presentan un antígeno restringido por HLA en una muestra de células y sirven para el diagnóstico del cáncer, una infección vírica o una enfermedad autoinmune. Como se usa en este documento, la expresión "célula presentadora de antígeno" incluye todas las células que expresan moléculas de MHC clase I en su superficie y que son capaces de presentar antígenos restringidos por HLA. Una célula presentadora de antígeno puede ser una célula cancerosa, una célula del sistema inmune o cualquier otra célula que exprese moléculas de MHC clase I en su  
35 superficie.

40 También se desvela un procedimiento de generación de un inmunomarcador, comprendiendo el procedimiento ligar un primer polinucleótido que codifica un anticuerpo que puede unirse específicamente con una afinidad de unión inferior a 20 nanomolar a un complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I humano que está formando un complejo con un antígeno restringido por HLA en fase de lectura con un segundo polinucleótido que codifica un resto identificable, para obtener un polinucleótido ligado y expresar el polinucleótido ligado en un sistema de expresión para obtener el inmunomarcador.

45 También se desvela un procedimiento de detección de la presencia y/o nivel de células presentadoras de antígeno que presentan un antígeno restringido por HLA en una muestra de células, comprendiendo el procedimiento hacer interaccionar las células de dicha muestra con un anticuerpo que puede unirse específicamente con una afinidad de unión inferior a 20 nanomolar a un complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I humano que está formando un complejo con un antígeno restringido por HLA; y controlar dicha interacción, detectando de este modo la presencia y/o nivel de dichas células presentadoras de antígeno que presentan dicho antígeno restringido por HLA.

50 Dependiendo de la aplicación, el antígeno restringido por HLA puede ser un antígeno restringido por HLA tumoral, un antígeno restringido por HLA viral y un antígeno restringido por HLA autoinmune, proporcionándose ejemplos de los mismos en este documento a continuación.

55 También se desvela una composición de diagnóstico que comprende una molécula que comprende un anticuerpo que puede unirse específicamente con una afinidad de unión inferior a 20 nanomolar a un complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I humano que está formando un complejo con un antígeno restringido por HLA, comprendiendo la molécula además un resto identificable que se conjuga con el anticuerpo.

El resto identificable puede ser un miembro de un par de unión, que es identificable por su interacción con un miembro adicional del par de unión y un marcador que se visualiza directamente. En un ejemplo, el miembro del par de unión es

un antígeno que se identifica por un anticuerpo marcado correspondiente. En un ejemplo, el marcador es una proteína fluorescente o una enzima que produce una reacción colorimétrica.

5 En otro ejemplo de la divulgación, el polinucleótido que codifica un anticuerpo que tiene una especificidad de receptor de célula T se liga con un segundo polinucleótido que codifica un resto terapéutico para producir un anticuerpo que tiene una especificidad de receptor de célula T conjugado con el resto terapéutico. Dicho conjugado o inmunotoxina puede usarse en un procedimiento de tratamiento del cáncer, una infección vírica o una enfermedad autoinmune.

10 También se desvela un procedimiento de generación de una inmunotoxina, comprendiendo el procedimiento ligar un primer polinucleótido que codifica un anticuerpo que puede unirse específicamente con una afinidad de unión inferior a 20 nanomolar a un complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I humano que está formando un complejo con un antígeno restringido por HLA en fase de lectura con un segundo polinucleótido que codifica un resto de toxina, para obtener un polinucleótido ligado y expresar dicho polinucleótido ligado en un sistema de expresión para obtener dicha inmunotoxina.

La inmunotoxina puede usarse en uno cualquiera de los siguientes protocolos terapéuticos:

15 (i) Un procedimiento de tratamiento del cáncer, comprendiendo el procedimiento administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula que comprende un anticuerpo que puede unirse específicamente con una afinidad de unión inferior a 20 nanomolar a un complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I humano que está formando un complejo con un antígeno restringido por HLA tumoral que caracteriza al cáncer, comprendiendo la molécula además un resto terapéutico que se conjuga con el anticuerpo, seleccionándose la molécula de MHC clase I para que coincida con el MHC clase I endógeno del sujeto.

20 (ii) Un procedimiento de tratamiento de una infección vírica, comprendiendo el procedimiento administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula que comprende un anticuerpo que puede unirse específicamente con una afinidad de unión inferior a 20 nanomolar a un complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I humano que está formando un complejo con un antígeno restringido por HLA viral que caracteriza un virus causante de la infección vírica, comprendiendo la molécula además un resto terapéutico que se conjuga con el anticuerpo, seleccionándose la molécula de MHC clase I que coincida con el MHC clase I endógeno del sujeto.

25 (iii) Un procedimiento de tratamiento de una enfermedad autoinmune, comprendiendo el procedimiento administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula que comprende un anticuerpo que puede unirse específicamente con una afinidad de unión inferior a 20 nanomolar a un complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I humano que está formando un complejo con un antígeno restringido por HLA autoinmune, comprendiendo la molécula además un resto terapéutico que se conjuga con dicho anticuerpo, seleccionándose la molécula de MHC clase I que coincida con el MHC clase I endógeno del sujeto.

35 También se desvela una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula que comprende un que puede unirse específicamente con una afinidad de unión inferior a 20 nanomolar a un complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I humano que está formando un complejo con un antígeno restringido por HLA, comprendiendo la molécula además un resto terapéutico que se conjuga con el anticuerpo. Preferentemente, la composición farmacéutica comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

El resto terapéutico puede ser, por ejemplo, un resto citotóxico, un resto tóxico, un resto de citocina y un resto de anticuerpo biespecífico, proporcionándose ejemplos de los mismos en este documento a continuación.

40 En todas las aplicaciones, el MHC clase I puede ser, por ejemplo, HLA-A2, HLA-A1 y HLA-A24.

Las siguientes secciones proporcionan ejemplos específicos y alternativas para cada uno de los diversos aspectos de la invención que se describe en este documento.

#### **Anticuerpo:**

45 El término "anticuerpo" como se usa para describir esta invención incluye moléculas intactas así como fragmentos funcionales de las mismas, tales como Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fv y scFv que son capaces de una unión específica de alta afinidad a un complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) humano clase I que está formando un complejo con un antígeno restringido por HLA. Estos fragmentos de anticuerpos funcionales se definen de la forma siguiente: (i) Fab, el fragmento que contiene un fragmento de unión a antígeno monovalente de una molécula de anticuerpo, puede producirse por digestión de un anticuerpo completo con la enzima papaína para dar una cadena ligera intacta y una porción de una cadena pesada; (ii) Fab', el fragmento de una molécula de anticuerpo que puede obtenerse por tratamiento de un anticuerpo completo con pepsina, seguido de reducción, para dar una cadena ligera intacta y una porción de la cadena pesada; se obtienen dos fragmentos Fab' por molécula de anticuerpo; (iii) F(ab')<sub>2</sub>, el fragmento del anticuerpo que puede obtenerse por tratamiento de un anticuerpo completo con la enzima pepsina sin una reducción posterior; F(ab')<sub>2</sub> es un número de dos fragmentos Fab' mantenidos unidos por dos enlaces disulfuro; (iv) Fv, definido como un fragmento modificado genéticamente que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada expresada como dos cadenas; y (c) scFv o "anticuerpo de cadena sencilla" ("SCA"), una



molécula modificada genéticamente que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada unidas por un enlazador polipeptídico adecuado como una molécula de cadena sencilla fusionada genéticamente.

5 Se conocen en la técnica procedimientos de generación de estos fragmentos. (Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1988).

Pueden prepararse fragmentos de anticuerpo de acuerdo con la presente invención por hidrólisis proteolítica del anticuerpo o por expresión en *E. coli* o células de mamífero (por ejemplo, cultivo de células de ovario de hámster chino u otros sistemas de expresión de proteínas) de ADN que codifica el fragmento.

10 Pueden obtenerse fragmentos de anticuerpo por digestión con pepsina o papaína de anticuerpos completos por procedimientos convencionales. Por ejemplo, pueden producirse fragmentos de anticuerpo por escisión enzimática de anticuerpos con pepsina para proporcionar un fragmento 5S denominado  $F(ab')_2$ . Este fragmento puede escindirse adicionalmente usando un agente reductor de tiol y, opcionalmente, un grupo de bloqueo para los grupos sulfhidrilo resultantes de la escisión de enlaces disulfuro, para producir fragmentos monovalentes  $Fab' 3.5S$ . Como alternativa, una escisión enzimática usando pepsina produce dos fragmentos  $Fab'$  monovalentes y un fragmento  $Fc$  directamente.  
15 Estos procedimientos se describen, por ejemplo, por Goldenberg, Patentes de Estados Unidos N° 4.036.945 y 4.331.647 y referencias contenidas en las mismas. Véase también Porter, R. R., *Biochem. J.*, 73: 119-126, 1959. También pueden usarse otros procedimientos de escisión de anticuerpos tales como separación de cadenas pesadas para formar fragmentos de cadena ligera-pesada monovalentes, escisión adicional de fragmentos u otras técnicas enzimáticas, químicas o genéticas siempre que los fragmentos se unan al antígeno que se reconoce por el anticuerpo  
20 intacto.

Los fragmentos  $Fv$  comprenden una asociación de cadenas  $V_H$  y  $V_L$ . Esta asociación puede ser no covalente, como se describe en Inbar y col., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 69: 2659-62, 1972. Como alternativa, las cadenas variables pueden unirse mediante un enlace disulfuro intermolecular o entrecruzarse por compuestos químicos tales como glutaraldehído. Preferentemente, los fragmentos  $Fv$  comprenden cadenas  $V_H$  y  $V_L$  conectadas por un enlazador peptídico. Estas proteínas de unión a antígeno de cadena sencilla ( $sFv$ ) se preparan por construcción de un gen estructural que comprende secuencias de ADN que codifican los dominios  $V_H$  y  $V_L$  conectados por un oligonucleótido. El gen estructural se inserta en un vector de expresión que se introduce posteriormente en una célula hospedadora tal como *E. coli*. Las células hospedadoras recombinantes sintetizan una cadena polipeptídica sencilla con un péptido enlazador que enlaza los dos dominios  $V$ . Se describen procedimientos para producir  $sFv$ , por ejemplo, por Whitlow y Filpula, *Methods*, 2: 97-105, 1991; Bird y col., *Science* 242: 423-426, 1988; Pack y col., *Bio/Technology* 11: 1271-77, 1993; y Ladner y col., Patente de Estados Unidos N° 4.946.778.  
25

Otra forma de un fragmento de anticuerpo es un péptido que codifica una sola región determinante de complementariedad (CDR). Pueden obtenerse péptidos de CDR ("unidades de reconocimiento mínimas") por construcción de genes que codifiquen la CDR de un anticuerpo de interés. Dichos genes se preparan, por ejemplo, usando la reacción en cadena de la polimerasa para sintetizar la región variable a partir del ARN de células productoras de anticuerpos. Véase, por ejemplo, Larrick y Fry, *Methods*, 2: 106-10, 1991.  
35

Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son moléculas quiméricas de inmunoglobulinas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tales como  $Fv$ ,  $Fab$ ,  $Fab'$ ,  $F(ab')_2$  u otras subsecuencias de unión a antígeno de anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo de receptor) en las que los restos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor se sustituyen por restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo de donante) tal como ratón, rata o conejo, que tenga la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos flanqueantes de  $Fv$  de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los restos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo de receptor ni en la CDR o las secuencias flanqueantes importadas. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno y, normalmente dos dominios variables, donde todas o sustancialmente todas las regiones CDR se corresponden con las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana.  
40

El anticuerpo humanizado también comprenderá de forma óptima al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina ( $Fc$ ), normalmente la de una inmunoglobulina humana [Jones y col., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann y col., *Nature*, 332: 323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992)].  
45

Se conocen bien en la técnica procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos aminoacídicos introducidos en el mismo de una fuente que no es humana. Estos restos aminoacídicos no humanos se denominan con frecuencia restos importados que se toman normalmente a partir de un dominio variable importado. La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores [Jones y col., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann y col., *Nature* 332: 323-327 (1988); Verhoeyen y col., *Science*, 239: 1534-1536 (1988)], sustituyendo las CDR o secuencias de CDR de roedor a las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos humanizados son  
50

anticuerpos quiméricos (Patente de Estados Unidos N° 4.816.567), donde sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos restos de CDR y posiblemente algunos restos de FR se sustituyen por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

- 5 También pueden producirse anticuerpos humanos usando diversos procedimientos conocidos en la técnica incluyendo bibliotecas de presentación en fagos [Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381 (1991); Marks y col., J. Mol. Biol., 222: 581 (1991)]. Las técnicas de Cole y col. y Boerner y col. también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole y col., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, pág. 77 (1985) y Boerner y col., J. Immunol., 147 (1): 86-95 (1991)]. De forma similar, pueden generarse anticuerpos humanos introduciendo loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógenos se han inactivado parcialmente o completamente. Tras la exposición, se observa producción de anticuerpos humanos, que se parece mucho a la observada en seres humanos en todos los aspectos, incluyendo reorganización de genes, ensamblaje y repertorio de anticuerpos. Esta estrategia se describe, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N° 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, y en las publicaciones científicas siguientes: Marks y col., Bio/Technology 10, 779-783 (1992); Lonberg y col., Nature 368 856-859 (1994); Morrison, Nature 368 812-13 (1994); Fishwild y col., Nature Biotechnology 14, 845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14, 826 (1996); Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13 65-93 (1995).

Se apreciará que una vez que se identifican las CDR de un anticuerpo, usando técnicas de modificación por ingeniería genética convencionales, pueden usarse para elaborar polinucleótidos que puedan expresarse que codifiquen cualquiera de las formas o fragmentos de anticuerpos descritos en este documento.

*Un complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I humano:*

El complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) es un complejo de antígenos codificado por un grupo de loci relacionados que se denominan en conjunto H-2 en el ratón y HLA en seres humanos. Las dos clases principales de los antígenos de MHC clase I y clase II comprenden cada una un conjunto de glicoproteínas de superficie celular que desempeñan un papel en la determinación del tipo tisular y compatibilidad de trasplantes. En reacciones de trasplante, las células T citotóxicas (CTL) responden principalmente contra glicoproteínas clase I extrañas mientras que las células T auxiliares responden principalmente contra glicoproteínas clase II extrañas.

Las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I se expresan en la superficie de casi todas las células. Estas moléculas funcionan presentando péptidos que proceden principalmente de proteínas sintetizadas endógenamente a células T CD8 más mediante una interacción con el receptor de células T  $\alpha\beta$ . La molécula de MHC clase I es un heterodímero compuesto por una cadena pesada de 46 kDa que se asocia de forma no covalente con la cadena ligera de 12 kDa  $\beta$ -2 microglobulina. En seres humanos, existen varios haplotipos de MHC, tales como, por ejemplo, HLA-A2, HLA-A1, HLA-A3, HLA-A24, HLA-A28, HLA-A31, HLA-A33, HLA-A34, HLA-B7, HLA-B45 y HLA-Cw8, pudiendo encontrarse sus secuencias en la base de datos de kabbat <http://immuno.bme.nwu.edu/>.

*Péptidos que se unen a moléculas de MHC clase I; antígenos restringidos por HLA*

Los péptidos restringidos por MHC clase I (también denominados en este documento indistintamente antígenos restringidos por HLA, péptidos restringidos por HLA, antígenos restringidos por MHC) que son normalmente de 8-10 aminoácidos de longitud se unen a la hendidura  $\alpha$ 1- $\alpha$ 2 de la cadena pesada a través de dos o tres restos de anclaje que interactúan con los bolsillos de unión correspondientes en la molécula de MHC. La cadena  $\beta$ -2 microglobulina desempeña un papel importante en el transporte intracelular de MHC clase I, la unión a péptido y la estabilidad conformacional. Para la mayoría de moléculas clase I, la formación de un heterodímero que consiste en la cadena pesada de MHC clase I, un péptido (propio o antigénico) y  $\beta$ -2 microglobulina, es necesaria para la maduración biosintética y la expresión en superficie celular.

Estudios de investigación realizados sobre la unión de péptidos a moléculas de MHC clase I permiten definir motivos de MHC específicos funcionales para presentar péptidos procedentes de antígenos virales, tumorales y propios que sean potencialmente inmunogénicos y pudieran generar una respuesta específica de linfocitos T citotóxicos (CTL).

Como se usa en este documento, el término "péptido" se refiere a péptidos nativos (productos de degradación o péptidos sintetizados sintéticamente) y adicionalmente a peptidomiméticos, tales como peptoides y semipeptoides que son análogos peptídicos que pueden tener, por ejemplo, modificaciones que hacen a los péptidos más estables mientras estén en un cuerpo, o más inmunogénicos. Dichas modificaciones incluyen, pero sin limitación, ciclación, modificación N-terminal, modificación C-terminal, modificación de enlaces peptídicos incluyendo, pero sin limitación,  $\text{CH}_2\text{-NH}$ ,  $\text{CH}_2\text{-S}$ ,  $\text{CH}_2\text{S=O}$ ,  $\text{O=C-NH}$ ,  $\text{CH}_2\text{-O}$ ,  $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ ,  $\text{S=C-NH}$ ,  $\text{CH=CH}$  o  $\text{CF=CH}$ , modificación de la cadena principal y modificación de restos. Se conocen bien en la técnica procedimientos para preparar compuestos peptidomiméticos y se especifican en Quantitative Drug Design, C. A. Ramsden Gd., Capítulo 17.2, F. Choplin Pergamon Press (1992). Se proporcionan en este documento a continuación detalles adicionales a este respecto.

Como se usa en este documento en la memoria descriptiva y en la sección de reivindicaciones a continuación, se entiende que el término "aminoácido" incluye los 20 aminoácidos de origen natural; los aminoácidos modificados con frecuencia postraduccionalmente *in vivo* incluyendo, por ejemplo, hidroxiprolina, fosfoserina y fosfotreonina; y otros

aminoácidos poco habituales incluyendo, pero sin limitación, ácido 2-aminoadípico, hidroxilisina, isodesmosina, norvalina, norleucina y ornitina. Además, el término "aminoácido" incluye aminoácidos tanto D como L. La elaboración adicional de los aminoácidos posibles que pueden usarse de acuerdo con la presente invención y ejemplos de aminoácidos no naturales útiles en antígenos peptídicos reconocibles por MHC-I HLA-A2 se proporcionan en este documento a continuación.

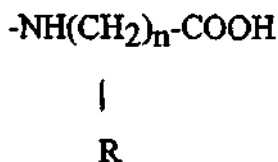
Basándose en los datos experimentales acumulados, en la actualidad es posible predecir cuáles de los péptidos de una proteína se unirán a MHC clase I. El MHC clase I HLA-A2 se ha caracterizado hasta ahora mejor que otros haplotipos de HLA, aunque están disponibles datos predictivos y/o esporádicos para todos los demás haplotipos.

Con respecto a los péptidos de unión a HLA-A2, se asumen las siguientes posiciones (P1-P9) en un péptido de 9 aminoácidos:

P1-P2-P3-P4-P5-P6-P7-P8-P9

Las posiciones P2 y P2 incluyen los restos de anclaje que son los restos principales que participan en la unión a moléculas de MHC. Los restos aminoacídicos que se acoplan en las posiciones P2 y P9 son aminoácidos naturales no cargados alifáticos hidrófilos (siendo ejemplos Ala, Val, Leu, Ile, Gln, Thr, Ser, Cys, preferentemente Val y Leu) o de un aminoácido no cargado alifático hidrófilo no natural (siendo ejemplos norleucina (Nle), norvalina (Nva), ácido  $\alpha$ -aminobutírico). También se sabe que las posiciones P1 y P3 incluyen restos aminoacídicos que participan o contribuyen a la unión a moléculas de MHC, sin embargo estas posiciones pueden incluir cualquier aminoácido natural o no natural. Las otras posiciones se acoplan por restos aminoacídicos que normalmente no participan en la unión, sino que estos aminoácidos se presentan a las células inmunes. Pueden encontrarse detalles adicionales que se refieren a la unión de péptidos a moléculas de MHC en Parker, K. C., Bednarek, M. A., Coligan, J. E., Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. J Immunol. 152, 163-175, 1994., véase la Tabla V, en particular. Por lo tanto, la puntuación de péptidos de unión a HLA-A2.1 puede realizarse usando el programa informático HLA Peptide Binding Predictions accesible a través de una interfaz de página web en la dirección [http://www.bimas.dcrct.nih.gov/molbio/hla\\_bind/index.html](http://www.bimas.dcrct.nih.gov/molbio/hla_bind/index.html). Este programa informático se basa en datos y puntuaciones acumuladas de cada péptido posible en una proteína analizada para determinar su unión posible a MHC HLA-A2.1 de acuerdo con la contribución de cada aminoácido en el péptido. Las puntuaciones de unión teóricas representan la semivida calculada del complejo de HLA-A2.1-péptido.

Pueden sustituirse aminoácidos naturales alifáticos hidrófilos en P2 y P9 por aminoácidos sintéticos, preferentemente Nleu, Nval y/o ácido  $\alpha$ -aminobutírico. P9 también puede sustituirse por aminoácidos alifáticos de la fórmula general  $-\text{HN}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ , donde  $n = 3-5$ , así como por derivados ramificados de la misma, tales como, pero sin limitación,



donde R es, por ejemplo, metilo, etilo o propilo localizado en cualquiera de uno o más de los n carbonos.

El resto amino terminal (posición P1), puede sustituirse por ácidos carboxílicos alifáticos cargados positivamente, tales como, pero sin limitación,  $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ , donde  $n = 2-4$  y  $\text{H}_2\text{N}-\text{C}(\text{NH})-\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ , donde  $n = 2-3$ , así como por hidroxil-lisina, N-metil-lisina u ornitina (Orn). Además, el resto amino terminal puede sustituirse por restos aromáticos extendidos tales como, pero sin limitación,  $\text{H}_2\text{N}-(\text{C}_6\text{H}_6)-\text{CH}_2-\text{COOH}$ , p-aminofenilalanina,  $\text{H}_2\text{N}-\text{F}(\text{NH})-\text{NH}-(\text{C}_6\text{H}_6)-\text{CH}_2-\text{COOH}$ , p-guanidinofenilalanina o piridinoalanina (Pal). Estos últimos restos pueden formar un enlace de hidrógeno con los restos  $\text{OH}^-$  de los restos tirosina en el bolsillo de unión N-terminal de MHC-1, así como generar al mismo tiempo interacciones entre compuestos aromáticos.

La derivatización de restos aminoacídicos en posiciones P4-P8, debiendo tener estos restos una cadena lateral, tal como OH, SH o  $\text{NH}_2$ , como Ser, Tyr, Lys, Cys u Orn, puede ser por alquilo, arilo, alcanóilo o aroílo. Además, los grupos OH en estas posiciones también pueden derivatizarse por fosforilización y/o glicosilación. Se ha demostrado en algunos casos que estas derivatizaciones potencian la unión al receptor de célula T.

Los derivados más largos en los que el segundo aminoácido de anclaje está en posición P10 pueden incluir en P9 la mayoría de aminoácidos L. En algunos casos también son aplicables derivados más cortos en los que el ácido C terminal sirve como el segundo resto de anclaje.

Los derivados de aminoácidos cíclicos pueden acoplarse en posición P4-P8, preferentemente en posiciones P6 y P7. Puede obtenerse ciclación por formación de enlaces amida, por ejemplo, por incorporación de Glu, Asp, Lys, Orn, ácido di-aminobutírico (Dab), ácido di-aminopropiónico (Dap) en diversas posiciones en la cadena (enlaces  $-\text{CO}-\text{NH}$  o  $-\text{NH}-\text{CO}$ ). También puede obtenerse ciclación de cadena principal con cadena principal por incorporación de aminoácidos modificados de las fórmulas  $\text{H}-\text{N}((\text{CH}_2)_n-\text{COOH})-\text{C}(\text{R})\text{H}-\text{COOH}$  o  $\text{H}-\text{N}((\text{CH}_2)_n-\text{COOH})-\text{C}(\text{R})\text{H}-\text{NH}_2$ , donde

n = 1-4 y adicionalmente donde R es cualquier cadena lateral natural o no natural de un aminoácido.

5 También es posible la ciclación por formación de enlaces S-S por incorporación de dos restos Cys. Puede obtenerse ciclación de cadena lateral con cadena lateral adicional por formación de un enlace de interacción de la fórmula  $-(\text{-CH}_2\text{-})_n\text{-S-CH}_2\text{-C-}$ , donde n = 1 o 2, que es posible, por ejemplo, por incorporación de Cys u homoCys y reacción de su grupo SH libre con, por ejemplo, Lys, Orn, Dab o Dap bromoacetilado.

10 Pueden sustituirse enlaces peptídicos (-CO-NH-) dentro del péptido por enlaces N-metilados (-N(CH<sub>3</sub>)-CO-), enlaces éster (-C(R)H-C-O-O-C(R)-N-), enlaces cetometileno (-CO-CH<sub>2</sub>-), enlaces α-aza (-NH-N(R)-CO-), donde R es cualquier alquilo, por ejemplo, metilo, enlaces carba (-CH<sub>2</sub>-NH-), enlaces hidroxietileno (-CH(OH)-CH<sub>2</sub>-), enlaces tioamida (-CS-NH-), dobles enlaces olefínicos (-CH=CH-), enlaces retroamida (-NH-CO-), derivados peptídicos (-N(R)-CH<sub>2</sub>-CO-), donde R es la cadena lateral "normal", presente de forma natural en el átomo de carbono.

Estas modificaciones pueden darse en cualquiera de los enlaces a lo largo de la cadena peptídico, e incluso en varios (2-3) al mismo tiempo. Preferentemente, pero no necesariamente en todos los casos, estas modificaciones deberían excluir aminoácidos de anclaje.

15 Los aminoácidos aromáticos naturales, Trp, Tyr y Phe pueden sustituirse por ácidos no naturales sintéticos tales como TIC, naftilelanina (Nol), derivados de anillo metilado de Phe, derivados halogenados de Phe o o-metil-Tyr.

***Antígenos restringidos por HLA tumorales***

20 Las referencias enumeradas en la siguiente Tabla proporcionan ejemplos de péptidos restringidos por HLA tumorales de MHC clase I humana derivados de antígenos asociados con tumores (TAA) o marcadores proteicos asociados con diversos cánceres. Pueden encontrarse péptidos restringidos por HLA tumorales adicionales derivados de antígenos asociados con tumores (TAA) en <http://www.bmi-heidelberg.com/syfpeithi/>

Cáncer	TAA/Marcador	HLA	Referencia
Carcinoma de células de transición	Uroplaquina II	HLA-A2	WO 00/06723
Carcinoma de células de transición	Uroplaquina la	HLA-A2	WO 00/06723
Carcinoma de la próstata	antígeno específico de próstata	HLA-A2	WO 00/06723
Carcinoma de la próstata	antígeno de membrana específico de próstata	HLA-A2	WO 00/06723
Carcinoma de la próstata	fosfatasa ácida de próstata	HLA-A2	WO 00/06723
Cáncer de mama	BA-46	HLA-A2	WO 00/06723
Cáncer de mama	Muc-1	HLA-A2	WO 00/06723
Melanoma	Gp100	HLA-A2	Referencia 54
Melanoma	MART1	HLA-A2	Referencia 54
Todos los tumores	Telomerasa	HLA-A2	Referencia 54
Leucemia	TAX	HLA-A2	Referencia 54
Carcinomas	NY-ESO	HLA-A2	Referencia 54
Melanoma	MAGE-A1	HLA-A2	Referencia 54
Melanoma	MAGE-A3	HLA-A24	Referencia 54
Carcinomas	HER2	HLA-A2	Referencia 54
Melanoma	Beta-catenina	HLA-A24	Referencia 54
Melanoma	Tirosinasa	HLA-DRB1	Referencia 54
Leucemia	Bcr-abl	HLA-A2	Referencia 54
Cabeza y cuello	Caspasa 8	HLA-B35	Referencia 54

**Antígenos restringidos por HLA virales**

Las referencias enumeradas en la siguiente Tabla proporcionan ejemplos de péptidos restringidos por HLA virales de MHC clase I humano derivados de antígenos virales asociados con diversos cánceres.

Enfermedad	Antígeno viral	HLA	Referencia
SIDA (HTLV-1)	HIV-1 RT 476-484	HLA-A2	<a href="http://www.bmi-heidelberg.com/syfpeithi/">http://www.bmi-heidelberg.com/syfpeithi/</a>
Gripe	GILGFVFTL (SEC ID N°:10)	HLA-A2	<a href="http://www.bmi-heidelberg.com/syfpeithi/">http://www.bmi-heidelberg.com/syfpeithi/</a>
Enfermedad por CMV	CMV	HLA-A2	<a href="http://www.bmi-heidelberg.com/syfpeithi/">http://www.bmi-heidelberg.com/syfpeithi/</a>
Linfoma de Burkitts	TAX	HLA-A2	<a href="http://www.bmi-heidelberg.com/syfpeithi/">http://www.bmi-heidelberg.com/syfpeithi/</a>
Hepatitis C	HCV	HLA-A2	<a href="http://www.bmi-heidelberg.com/syfpeithi/">http://www.bmi-heidelberg.com/syfpeithi/</a>
Hepatitis B	Preproteína S de HBV 85-66 STNRQSGRQ (SEC ID N°:11)	HLA-A2	<a href="http://www.bmi-heidelberg.com/syfpeithi/">http://www.bmi-heidelberg.com/syfpeithi/</a>
Leucemia por HTLV-1	HTLV-1 tax 11-19	HLA-A2	<a href="http://www.bmi-heidelberg.com/syfpeitbi/">http://www.bmi-heidelberg.com/syfpeitbi/</a>
Hepatitis	Antígeno superficial de HBV 185-194	HLA-A2	<a href="http://www.bmi-heidelberg.com/syfpeithi/">http://www.bmi-heidelberg.com/syfpeithi/</a>

5

**Antígenos restringidos por HLA autoinmunes**

La página web <http://www.bmi-heidelberg.com/syfpeithi/> proporciona ejemplos de péptidos restringidos por HLA autoinmunes de MHC clase I humano derivados de antígenos autoinmunes.

**Moléculas MHC clase I solubles**

- 10 Se describen complejos de MHC clase I y clase II recombinantes que son solubles y que pueden producirse en grandes cantidades, por ejemplo, en las referencias 23, 24 y 41-53 y adicionalmente en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 09/534.966 y PCT/IL01/00260 (publicada como documento WO 01/72768). Están disponibles moléculas de MHC clase I solubles o pueden producirse para cualquiera de los haplotipos de MHC, tales como, por ejemplo, HLA-A2, HLA-A1, HLA-A3, HLA-A24, HLA-A28, HLA-A31, HLA-A33, HLA-A34, HLA-B7, HLA-B45 y
- 15 HLA-Cw8, siguiendo, por ejemplo, los contenidos del documento PCT/IL01/00260, ya que se conocen sus secuencias y pueden encontrarse en la base de datos de kabbat en la dirección <http://immuno.bme.nwu.edu/>. Dichas moléculas de MHC clase I solubles pueden cargarse con antígenos restringidos por HLA adecuados y usarse para la vacunación de mamíferos no humanos que tienen células que expresan el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I humano, como se detalla adicionalmente en este documento a continuación.

- 20 **Mamíferos no humanos que tienen células que expresan el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I humano**

Pueden producirse mamíferos no humanos que tienen células que expresan un complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I humano y desprovistos de complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I propio usando (i) la información de secuencia proporcionada en la base de datos de kabbat en la

dirección <http://immuno.bme.nwu.edu/> que pertenece a haplotipos de MHC humano, tales como, por ejemplo, HLA-A2, HLA-A1, HLA-A3, HLA-A24, HLA-A28, HLA-A31, HLA-A33, HLA-A34, HLA-B7, HLA-B45 y HLA-Cw8, (ii) técnicas de preparación de construcciones convencionales como se describen en, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook y col., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel y col., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley y Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson y col., "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren y col. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); y (iii) técnicas de introducción/anulación de genes convencionales como se exponen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos 5.487.992, 5.464.764, 5.387.742, 5.360.735, 5.347.075, 5.298.422, 5.288.846, 5.221.778, 5.175.385, 5.175.384, 5.175.383, 4.736.866; en las Publicaciones Internacionales WO 94/23049, WO93/14200, WO 94/06908 y WO 94/28123; así como en Burke y Olson, Methods in Enzymology, 194: 251-270, 1991; Capecchi, Science 244: 1288-1292, 1989; Davies y col, Nucleic Acids Research, 20 (11) 2693-2698, 1992; Dickinson y col, Human Molecular Genetics, 2 (8): 1299-1302, 1993; Duff y Lincoln, "Insertion of a pathogenic mutation into a yeast artificial chromosome containing the human APP gene and expression in ES cells", Research Advances in Alzheimer's Disease and Related Disorders, 1995; Huxley y col, Genomics, 9: 742-750 1991; Jakobovits y col, Nature, 362: 255-261, 1993; Lamb y col, Nature Genetics, 5: 22-29, 1993; Pearson y Choi, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993. 90: 10578-82; Rothstein, Methods in Enzymology, 194: 281-301, 1991; Schedl y col, Nature, 362: 258-261, 1993; Strauss y col, Science, 259: 1904-1907, 1993.

Es de interés particular el artículo por Pascolo y col, publicado en J. Exp. Med. 185: 2043-2051, 1997, que describe la preparación de ratones que expresan las moléculas de MHC clase I HLA-A2.1, H-2Db y HHD humanas y desprovistos totalmente de MHC clase I de ratón.

#### **Restos identificables**

En algunos aspectos de la misma, la presente invención emplea conjugados de un anticuerpo y un resto identificable. Con este fin, en un ejemplo, un primer y un segundo polinucleótidos que codifican el anticuerpo y el resto identificable, respectivamente, se ligan en fase de lectura para codificar un inmunomarcador. La siguiente tabla proporciona ejemplos de secuencias de restos identificables.

Resto identificable	Secuencia de aminoácidos (Nº de Acceso Genebank)	Secuencia de ácido nucleico (Nº de Acceso Genebank)
Proteína verde fluorescente	AAL33912	AF435427
Fosfatasa alcalina	AAK73766	AY042185
Peroxidasa	NP_568674	NM_124071
Marcador de histidina	AAK09208	AF329457
Marcador myc	AF329457	AF329457
Marcador biotina ligasa	NP_561589	NC_003366
Proteína naranja fluorescente	AAL33917	AF435432
Beta galactosidasa	NM_125776	NM_125776
Isotiocianato de fluoresceína	AAF22695	AF098239
Estreptavidina	S11540	S11540

#### **Restos terapéuticos**

En algunos aspectos de la misma, la presente invención emplea conjugados de un anticuerpo y un resto terapéutico. Con este fin, en un ejemplo, un primer y un segundo polinucleótidos que codifican el anticuerpo y el resto terapéutico, respectivamente, se ligan en fase de lectura para codificar una inmunotoxina. La siguiente tabla proporciona ejemplos de secuencias de restos terapéuticos.

Resto terapéutico	Secuencia de aminoácidos (Nº de Acceso Genebank)	Secuencia de ácido nucleico (Nº de Acceso Genebank)
Exotoxina de Pseudomonas	AAB25018	S53109
Toxina de difteria	E00489	E00489
interleucina 2	CAA00227	A02159
CD3	P07766	X03884
CD16	AAK54251	AF372455
interleucina 4	P20096	ICRT4
HLA-A2	P01892	K02883
interleucina 10	P22301	M57627
Toxina ricina A	225988	A23903

### **Conjugados químicos**

5 Se conocen muchos procedimientos en la técnica para conjugar o fusionar (acoplar) moléculas de diferentes tipos, incluyendo péptidos. Estos procedimientos pueden usarse de acuerdo con la presente invención para acoplar a un anticuerpo otro resto, tal como un resto terapéutico o un resto identificable, para proporcionar de este modo una inmunotoxina o inmunomarcador.

10 Dos péptidos aislados pueden conjugarse o fusionarse usando cualquier procedimiento de conjugación conocido por un especialista en la técnica. Un péptido puede conjugarse con un anticuerpo de interés, usando un éster de N-hidroxisuccinimida del ácido 3-(2-piridiltio)propiónico (también denominado N-succinimidil 3-(2-piridilditio)propionato ("SDPD") (Sigma, N° Cat. P-3415), un procedimiento de conjugación con glutaraldehído o un procedimiento de conjugación con carbodiimida.

### **Conjugación con SPDP**

15 Puede usarse cualquier procedimiento de conjugación con SPDP conocido por los especialistas en la técnica. Por ejemplo, en una realización ilustrativa se usa una modificación del procedimiento de Cumber y col. (1985, Methods of Enzymology 112: 207-224) como se describe a continuación.

Un péptido, tal como un resto identificable o terapéutico, (1,7 mg/ml) se mezcla con un exceso de 10 veces de SPDP (50 mM en etanol) y el anticuerpo se mezcla con un exceso de 25 veces de SPDP en fosfato sódico 20 mM, NaCl 0,10 M pH 7,2 y cada una de las reacciones incubadas, por ejemplo, durante 3 horas a temperatura ambiente. Después las reacciones se dializan contra PBS.

20 El péptido se reduce, por ejemplo, con DTT 50 mM durante 1 hora a temperatura ambiente. El péptido reducido se desaliniza por equilibrado en una columna G-25 (hasta el 5 % del volumen de muestra/columna) con  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM pH 6,5. El péptido reducido se combina con el SPDP-anticuerpo en una proporción molar de 1:10 de anticuerpo:péptido y se incuba a 4 °C durante una noche para formar un conjugado de péptido-anticuerpo.

### **Conjugación con glutaraldehído**

25 La conjugación de un péptido (por ejemplo, un resto identificable o terapéutico) con un anticuerpo puede realizarse por procedimientos conocidos por los especialistas en la técnica usando glutaraldehído. Por ejemplo, en una realización ilustrativa, se usa el procedimiento de conjugación por G. T. Hermanson (1996, "Antibody Modification and Conjugation, en Bioconjugate Techniques", Academic Press, San Diego) descrito a continuación.

30 El anticuerpo y el péptido (1,1 mg/ml) se mezclan en un exceso de 10 veces con glutaraldehído al 0,05 % en fosfato 0,1 M, NaCl 0,15 M pH 6,8 y se deja reaccionar durante 2 horas a temperatura ambiente. Puede añadirse lisina 0,01 M para bloquear los sitios en exceso. Después de la reacción, el glutaraldehído en exceso se elimina usando una columna G-25 equilibrada con PBS (10 % v/v de volúmenes de muestra/columna).



### Conjugación con carbodiimida

La conjugación de un péptido con un anticuerpo puede realizarse por procedimientos conocidos por los especialistas en la técnica usando un agente de deshidratación tal como una carbodiimida. Más preferentemente, la carbodiimida se usa en presencia de 4-dimetil aminopiridina. Como saben bien los especialistas en la técnica, puede usarse la conjugación con carbodiimida para formar un enlace covalente entre un grupo carboxilo de péptido y un grupo hidroxilo de un anticuerpo (dando como resultado la formación de un enlace éster) o un grupo amino de un anticuerpo (dando como resultado la formación de un enlace amida) o un grupo sulfhidrilo de un anticuerpo (dando como resultado la formación de un enlace tioéster).

Así mismo, puede usarse el acoplamiento con carbodiimida para formar enlaces covalentes análogos entre un grupo carbono de un anticuerpo y un grupo hidroxilo, amino o sulfhidrilo del péptido. Véase, en general, J. March, *Advanced Organic Chemistry: Reaction's, Mechanism, and Structure*, págs. 349-50 y 372-74 (3ª ed.), 1985. A modo de ilustración, y sin limitación, el péptido se conjuga con un anticuerpo mediante un enlace covalente usando una carbodiimida, tal como dicitclohexilcarbodiimida. Véanse en general los procedimientos de conjugación por B. Neises y col. (1978, *Angew Chem., Int. Ed. Engl.* 17: 522; A. Hassner y col. (1978, *Tetrahedron Lett.* 4475); E. P. Boden y col. (1986, *J. Org. Chem.* 50: 2394) y L. J. Mathias (1979, *Synthesis* 561).

Objetos, ventajas y nuevas características adicionales de la presente invención se harán evidentes para un especialista en la técnica tras el examen de los siguientes ejemplos, que no pretenden ser limitantes. Además, cada una de las diversas realizaciones y aspectos de la presente invención como se ha descrito en este documento anteriormente y como se reivindican en la sección de reivindicaciones a continuación encuentra apoyo experimental en los siguientes ejemplos.

### Ejemplos

Ahora se hace referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores, ilustran la invención de una forma no limitante.

Generalmente, la nomenclatura usada en este documento y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Dichas técnicas se explican minuciosamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook y col., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel y col., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson y col., "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren y col. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías como se exponen en las Patentes de Estados Unidos N° 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volúmenes I-IV Cellis, J. E., ed. (1994); "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" por Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Tercera Edición; "Current Protocols in Immunology" Volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites y col. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8ª Edición), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., Nueva York (1980); los inmunoensayos disponibles se describen ampliamente en la bibliografía de patentes y científica, véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak y col., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); incorporándose todas por referencia como si se expusieran con todo detalle en este documento. Se proporcionan otras referencias generales por todo este documento. Se piensa que los procedimientos en las mismas son bien conocidos en la técnica y se proporcionan para la comodidad del lector.

### Materiales y métodos experimentales

#### Producción de complejos de scMHC/péptido biotinilados

Se produjeron complejos de MHC de cadena sencilla/péptido por replegamiento *in vitro* de cuerpos de inclusión producidos en *E. coli*, como se ha descrito anteriormente (23, 24, Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 09/534.966 y PCT/IL01/00260 (publicada como documento WO 01/72768). Se realizó la biotinilación usando la enzima BirA (Avidity, Denver, CO) como se ha descrito anteriormente (25).

#### Inmunización de ratones

Se inmunizaron ratones anulados D<sup>b</sup>/ X β2 microglobulina (β2m), transgénicos para un HLA-A2.1/D<sup>b</sup>-cadena sencilla

$\beta$ 2 microglobulina recombinante (ratones HHD) (26) con una emulsión que contenía péptido de tuberculina derivado de proteína purificada (PPD) covalentemente acoplado con complejos de HLA-A2/G9-209 como se ha descrito anteriormente (17). En resumen, los ratones se inmunizaron inicialmente por vía subdérmica y posteriormente por vía subcutánea durante intervalos de dos semanas durante un periodo de 3-5 meses con 20-30  $\mu$ g/ratón de la mezcla antigénica en adyuvante incompleto de Freund. Se recogieron los bazo dos semanas después de la última inmunización.

#### **Construcción de biblioteca y selección de anticuerpos en fagos en complejos biotinilados**

Se aisló el ARN total de ratones inmunizados y se construyó una biblioteca de anticuerpo scFv mediante PCR a temperatura ambiente a partir de la ARNm como se describe (27). El repertorio de scFv se clonó como un fragmento de Sfil-NotI en los vectores fagémidos pCANTAB5E o pCC-CBD (28). La complejidad de ambas bibliotecas era de  $1 \times 10^8$  clones independientes. Para la selección, se incubaron complejos de scHLA-A2/G9-209M biotinilados (20  $\mu$ g) con perlas magnéticas recubiertas de estreptavidina ( $2 \times 10^8$ ), se lavaron y se incubaron con  $10^{11}$  ufc de las bibliotecas (1 hora a temperatura ambiente). Partiendo con la 2ª vuelta, se realizó la selección en presencia de un exceso (5  $\mu$ g) de complejos de scHLA-A2/G9-280V. Se lavaron las perlas exhaustivamente 10-12 veces con MPBS al 2 % + TWEEN20 al 0,1 %. Los fagos unidos se eluyeron usando 1 ml de Trietilamina (100 mM, pH 12) durante 5 minutos a temperatura ambiente seguido de neutralización con 0,1 ml de Tris-HCl 1 M, pH 7,4. Los fagos eluidos se expandieron en células E. coli TG1 en fase de crecimiento exponencial que después se superinfectaron con fago auxiliar M13K07 como se describe (28).

#### **Expresión y purificación de scFv recombinante soluble y proteína de fusión scFv-P38**

El gen de G1 scFv se rescató del clon de fago mediante PCR y se subclonó en el vector fagémido pCANTAB6 mediante el uso de los sitios de clonación Sfil-NotI. Se fusionaron marcadores Myc y hexahistidina con el extremo C-terminal del gen de scFv. El anticuerpo scFv se expresó en células BL21  $\lambda$ DE3 como se ha descrito anteriormente (29) y se purificó a partir de la fracción periplásmica mediante cromatografía de afinidad por iones metálicos. Para la expresión de la proteína de fusión G1scFv-PE38, el gen de scFv se subclonó como un fragmento Ncol-NotI en el plásmido pIB-NN, que codifica los dominios de translocación y ADP-ribosilación de PE (PE38). La expresión en células BL21  $\lambda$ DE3, el repliegamiento a partir de cuerpos de inclusión y la purificación de G1scFv-PE38 se realizó como se ha descrito anteriormente (30).

#### **ELISA con clones de fagos y scFv o scFv-PE38 purificado**

Se realizaron estudios de especificidad de unión mediante ELISA usando complejos de scMHC-péptido biotinilados. En resumen, se recubrieron placas de ELISA (Falcon) durante una noche con BSA-biotina (1  $\mu$ g/pocillo), se lavaron, se incubaron (1 hora, a temperatura ambiente) con estreptavidina (1  $\mu$ g/pocillo), se lavaron de nuevo exhaustivamente y se incubaron adicionalmente (1 hora, a temperatura ambiente) con 0,5  $\mu$ g de complejos de MHC/péptido. Las placas se bloquearon con PBS/leche al 2 % (30 minutos, a temperatura ambiente), se incubaron con clones de fagos (aproximadamente  $10^9$  fagos/pocillo, 1 hora, a temperatura ambiente) o 0,5-1  $\mu$ g de scFv o scFv-PE38 soluble y después se lavaron con 1:1000 de anti-M13 conjugado con HRP, anticuerpo anti-myc o anticuerpo anti-PE, respectivamente. Los péptidos restringidos por HLA-A2 usados para estudios de especificidad eran gp100 (154): KTWGQYWQV (SEC ID N°: 1); gp100 (209): IMDQVPFSV (SEC ID N°: 2); gp100 (280): YLEPGPVTV (SEC ID N°: 3); MUC1: LLLVLTVL (SEC ID N°: 4); HTLV-1 (TAX): LLFGYPVYV (SEC ID N°: 5); hTE temperatura ambiente (540): ILAKFLHWL (SEC ID N°: 6); hTE temperatura ambiente (865): RLVDDFLLV (SEC ID N°: 7).

#### **Citometría de flujo**

La línea de células B RMAS-HHD transfectada con un gen de  $\beta$ 2M-HLA-A2 de cadena sencilla (26) o las células JY linfoblásticas B transformadas con EBV ( $10^6$  células) se lavaron dos veces con RPMI sin suero y se incubaron durante una noche a 26 °C o 37 °C, respectivamente, en medio que contenía 100  $\mu$ M del péptido. Las APC se incubaron posteriormente a 37 °C durante 2-3 horas para estabilizar la expresión en superficie celular de complejos de MHC-péptidos seguido de incubación con scFv recombinante (10-50  $\mu$ g/ml, 60-90 minutos, 4 °C) en 100  $\mu$ l. Después, las células se lavaron, se incubaron con anticuerpo anti-Myc marcado con FITC (30-45 minutos, 4 °C) y por último se lavaron y se analizaron mediante un citómetro de flujo FACStar (Becton Dickinson).

#### **Ensayos de unión de competición**

Se recubrieron placas de ELISA flexibles con BSA-biotina y se inmovilizaron en las mismas complejos de scMHC-péptido (10  $\mu$ g en 100  $\mu$ l). El G1scFv-PE38 recombinante se marcó con [ $^{125}$ I] usando el reactivo de Bolton-Hunter. Se añadió proteína marcada a los pocillos con un indicador ( $3-5 \times 10^5$  CPM/pocillo) en presencia de concentraciones crecientes del G1scFv-PE38 frío como competidor y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora en PBS. Las placas se lavaron minuciosamente con PBS y se determinó la radiactividad unida mediante un contador gamma. La afinidad aparente del G1scFv-PE38 se determinó por extrapolación de la concentración de un competidor necesario para conseguir una inhibición del 50 % de la unión de G1scFv-PE38 marcado con [ $^{125}$ I] al complejo de scMHC-péptido inmovilizado. Se determinó la unión inespecífica por adición de un exceso de 20-40 veces de Fab sin marcar.

### **Ensayos de citotoxicidad**

Se cargaron APC RMAS-HHD y JY con el péptido G9-209 y péptidos de control como se ha descrito anteriormente. Las células cargadas con péptido se incubaron posteriormente con concentraciones crecientes de G1scFv-PE38 y la inhibición de la síntesis de proteínas se determinó por medición de la captación de <sup>3</sup>H-Leucina en proteínas celulares, como se ha descrito previamente (30). Se determinó la CI<sub>50</sub> como la concentración de G1scFv-PE38 necesaria para inhibir la síntesis de proteína el 50 %. En ensayos de competición, se añadió un exceso de complejos de HLA-A2-péptido específicos e inespecíficos (35-50 µg/pocillo) a pocillos 15 minutos antes de la adición de G1scFv-PE38.

### **Resultados experimentales**

#### **10 Generación de complejos de MHC de cadena sencilla-péptido recombinantes con el péptido derivado de gp100 de melanoma G9-209M**

La gp100 es una glicoproteína de membrana específica de linaje de melanocitos que consiste en 661 aminoácidos que se expresan en la mayoría de células de melanoma (19-22). Esta proteína se reconoce por muchos linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) restringidos por HLA-A2 reactivos con melanoma que se han aislado de pacientes con melanoma. Se han identificado varios epítomos restringidos por HLA-A2 de células T en gp100; se han mejorado en las posiciones de anclaje a MHC para una inmunogenicidad aumentada sin alterar la especificidad de célula T (31). El péptido G9-209M (IMDQVPFSV, SEC ID N°: 2) es uno de tres epítomos inmunogénicos principales (19-22). Se generaron complejos de MHC-péptido recombinantes que presentan el péptido G9-209M usando una construcción de MHC de cadena sencilla (scMHC) expresada en *E. coli* que se ha descrito anteriormente (23, 24, Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 09/534.966 y PCT/IL01/00260 (publicada como documento WO 01/72768). Los complejos de scMHC-péptido se producen por plegamiento *in vitro* de cuerpos de inclusión en presencia del G9-209M u otros péptidos restringidos por HLA-A2, seguido de un protocolo de purificación que emplea cromatografía de intercambio iónico. Los complejos de scHLA-A2-péptido plegados derivados de gp100 y de control eran muy puros, homogéneos y monoméricos, como se determinó por análisis en SDS-PAGE y cromatografía de filtración en gel. Se ha demostrado anteriormente que los complejos de scHLA-A2 que contienen G9-209M son funcionales por su capacidad para estimular líneas y clones de CTL específicos y teñir células T específicas de G9-209M en forma de tetrámeros (23, 24).

#### **Construcción de una biblioteca en fago de anticuerpo scFv y selección de un fago que se une a complejos de HLA-A2/G9-209M con especificidad similar a TCR:**

Para los fines de inmunización se acopló PPD al complejo purificado y los ratones anulados D<sup>b</sup>/ X β2 microglobulina (β2m) para un HLA-A2.1/D<sup>b</sup>-cadena sencilla β2 microglobulina recombinante (ratones HHD) (26) se humanizaron con el mismo. Estos ratones combinan la transgénesis de HLA clásica con destrucción selectiva de H-2 clase I murino. Por lo tanto, a diferencia de los transgénicos HLA clásicos, estos ratones mostraban solamente respuestas restringidas por HLA-A2.1 con proteínas multiepítipo tales como virus intactos. Además, se supone que estos ratones son una herramienta útil para la inmunización con complejos de HLA-A2-péptido porque deberían ser enormemente tolerantes a HLA-A2 como un inmunógeno de células B y, por lo tanto, pueden favorecer la generación de una respuesta de anticuerpos dirigida contra el epítipo restringido por MHC cuando está formando un complejo con HLA-A2 (el péptido asociado a tumor específico). Se usó PPD para la conjugación porque es un inmunógeno de célula T altamente reactivo (17).

Se aisló ARNm de bazo total a partir de ratones inmunizados y se realizó su transcripción inversa a ADNc. Se usaron conjuntos específicos de cebadores degenerados para amplificar por PCR los segmentos de ADNc correspondientes a los dominios variables de la cadena pesada y ligera de inmunoglobulina (27). Las combinaciones de PCR de VH y VL se ensamblaron en un repertorio de scFv mediante una reacción de extensión por solapamiento por PCR y posteriormente se clonaron en el vector fagémido pCANTAB5E o en el vector fagémido pCC-Ga16(Fv), en el que el scFv se expresa como una proteína de fusión en fase de lectura con un dominio de unión a celulosa (CBD) (28). Las bibliotecas resultantes se usaron para transducir células *E. coli* TG1 por electroporación y se expresaron como una fusión con la proteína de cubierta de fago minoritaria pIII después del rescate con un fago auxiliar. La complejidad de la biblioteca consistía en 1 x 10<sup>8</sup> clones independientes usando ambos tipos de vectores.

La biblioteca se sometió a 3-4 ciclos de selección seguidos de elución de los fagos unidos y reamplificación en *E. coli*. Para aumentar la eficacia de selección se usaron complejos de scMHC-péptido biotinilados. Se modificó un marcador de secuencia BirA para biotinilación específica de sitio en el extremo C-terminal del gen de HLA-A2 como se ha descrito anteriormente (25). Se emplearon varias estrategias de selección, dando como resultado la más exitosa de las mismas el aislamiento de agentes de unión específicos, y consistiendo en protocolos de selección con una etapa de reducción negativa partiendo de la 2ª ronda de selección. Los complejos biotinilados de HLA-A2/G9-209M específicos se inmovilizaron en perlas magnéticas recubiertas de estreptavidina y la biblioteca se incubó con el complejo inmovilizado en presencia de un gran exceso de complejos de HLA-2 que presentaban un epítipo derivado de gp100 diferente, el péptido G9-280V. Cuando se usa esta estrategia el fago específico de G9-209M se unirá a complejos inmovilizados con estreptavidina-biotina que se capturan mediante una fuerza magnética, mientras que los agentes de unión pan-MHC que no son específicos para el péptido G9-209M en el complejo se unirán al complejo inespecífico en la solución y por lo tanto pueden separarse y eliminarse del fago específico. Como se muestra en la Tabla 1 a

continuación, se observa un enriquecimiento progresivo marcado para fagos que se unen a los complejos inmovilizados después de 3-4 rondas de selección, realizándose dos de las mismas con la estrategia de reducción negativa.

TABLA 1: Selección de fagos en complejos de scHLA-A2/G9-209M

Biblioteca	Ciclo	Aportación	Producción	Enriquecimiento
scFv	1	$1 \times 10^{12}$	$1 \times 10^4$	-
	2	$5 \times 10^{11}$	$1 \times 10^5$	10
	3	$5 \times 10^{11}$	$1 \times 10^9$	10.000
scFv-CBD	1	$5 \times 10^9$	$1 \times 10^4$	-
	2	$5 \times 10^{11}$	$1 \times 10^5$	10
	3	$5 \times 10^{11}$	$1 \times 10^8$	10.000

5

Una 4ª ronda de selección dio como resultado enriquecimientos similares a los observados en la ronda 3.

Se realizó un ELISA de fagos policlonal para determinar la especificidad de fagos sobre complejos de scMHC-péptido recombinantes biotinilados inmovilizados en inmunoplasmas recubiertas con BSA-Biotina-estreptavidina. El espaciador de BSA-biotina-estreptavidina permite la presentación correcta de los complejos, que pueden deformarse por unión directa a plástico. Los fagos analizados ya después de la 2ª y, más espectacularmente después de la 3ª ronda de selección pusieron de manifiesto un patrón de especificidad único dirigido solamente hacia los complejos de HLA-A2 que contenían G9-209M específicos (Figuras 1A-B). No se observó unión con complejos de HLA-A2 de control que presentan el epítipo derivado de gp100, G9-280V o el epítipo derivado de telomerasa 654.

10

15

20

25

Se aislaron clones de fagos monoclonales individuales a partir de la población de fagos de la última ronda de selección (no se observó un enriquecimiento adicional después de la 4ª ronda) y se volvieron a explorar para determinar la especificidad por ELISA de fagos (Figuras 2A-B). De los 93 clones ensayados, 85 (91 %) reaccionaron con el complejo de HLA-A2/G9-209M (Figura 2A). Setenta y siete de los 85 clones reactivos (90 %) reaccionaron específicamente con el complejo de HLA-A2/G9-209 específico pero no con el complejo que contenía G9-280V de control (Figura 2B). Sólo un pequeño porcentaje de los clones (5/93; 5 %) no presentaba especificidad de péptido (Figura 2B). Por lo tanto, el procedimiento de selección proporcionaba un enriquecimiento exitoso de anticuerpos de fagos con especificidad similar a TCR hacia el complejo de HLA-A2/G9-209M. Un análisis de identificación genética por medio de digestión con enzimas de restricción con múltiples puntos de corte puso de manifiesto que 50 clones específicos de HLA-A2/G9-209M positivos tenían un patrón de digestión similar, indicando que eran todos similares (no se muestran los datos). Se obtuvieron resultados similares con las dos bibliotecas. Puesto que se construyeron a partir del mismo material genético (la misma combinación de ARNm), sólo los clones de fagos derivados de la biblioteca pCANTAB5E scFv se caracterizaron adicionalmente.

La secuenciación de ADN de dominios variables VH y VL a partir de 10 clones puso de manifiesto que todos eran idénticos (no se muestran los datos) sugiriendo que todos procedían de un solo acontecimiento combinatorio de VH/VL de anticuerpos productivo.

30

**Caracterización del anticuerpo scFv recombinante soluble con especificidad similar a TCR**

La secuenciación de ADN puso de manifiesto que la secuencia VH del anticuerpo pertenece a las cadenas pesadas de ratón subgrupo III (D) y la secuencia VL a las cadenas ligeras kappa de ratón grupo IV (de acuerdo con Kabat).

35

40

45

La secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 8) y la secuencia de aminoácidos deducida (SEC ID N°: 9) se muestran en la Figura 3A. Para caracterizar adicionalmente la especificidad de unión y las propiedades biológicas del anticuerpo scFv seleccionado, denominado G1, se usaron dos sistemas de expresión; para el primero el scFv se subclonó en el vector fagémido pCANTAB6 en el que un marcador myc y hexahistidina se fusionan con el extremo C-terminal del gen de scFv. El segundo era un sistema de expresión dirigido por el promotor de T7 en el que el gen de scFv se fusiona con una forma truncada de la Exotoxina A de Pseudomonas (PE38) para generar un scFv-inmunotoxina (12). Esta forma truncada de PE contiene los dominios de translocación y ADP-ribosilación de la PE completa pero carece del dominio de unión a células que se sustituye por el fragmento scFv fusionado en el extremo N-terminal de la toxina truncada. El G1 scFv se produjo en células E. coli BL21 (ΔDE3) por secreción y se purificó a partir de fracciones periplásmicas por cromatografía de afinidad por metales usando el marcador de hexahistidina fusionado al extremo C-terminal (Figura 3B). El G1 scFv-PE38 se expresó en células BL21 y tras la inducción con IPTG, se acumularon grandes cantidades de proteína recombinante como cuerpos de inclusión intracelulares. El SDS-PAGE mostraba que los cuerpos de inclusión de cultivos que expresan G1 scFv-PE38 contenían más del 90 % de proteína recombinante. Usando protocolos de

renaturalización establecidos, el G1 scFv-PE38 se volvió a plegar a partir de cuerpos de inclusión solubilizados en un tampón de replegamiento de intercambio redox y se purificó después de eso por cromatografía de intercambio iónico en columnas de Q-Sepharose y MonoQ y posteriormente por cromatografía de exclusión por tamaño. Se obtuvo una proteína de fusión de G1 scFv-PE38 altamente purificada con el tamaño esperado de 63 kDa según se analizó por SDS-PAGE en condiciones no reductoras (Figura 3C). El perfil molecular del G1scFv y G1scFv-inmunotoxina se analizó por cromatografía de exclusión por tamaño y puso de manifiesto un solo pico de proteína en una forma monomérica con una masa molecular esperada de 26 y 63 kDa, respectivamente (no se muestran los datos). El rendimiento del G1 scFv-inmunotoxina replegado era de aproximadamente el 2 %, por lo tanto, podían obtenerse de forma rutinaria 2 mg de proteína altamente pura a partir del replegamiento de 100 mg de proteína obtenida de cuerpos de inclusión que contenían el 80-90 % de proteína recombinante. Este rendimiento es similar a scFv-inmunotoxinas descritas anteriormente que se expresaban bien y se producían usando un sistema de expresión y replegamiento similar (30). El rendimiento del G1scFv era de 3 mg a partir de un cultivo bacteriano de 1 litro.

La especificidad de unión del anticuerpo G1 scFv purificado soluble y la proteína de fusión G1 scFv-P38 se determinó por ensayos de ELISA en complejos de MHC-péptido biotinilados inmovilizados en pocillos a través de BSA-biotina-estreptavidina para asegurar un plegamiento correcto de los complejos, que podían deformarse por unión directa a plástico. El plegamiento correcto de los complejos unidos y su estabilidad durante los ensayos de unión se determinaron por su capacidad para reaccionar con el anticuerpo monoclonal específico de conformación w6/32, que se une a complejos de HLA sólo cuando están plegados correctamente y cuando contienen péptido (no se muestran los datos). Cuando se usó la proteína G1 scFv o G1scFv-PE38 purificada soluble, los ensayos de ELISA ponían de manifiesto un patrón de reconocimiento muy específico que se corresponde con las características diferenciales de la especificidad de célula T restringida por MHC (Figura 4). El G1 scFv seleccionado para unirse al complejo de HLA-A2 que contiene G9-209M reaccionaba solamente con el complejo específico y no con complejos que presentaban los complejos de MHC-péptido derivados de gp100 G9-280 y G9-154 ni con otros complejos de control que contenían los epítopos derivados de telomerasa restringidos por HLA-A2 540 y 865 (32), un péptido derivado de MUC1 (33) o el péptido TAX derivado de HTLV-1 (34) (Figura 4). En estos ensayos se detectó la unión con un anticuerpo anti-PE38. Se obtuvieron resultados similares cuando se usaba el anticuerpo G1 scFv sin fusionar cuando la detección se realizó con anticuerpo anti-marcador Myc (no se muestran los datos). Por lo tanto, este fragmento scFv específico de antígeno presenta características de unión y la especificidad refinada de una molécula similar a TCR. El G1 scFv o G1 scFv-PE38 no reconocían el péptido en solitario ni moléculas de HLA-A2 vacías (que son difíciles de producir porque son inestables en ausencia de un péptido) ni estreptavidina ni otros antígenos proteicos (no se muestran los datos).

A continuación, se determinaron las propiedades de unión del G1 scFv-PE38 purificado soluble similar a TCR usando un ensayo de ELISA de saturación en el que se unieron complejos biotinilados a placas recubiertas de BSA-biotina-estreptavidina a las que se añadieron cantidades crecientes de G1 scFv-PE38. La unión de G1scFv-PE38 al complejo de HLA-A2/G9-209M derivado de gp100 específico era dependiente de la dosis y saturable (Figura 5A). La extrapolación de la señal de unión al 50 % puso de manifiesto que este anticuerpo poseía una gran afinidad, con una afinidad de unión en el intervalo nanomolar. Para determinar la afinidad de unión aparente de los fragmentos scFv similares a TCR con su complejo de MHC-péptido afín, se realizó un ensayo de unión competitiva en el que se hacía competir la unión de G1scFv-PE38 marcado con <sup>125</sup>I con concentraciones crecientes de proteína sin marcar. Estos ensayos de unión pusieron de manifiesto una afinidad de unión aparente en el intervalo nanomolar bajo de 40 nM (Figura 5B). De forma importante, estos resultados recalcan un éxito previo en el aislamiento de un anticuerpo scFv de alta afinidad con especificidad similar a TCR a partir del repertorio de anticuerpos presentados en fagos de ratones transgénicos HLA-A2 inmunizados.

#### **Unión de G1 scFv a APC que presentan el epítipo derivado de gp100**

Para demostrar que el G1 scFv soluble aislado puede unirse al complejo de MHC-péptido específico, no sólo en su forma soluble recombinante sino también en la forma nativa, como se expresa en la superficie celular, se utilizaron dos sistemas de APC. Uno consistía en las células RMA-S deficientes en TAP2 murinas que se transfectaron con el gen de HLA-A2 humano en un formato de cadena sencilla (26) (HLA-A2.1/Db-cadena sencilla β2m) (células RMA-S-HHD). El péptido derivado de gp100 y péptidos de control se cargaron en las células RMA-S-HHD y la capacidad del anticuerpo G1 scFv seleccionado para unirse a células cargadas con péptido se controló mediante FACS (Figuras 6A-C). La estabilización de MHC inducida por péptido de las células RMA-S-HHD mutantes para TAP2 se determinó por análisis de la reactividad del anticuerpo anti-HLA conformacional w6/32 y el MAb anti-HLA-A2 BB7.2 con células cargadas y no cargadas con péptido (Figuras 6A y B). El G1 scFv que reconocía el complejo de HLA-A2 que contenía G9-209M reaccionaba solamente con células RMA-S-HHD cargadas con el péptido G9-209M pero no con células cargadas con el péptido G9-280 (Figura 6C) o células de control no cargadas con péptido. El G1 scFv no se unía a células cargadas con otros péptidos de control restringidos por HLA-A2 tales como péptidos derivados de TAX, MUC1 o telomerasa usados para los análisis de especificidad (véase la Figura 4).

También se usó un segundo tipo de APC, en concreto las células JY linfoblásticas B transformadas con EBV que expresan HLA-A2; estas células se incubaron con los péptidos derivados de gp100 o de control. Son TAP+ y, por consiguiente, la presentación del péptido suministrado exógenamente se facilita por intercambio peptídico. Usando esta estrategia, se observó una especificidad de unión similar con el anticuerpo G1 scFv (no se muestran los datos). Estos resultados demuestran que el anticuerpo scFv puede reconocer específicamente su complejo de HLA-A2 nativo correspondiente in situ en la superficie de las células.

**Actividad citotóxica de G1scFv-PE38 hacia APC**

Para determinar la capacidad del anticuerpo G1 scFv para servir como resto de direccionamiento para la eliminación específica similar a célula T de células presentadoras de antígeno, se construyó una molécula de G1scFv-PE38 en la que la forma truncada muy potente de exotoxina A de *Pseudomonas* se fusiona con el extremo C-terminal del gen de scFv y se ensayó su capacidad para destruir APC cargadas con péptido. Se cargaron células RMA84 o JY con los epítomos derivados de gp100 G9-209M y G9-280V, así como con otros péptidos restringidos por HLA-A2 de control. El análisis de FACS con anticuerpo anti-HLA-A2 puso de manifiesto un patrón de expresión similar de moléculas de HLA-A2 con G9-209M, G9-280V y otras células cargadas con péptido de control (Figura 6B). Como se muestra en la Figura 7A, se observó citotoxicidad por G1scFv-PE38 sólo en células RMA84 cargadas con el péptido G9-209 con una  $CI_{50}$  de 10-20 ng/ml. No se observó actividad citotóxica en células RMA84 que se cargaron con el epítomo G9-280V derivado de gp100 o con otros péptidos restringidos por HLA-A2 de control o células que no se cargaron con péptido. Las células RMA84 cargadas con G9-209M no se destruyeron con una inmunotoxina irrelevante en la que un anticuerpo scFv anti-Lewis Y humano se fusiona con PE38 [B3(Fv)-PE38] (Figura 7A). En las células JY transformadas con EBV que expresan TAP normal, la presentación del péptido suministrado exógenamente se facilita por intercambio peptídico. Usando esta estrategia, se observó una actividad específica similar en la que el G1scFv-PE38 destruye sólo células cargadas con el péptido G9-209M (Figura 7B). Se mostró una prueba adicional de especificidad en experimentos de competición en los que estaba presente complejo de scHLA-A2-péptido soluble específico y de control en exceso en solución para competir por la unión e inhibir la citotoxicidad por G1 scFv-PE38. Un ejemplo de este tipo de ensayo se muestra en la Figura 7C, en la que un exceso de HLA-A2 que contiene G9-209M soluble pero no de complejo de G9-280V/HLA-A2 competía e inhibía la actividad citotóxica de G1 scFv-PE38 hacia células JY cargadas con G9-209M. Estos resultados demuestran adicionalmente la especificidad refinada y única del anticuerpo G1scFv y su capacidad para servir como resto de direccionamiento para suministrar una molécula efectora citotóxica con especificidad restringida por MHC específica de antígeno (péptido) de células T dirigida hacia un epítomo de célula T tumoral humana.

**Discusión de los resultados**

En este ejemplo, se demostró la capacidad para seleccionar a partir de un repertorio inmune de fragmentos scFv murinos un anticuerpo de alta afinidad (denominado en este documento G1scFv) dirigido hacia un epítomo de célula T humana derivado de un antígeno canceroso, el antígeno asociado a melanoma gp100.

El G1scFv presenta un patrón de unión muy específico y especial; puede unirse de una forma específica de péptido a complejos de HLA-A2. Por lo tanto, es un anticuerpo recombinante con especificidad similar a receptor de antígeno de célula T. Al contrario que la baja afinidad intrínseca de los TCR, esta molécula presenta las características de unión con alta afinidad de anticuerpos al tiempo que conserva la especificidad de TCR.

Este ejemplo demuestra sorprendentemente el poder de la estrategia de presentación en fagos y su capacidad para seleccionar especificidades especialmente refinadas a partir de un gran repertorio de anticuerpos diferentes.

La capacidad para seleccionar anticuerpos similares a TCR de alta afinidad, a pesar del hecho de que se piensa que dichos agentes de unión específicos de péptido son poco frecuentes y por lo tanto difíciles de aislar, puede ser el resultado de las siguientes consideraciones.

Uno es el modo de inmunización y selección que incluía inmunización de animal transgénico combinada con el poder de diversas estrategias de selección empleadas por presentación en fagos. Se piensa que el uso de ratones transgénicos HLA tales como ratones transgénicos HLA-A2 es una ventaja porque habitualmente son tolerantes a complejos de HLA a menos que se presente un nuevo péptido extraño en el complejo. La capacidad para aislar moléculas de anticuerpo similares a TCR puede representar una situación en la que los linfocitos que eran tolerantes a HLA-A2 se exponen ahora a nuevos epítomos aportados por, en el ejemplo proporcionado en este documento, el péptido derivado de gp100 de melanoma presentado en HLA-A2. El procedimiento de selección que combinaba un exceso de complejo inespecífico en solución contribuía significativamente al proceso de selección y permitía aislar un clon de anticuerpo poco frecuente (uno de  $10^8$ ).

Otra cuestión importante se refiere al estado del antígeno usado en el proceso de selección. La conformación del antígeno tiene que ser tan "natural" como sea posible, especialmente cuando se produce de una forma recombinante. Como se describe en las referencias 23 y 24 y en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 09/534.966 y PCT/IL01/00260 (publicada como documento WO 01/72768) se descubrió que el repliegamiento *in vitro* a partir de cuerpos de inclusión producidos en *E. coli* de una molécula de MHC de cadena sencilla que está formando un complejo con diversos péptidos produce grandes cantidades de proteína correctamente plegada y funcional. El hecho de que el anticuerpo ejemplar G1scFv se aisló a partir de una biblioteca relativamente pequeña de aproximadamente  $10^8$  clones, aunque es altamente específico con una afinidad en el intervalo nanomolar, indica firmemente que el ratón transgénico HLA-A2 que se usó para la inmunización desarrollaba de hecho anticuerpos de gran afinidad contra los complejos de HLA-A2/G9-209. La observación de que sólo se aisló un solo anticuerpo anti-HLA-A2/G9-209 puede reflejar que sólo existe una especificidad de este tipo o que no se generaron otras especificidades durante la respuesta inmune debido a que dicha respuesta no podía generarse fácilmente y tolerarla los ratones transgénicos HLA-A2. Es muy sorprendente el hecho de que se describieran resultados similares en el pasado para un sistema de MHC-péptido

murino en el que, usando presentación en fagos, se aisló un anticuerpo similar a TCR recombinante dirigido hacia una molécula H-2K<sup>k</sup> murina clase I que estaba formando un complejo con el péptido de hemaglutinina de influenza Ha<sub>255-262</sub> (17). De forma similar a los resultados que se presentan en este documento, de los 50 clones ensayados, siete reaccionaban específicamente con los complejos de H-2K<sup>k</sup>/Ha<sub>255-262</sub> solamente y no con otros complejos de H-2K<sup>k</sup>/péptido. Curiosamente, se determinaron las secuencias de ADN de estos clones específicos y se descubrió que eran idénticas (17). Sin embargo, estos anticuerpos anti-complejos de H-2K<sup>k</sup>/Ha<sub>255-262</sub> no pueden usarse para controlar la presentación de antígenos y/o destruir células presentadoras de antígeno de origen humano.

A pesar del hecho de que los anticuerpos que tienen una especificidad similar a receptor de antígeno de célula T son poco frecuentes, la estrategia de presentación en fagos puede aplicarse para aislar anticuerpos recombinantes con especificidad similar a TCR contra diversos complejos de MHC-péptido relacionados con diversas afecciones patológicas tales como cáncer, infecciones víricas y enfermedades autoinmunes.

Los anticuerpos recombinantes con especificidad similar a TCR representan una nueva herramienta valiosa para investigaciones futuras en dos áreas principales de la inmunología tumoral. En primer lugar, estos anticuerpos pueden usarse ahora para detectar y visualizar directamente la presencia de epítomos de células T específicos o complejos de MHC-péptido por procedimientos convencionales de citometría de flujo e inmunohistoquímica. Deberían ser muy útiles para el estudio y análisis de la presentación de antígenos en cáncer por determinación de la expresión de complejos de MHC-péptido relacionados con tumores específicos en la superficie de células tumorales, metástasis, células presentadoras de antígeno y células linfoides. Además, dichos anticuerpos pueden usarse para analizar estrategias basadas en inmunoterapia determinando las alteraciones en la expresión de complejo MHC-péptido en células presentadoras de antígeno antes, durante y después de los protocolos de vacunación con péptidos o con APC cargadas con extractos de células tumorales o vacunaciones híbridas de células dendríticas-tumorales (7-11). Por lo tanto, por primera vez pueden abordarse directamente cuestiones relacionadas con cómo y dónde se producen ciertos acontecimientos durante la presentación de antígenos, y la expresión de epítomos de células T en la célula presentadora de antígeno puede visualizarse y cuantificarse.

En segundo lugar, los anticuerpos con dicha especificidad exquisitamente refinada dirigidos contra un antígeno tumoral humano muy específico y único representan nuevas oportunidades para el uso como restos de direccionamiento para diversas estrategias inmunoterapéuticas basadas en anticuerpos. Esto incluye el uso de dichos anticuerpos para construir inmunotoxinas recombinantes (12), fusión con moléculas de citocina (37) o para terapia con anticuerpos biespecíficos (38). La cuestión abierta con respecto a estas aplicaciones se refiere a la baja densidad del epítomo específico en la superficie de la célula diana. Se ha demostrado previamente, usando el complejo de H-2K<sup>k</sup>/péptido de hemaglutinina de influenza y un sistema presentador de antígeno similar para conseguir una destrucción eficaz con una molécula de inmunotoxina similar a TCR, que es necesaria una densidad de varios miles de complejos de MHC-péptido particulares para la eliminación selectiva de APC (39). Los resultados descritos en este documento confirman estos descubrimientos, consiguiendo un potencial citotóxico similar de una inmunotoxina similar a célula T. Para mejorar las capacidades de direccionamiento de estas moléculas de anticuerpos similares a TCR, pueden emplearse dos estrategias de modificación genética de anticuerpos: (i) aumentar la afinidad del anticuerpo parental por estrategias de maduración de la afinidad sin alterar su especificidad refinada similar a TCR (40); y (ii) aumentar la avidéz de estas moléculas monovalentes recombinantes haciéndolas bivalentes (38). La combinación de estas estrategias dará como resultado en la segunda generación moléculas mejoradas que serán herramientas valiosas para estrategias inmunoterapéuticas, así como servirán como herramientas de investigación innovadoras para estudiar la interacción de células tumorales y el sistema inmune humano.

Se aprecia que ciertas características de la invención, que por claridad se describen en el contexto de realizaciones separadas, también pueden proporcionarse en combinación en una sola realización. A la inversa, diversas características de la invención que por brevedad se describen en el contexto de una sola realización también pueden proporcionarse por separado o en cualquier subcombinación adecuada.

## Bibliografía

(Se citan referencias adicionales en el texto)

1. Boon, T., y van der Bruggen, P. (1996) J Exp Med 183,725-9.
2. Rosenberg, S.A. (2001) Nature 411,380-4.
3. Renkvist, N., Castelli, C., Robbins, PF, y Parmiani, G. (2001) Cancer Immunol Immunother 50, 3-15.
4. Anichini A, Maccalli C, Mortarini R, Salvi S, Mazzocchi A, Squarcina P, Herlyn M, Parmiani G. (1993) J. Exp. Med. 177, 989-998.
5. Coulie PG, Brichard V, Van Pel A, Wolfel T, Schneider J, Traversari C, Mattei S, De Plaen E, Lurquin C, Szikora JP, y col. (1994) J. Exp. Med. 180, 35-42.
6. Rivoltini L, Loftus DJ, Squarcina P, Castelli C, Rini F, Arienti F, Belli F, Marincola FM, Geisler C, Borsatti A, Appella E, Parmiani G. (1998) Crit Rev Immunol 18, 55-63.

7. Offringa, R., van der Burg, S.H., Ossendorp, F. Toes, R.E., y Melief, C.J. (2000) *Curr Opin Immunol* 12, 576-82
8. Restifo NP, Esquivel F, Kawakami Y, Yewdell JW, Mule JJ, Rosenberg SA, Bennink JR. (1993) *J. Exp. Med.* 177, 265-272.
- 5 9. Seliger, B., Maeurer, M.J., y Ferrone, S (2000) *Immunol. Today* 21, 455-464.
10. Esche, C., Shurin, M.R., Lotze, M.T., (1999) *Curr Opin Mol Ther* 1,72-81.
11. Kugler A, Stuhler G, Walden P, Zoller G, Zobywalski A, Brossart P, Trefzer U, Ullrich S, Muller CA, Becker V, Gross AJ, Hemmerlein B, Kanz L, Muller GA, Ringert RH. *Nat. Med.* 6, 332-336 (2000).
12. Pastan, I. (1997) *Biochim Biophys Acta.* 1333,C1-6.
- 10 13. Porgador, A., Yewdell, J.W., Deng, Y., Bennink, J.R., Germain, R.N., (1997) *Immunity* 6, 715-26
14. Dadaglio, G, Nelson, CA, Deck, MB, Petzold, SJ, Unanue, ER. (1997) *Immunity* 6,727-38.
15. Aharoni, R, Teitelbaum, D, Arnon, R, Puri, J. (1991) *Nature.* 351,147-50.
16. Krogsgaard M, Wucherpfennig KW, Canella B, Hansen BE, Svejgaard A, Pyrdol J, Ditzel H, Raine C, Engberg J, Fugger L. (2000) *J Exp Med.* 191,1395-412.
17. Andersen PS, Stryhn A, Hansen BE, Fugger L, Engberg J, Buus S. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 1820-1824.
18. Chames, P., Hufton, S.E., Coulie, P.G., Uchanska-Ziegler, B. y Hoogenboom, H.R. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 97,7969-7974.
- 20 19. Kawakami Y, Eliyahu S, Delgado CH, Robbins PF, Sakaguchi K, Appella E, Yannelli JR, Adema GJ, Miki T, Rosenberg SA. (1994) *Proc. Natl Acad. Sci. U. S.A* 91, 6458-6462.
20. Bakker AB, Schreurs MW, de Boer AJ, Kawakami Y, Rosenberg SA, Adema GJ, Figdor CG. (1994) *J. Exp. Med.* 179, 1005-1009.
21. Kawakami Y, Eliyahu S, Jennings C, Sakaguchi K, Kang X, Southwood S, Robbins PF, Sette A, Appella E, Rosenberg SA. (1995) *J Immunol.* 154, 3961-3968.
- 25 22. Cox AL, Skipper J, Chen Y, Henderson RA, Darrow TL, Shabanowitz J, Engelhard VH, Hunt DF, Slingluff CL Jr. (1994) *Science* 264, 716-719.
23. Denkberg, G., Cohen, C.J., Segal, D., Kirkin, A.F. y Reiter, Y. (2000) *Eur. J Immunol.* 30, 3522-3532.
24. Denkberg, G., Cohen, C.J., y Reiter, Y. (2001) *J Immunol* 167,270-6.
- 30 25. Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, Barouch DH, McHeyzer-Williams MG, Bell JI, McMichael AJ, Davis MM. [aparece errata publicada en *Science* 19 Jun 1998; 280(5371):1821]. (1996) *Science* 274, 94-96.
26. Pascolo S, Bervas N, Ure JM, Smith AG, Lemonnier FA, Peranum B. (1997) *J Exp Med.* 185,2043-51.
27. Benhar, I, y Reiter, Y. *Curr. Protocols in Immunology* in press (2001)
28. Berdichevsky Y, Ben-Zeev E, Lamed R, Benhar I. (1999) *J Immunol Methods.* 228:151-62.
- 35 29. de Haard HJ, van Neer N, Reurs A, Hufton SE, Roovers RC, Henderikx P, de Bruine AP, Arends JW, Hoogenboom HR. (1999) *J Biol Chem.* 274,18218-30.
30. Brinkmann U, Pai LH, FitzGerald DJ, Willingham M, y Pastan I. (1991) *Proc Natl Acad Sci USA.* 88:8616-20
31. Parkhurst MR, Salgaller ML, Southwood S, Robbins PF, Sette A, Rosenberg SA, Kawakami Y. (1996) *J Immunol.* 157:2539-48.
32. Vonderheide, R.H., Hahn, W.C., Schultze, J.L. y Nadler, L.M. (1999) *Immunity.* 10,673-679.
- 40 33. Carmon L, El-Shami KM, Paz A, Pascolo S, Tzehoval E, Tirosh B, Koren R, Feldman M, Fridkin M, Lemonnier FA, Eisenbach L. (2000) *Int J Cancer.* 85,391-7.
34. Bieganowska K, Hollsberg P, Buckle GJ, Lim DG, Greten TF, Schneck J, Altman JD, Jacobson S, Ledis SL, Hanchard B, Chin J, Morgan O, Roth PA, Hafler DA. (1999) *J Immunol.* 162, 1765-1771.



35. Lee PP, Yee C, Savage PA, Fong L, Brockstedt D, Weber JS, Johnson D, Swetter S, Thompson J, Greenberg PD, Roederer M, Davis MM. (1999) *Nat. Med.* 5, 677-685.
36. Ogg GS, Jin X, Bonhoeffer S, Dunbar PR, Nowak MA, Monard S, Segal JP, Cao Y, Rowland-Jones SL, Cerundolo V, Hurley A, Markowitz M, Ho DD, Nixon DF, McMichael AJ. (1998) *Science* 279, 2103-2106.
- 5 37. Lode, H.N., y Reisfeld, R.A. (2000) *Immunol Res.* 21,279-88.
38. Withoff, S., Helfrich, W., de Leij, LF., Molema, G. (2001) *Curr OpinMolTher.* 3,:53-62.
39. Reiter, Y., Di Carlo A., Fugger, L., Engberg, J. y Pastan, I. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 4631-4636.
40. Chowdhury, P.S., y Pastan, I. (1999) *Nat Biotechnol.* 17, 568-72.
- 10 41. Garboczi, D. N., D. T. Hung, y D. C. Wiley. 1992. HLA-A2-peptide complexes: refolding and crystallization of molecules expressed in *Escherichia coli* and complexed with single antigenic peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3429.
- 15 42. Mottez, E., P. Langlade-Demoyen, H. Gournier, F. Martinon, J. Maryanski, P. Kourilsky, y J. P. Abastado. 1995. Cells expressing a major histocompatibility complex class I molecule with a single covalently bound peptide are highly immunogenic. *J. Exp. Med.* 181:493.
43. Lone, Y-C, Motta, I., Mottez, E., Guilloux, Y., Lim, A., Demay, F., Levraud, J., Kourilsky, P., y Abastado, J., 1998. *In vitro* induction of specific cytotoxic T lymphocytes using recombinant single-chain class I/peptide complexes. *J. Immunother.* 21:283.
- 20 44. Mage MG, Lee L, Ribaldo RK, Corr M, Kozlowski S, McHugh L, y Margulies DH 1992. A recombinant, soluble, single-chain class I major histocompatibility complex molecule with biological activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:10658.
45. Lee L, McHugh L, Ribaldo RK, Kozlowski S, Margulies DH, y Mage MG. 1994. Functional cell surface expression by a recombinant single-chain class I major histocompatibility complex molecule with a cis-active beta 2-microglobulin domain. *Eur. J. Immunol.* 24: 2633.
- 25 46. Matsumura, M., Y. Saito, M. R. Jackson, E. S. Song, y P. A. Peterson. 1992. *In vitro* peptide binding to soluble empty class I major histocompatibility complex molecules isolated from transfected *Drosophila melanogaster* cells. *J. Biol. Chem.* 267:23589.
47. Stern, L. J., y D. C. Wiley. 1992. The human class II MHC protein HLA-DR1 assembles as empty heterodimers in the absence of antigenic peptide. *Cell* 68: 465.
- 30 48. Altman, J. D., P. A. Reay, y M. M. Davis. 1993. Formation of functional Peptide complexes of class II major histocompatibility complex proteins from subunits produced in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10330.
49. Kozono, H., J. White, J. Clements, P. Marrack, y J. Kappler. 1994. Production of soluble MHC class II proteins with covalently bound single peptides. *Nature* 369:151.
- 35 50. White, J., Crawford, F., Fremont, D., Marrack, P., y Kappler, J. 1999. Soluble class I MHC with b-2 microglobulin covalently linked peptides: specific binding to a T-cell hybridoma. *J. Immunol.* 162: 2671
51. Ignatowicz, L., G. Winslow, J. Bill, J. Kappler, y P. Marrack. 1995. Cell Surface expression of class II MHC proteins bound by a single peptide. *J. Immunol.* 154:3852.
- 40 52. Ignatowicz, L., J. Kappler, y P. Marrack. 1996. The repertoire of T cells shaped by a single MHC/peptide ligand. *Cell* 84: 521.
53. Uger, R. A., y B. H. Barber. 1998. Creating CTL targets with epitope-linked 2-microglobulin constructs. *J. Immunol.* 160: 1598.
54. Cancer immunology immunotherapy 2001 50: 3-15. A listing of human tumor antigens recognized by T cells.

45 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Technion Research and Development Foundation, Ltd.

<120> ANTICUERPO QUE TIENE UNA ESPECIFICIDAD TIPO RECEPTOR DE CÉLULAS T, UNA AFINIDAD AÚN MAYOR Y EL USO DEL MISMO EN LA DETECCIÓN Y EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER, INFECCIONES VÍRICAS Y ENFERMEDADES AUTOINMUNES

<130> N1400 EP/2

5

<150> US 10/073.301  
<151> 13-Febrero-2002

<160> 11

10 <170> PatentIn versión 3.1

<210> 1  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> /note="Descripción de secuencia artificial: Péptido restringido por HLA-A2, gp100 (154)"  
<400> 1

Lys Thr Trp Gly Gln Tyr Trp Gln Val  
1 5

20 <210> 2

<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> /note="Descripción de secuencia artificial: Péptido restringido por HLA-A2, gp100 (209)"

25 <400> 2

Ile Met Asp Gln Val Pro Phe Ser Val  
1 5

<210> 3

<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> /note="Descripción de secuencia artificial: Péptido restringido por HLA-A2, gp100 (280)"

<400> 3

Tyr Leu Glu Pro Gly Pro Val Thr Val  
1 5

35 <210> 4

<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> /note="Descripción de secuencia artificial: Péptido restringido por HLA-A2, MUC1"

<400> 4

Leu Leu Leu Thr Val Leu Thr Val Leu  
1 5

<210> 5  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> /note="Descripción de secuencia artificial: Péptido restringido por HLA-A2, HTLV-1 (TAX)"  
 <400> 5

Leu Leu Phe Gly Tyr Pro Val Tyr Val  
 1 5

10 <210> 6  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> /note="Descripción de secuencia artificial: Péptido restringido por HLA-A2, hTEtemperatura ambiente (540)"  
 15 <400> 6

Ile Leu Ala Lys Phe Leu His Trp Leu  
 1 5

20 <210> 7  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> /note="Descripción de secuencia artificial: Péptido restringido por HLA-A2, hTEtemperatura ambiente (865)"  
 <400> 7

Arg Leu Val Asp Asp Phe Leu Leu Val  
 1 5

25 <210> 8  
 <211> 711  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> /note="Descripción de secuencia artificial: Secuencia de ADN de anticuerpo recombinante Fv de cadena sencilla G1"  
 30 <400> 8

ES 2 425 539 T3

```

caggtgaaac tgcaggagtc tgggggagge ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc      60
tctgtgagcag cctctggatt cacttccagt agctatggca tgtcttgggt togcagact      120
ccagacaaga ggctggagtg ggtogcaacc attagtagtg gtggtagtta caoctactat      180
ccagacagtg tgaagggcg attcaccatc tocagagaca atgccaagaa caccctgtac      240
ctgcaaatga gcagtctgaa gtctgaggac acagccatgt attactgtgc aagaggtaac      300
tgggaaggat ggtacttoga tgtctggggc caagggacca cggtcaccgt ctctcaggt      360
ggaggogggt caggcggagg tggctctggc ggtgggggat cgaacatoga gctcactcag      420
tctccagcaa tcatgtctgc atctccaggg gagaggggtca ccatgacctg cagtgccagc      480
tcaagtatac gttacatata ttggtaccaa cagaagcctg gatctcccc cagactctg      540
atztatgaca catccaaagt ggctcctgga gtccctttc gcttcagtgg cagtgggtot      600
gggacctott attctctcac aatcaaccga atggaggctg aggatgctgc cacttattac      660
tgccaggagt ggagtgytta tccytacaog ttoggagggg ggacaaagtt g      711

```

<210> 9

<211> 237

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> /note="Descripción de secuencia artificial: Secuencia proteica de anticuerpo recombinante Fv de cadena sencilla G1"

<400> 9

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

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> /note="Descripción de secuencia artificial: Péptido restringido por HLA derivado de influenza"

<400> 10

**Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu**  
**1 5**

<210> 11

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> /note="Descripción de secuencia artificial: Péptido restringido por HLA derivado de hepatitis B"

<400> 11

**Ser Thr Asn Arg Gln Ser Gly Arg Gln**

10

**1 5**

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un anticuerpo aislado que puede unirse específicamente con una afinidad de unión inferior a 20 nM a un complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I humano que está formando un complejo con un antígeno de tirosinasa restringido por HLA, en donde dicho anticuerpo no se une a dicho MHC clase I humano en ausencia de dicho antígeno de tirosinasa restringido por HLA, en donde dicho anticuerpo no se une a dicho antígeno de tirosinasa restringido por HLA en ausencia de dicho MHC clase I humano y en donde dicho anticuerpo se une a células tumorales que presentan dicho MHC clase I humano que está formando un complejo con dicho antígeno de tirosinasa restringido por HLA.
- 10 2. Una molécula aislada que comprende el anticuerpo aislado de la reivindicación 1 conjugado con un resto identificable.
3. Una molécula aislada que comprende al anticuerpo aislado de la reivindicación 1 conjugado con un resto terapéutico.
- 15 4. Un procedimiento de producción de un anticuerpo que puede unirse específicamente con una afinidad de unión inferior a 20 nM a un complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I humano que está formando un complejo con un antígeno de tirosinasa restringido por HLA, comprendiendo el procedimiento:
  - 20 inmunizar un mamífero no humano modificado genéticamente que tiene células que expresan dicho complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I humano con un complejo de MHC clase I de cadena sencilla y dicho antígeno de tirosinasa restringido por HLA, incluyendo dicho MHC clase I de cadena sencilla una secuencia de aminoácidos de  $\beta$ -2 microglobulina humana funcional unida covalentemente directa o indirectamente a una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de MHC clase I humano funcional que se produce por vía bacteriana en cuerpos de inclusión de *E. coli*;
  - 25 aislar moléculas de ARNm a partir de células productoras de anticuerpos de dicho mamífero no humano;
  - 30 producir una biblioteca de presentación de fagos que presenten moléculas proteicas codificadas por dichas moléculas de ARNm; y
  - aislar al menos un fago de dicha biblioteca de presentación de fagos por selección contra dicho complejo de dicho MHC clase I de cadena sencilla y dicho antígeno restringido por HLA,
  - 35 presentando dicho al menos un fago dicho anticuerpo que puede unirse específicamente con dicho complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I humano que está formando un complejo con dicho antígeno de tirosinasa restringido por HLA.
- 40 5. El anticuerpo aislado de la reivindicación 1, la molécula aislada de la reivindicación 2 o 3, o el procedimiento de la reivindicación 4, en donde el anticuerpo comprende un fragmento de anticuerpo y en donde dichos fragmentos de anticuerpo se unen específicamente a dicho MHC clase I que está formando un complejo con dicho antígeno de tirosinasa restringido por HLA.
- 45 6. El anticuerpo aislado, la molécula aislada o el procedimiento de la reivindicación 5, en el que dicho fragmento de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en Fab, Fab', Fv y Fv de cadena sencilla (scFv).
7. El anticuerpo aislado de la reivindicación 1, la molécula aislada de la reivindicación 2 o 3, o el procedimiento de la reivindicación 4, en donde dicha molécula de MHC clase I es HLA-A2.
8. El anticuerpo aislado de la reivindicación 1, la molécula aislada de la reivindicación 2 o 3, o el procedimiento de la reivindicación 4, en donde dicha molécula de MHC clase I se selecciona del grupo que consiste en HLA-A1 y HLA-A24.
9. La molécula aislada de la reivindicación 2, en la que dicho resto identificable se selecciona del grupo que consiste en un miembro de un par de unión y un marcador.
10. La molécula aislada de la reivindicación 9, en la que dicho miembro de dicho par de unión es un antígeno.
11. La molécula aislada de la reivindicación 9, en la que dicho marcador se selecciona del grupo que consiste en una proteína fluorescente y una enzima.
- 50 12. La molécula aislada de la reivindicación 3, en la que dicho resto terapéutico se selecciona del grupo que consiste en un resto citotóxico, un resto tóxico, un resto de citocina y un resto de anticuerpo biespecífico.

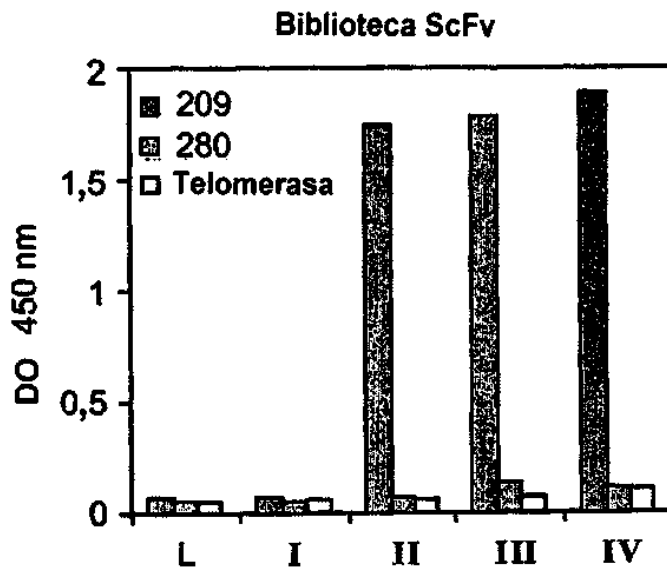


Fig. 1a

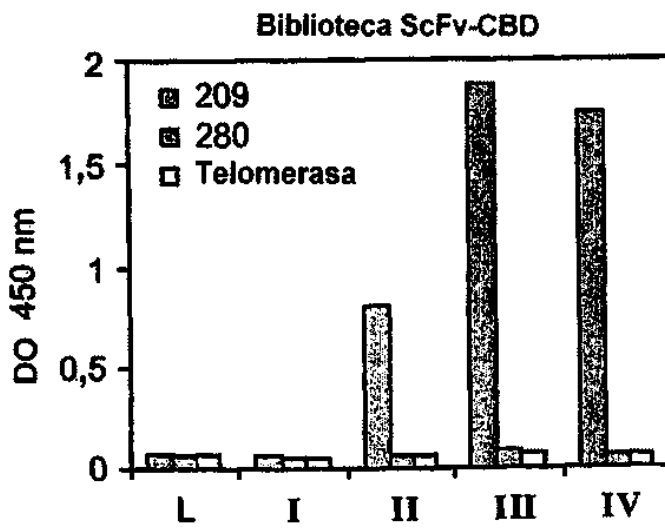


Fig. 1b



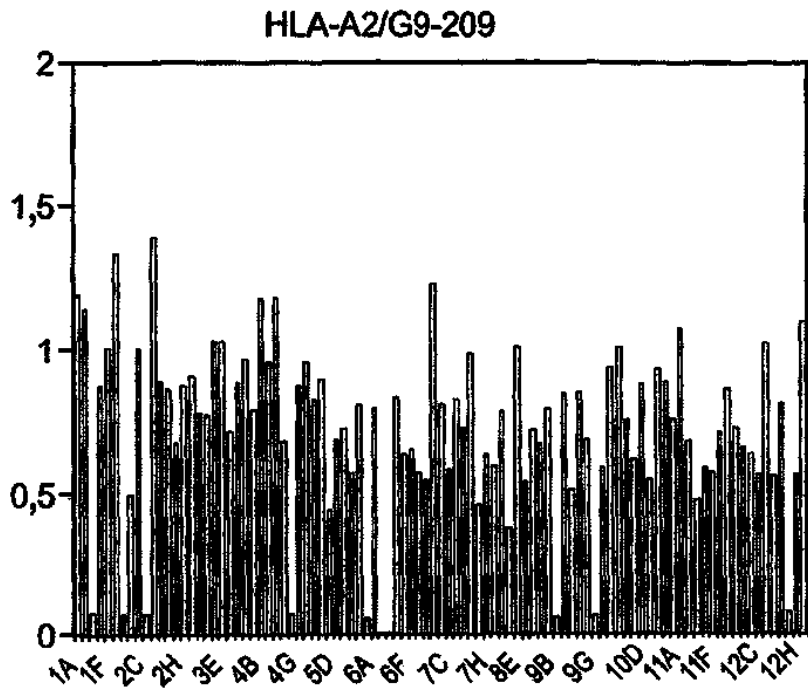


Fig. 2a

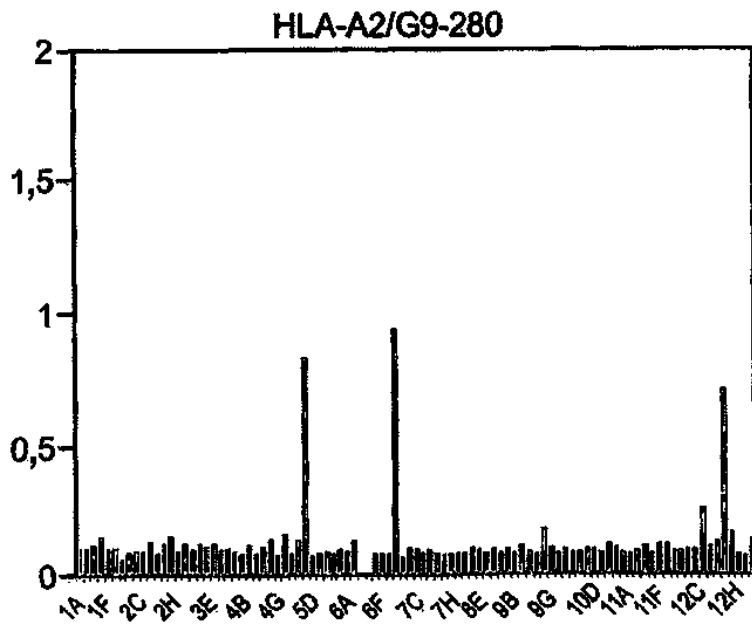


Fig. 2b

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 SECID N°: 8  
 CAG GTG AAA CTG CAG GAG TCT GGG GGA GGC TTA GTG AAG CCT SECID N°: 9  
 gln val lys leu gln glu ser gly gly gly leu val lys pro  
  
 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28  
 GGA GGG TCC CTG AAA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACT  
 gly gly ser leu lys leu ser cys ala ala ser gly phe thr  
  
 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42  
 TTC AGT AGC TAT GGC ATG TCT TGG GTT CGC CAG ACT CCA GAC  
 phe ser ser tyr gly met ser trp val arg gln thr pro asp  
  
 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56  
 AAG AGG CTG GAG TGG GTC GCA ACC ATT AGT AGT GGT GGT AGT  
 lys arg leu glu trp val ala thr ile ser ser gly gly ser  
  
 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70  
 TAC ACC AAC TAT CCA GAC AGT GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC  
 tyr thr tyr tyr pro asp ser val lys gly arg phe thr ile  
  
 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84  
 TCC AGA GAC AAT GCC AAG AAC ACC CTG TAC CTG CAA ATG AGC  
 ser arg asp asn ala lys asn thr leu tyr leu gln met ser  
  
 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98  
 AGT CTG AAG TCT GAG GAC ACA GCC ATG TAT TAC TGT GCA AGA  
 ser leu lys ser glu asp thr ala met tyr tyr cys ala arg  
  
 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112  
 GGT AAC TGG GAA GGA TGG TAC TTC GAT GTC TGG GGC CAA GGG  
 gly asn trp glu gly trp phe asp val trp gly gln gly  
  
 113 114 115 116 117 118  
 ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA GGT GGA GGC GGT TCA GGC GGA  
 thr thr val thr val ser ser gly gly gly gly ser gly gly  
  
 1 2 3 4 5 6  
 GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG AAC ATC GAG CTC ACT CAG  
gly gly ser gly gly gly ser asn ile glu leu thr gln  
  
 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20  
 TCT CCA GCA ATC ATG TCT GCA TCT CCA GGG GAG AGG GTC ACC  
 ser pro ala ile met ser ala ser pro gly glu arg val thr  
  
 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34  
 ATG ACC TGC AGT GCC AGC TCA AGT ATA CGT TAC ATA TAT TGG  
 met thr cys ser ala ser ser ser ile arg tyr ile tyr trp  
  
 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48  
 TAC CAA CAG AAG CCT GGA TCC TCC CCC AGA CTC CTG ATT TAT  
 tyr gln gln lys pro gly ser ser pro arg leu leu ile tyr  
  
 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62  
 GAC ACA TCC AAC GTG GCT CCT GGA GTC CCT TTT CGC TTC AGT  
 asp thr ser asn val ala pro gly val pro phe arg phe ser

Fig. 3a

```
63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76
GGC AGT GGG TCT GGG ACC TCT TAT TCT CTC ACA ATC AAC CGA
gly ser gly ser gly thr ser tyr ser leu thr ile asn arg

77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90
ATG GAG GCT GAG GAT GCT GCC ACT TAT TAC TGC CAG GAG TGG
met glu ala glu asp ala ala thr tyr tyr cys gln glu trp

91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103
AGT GGT TAT CCG TAC ACG TTC GGA GGG GGG ACA AAG TTG
ser gly tyr pro tyr thr phe gly gly gly thr lys leu
```

Fig. 3a (Cont.)

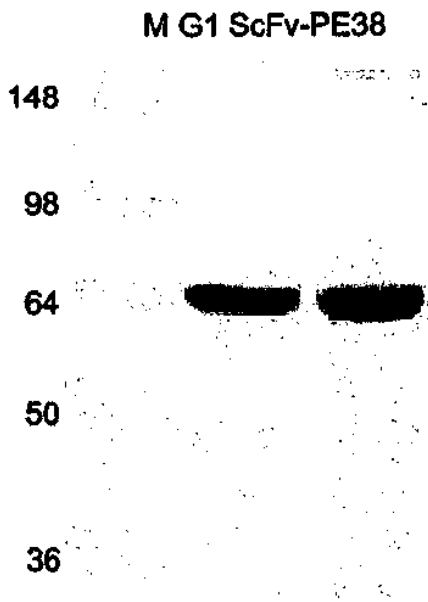


Fig. 3b

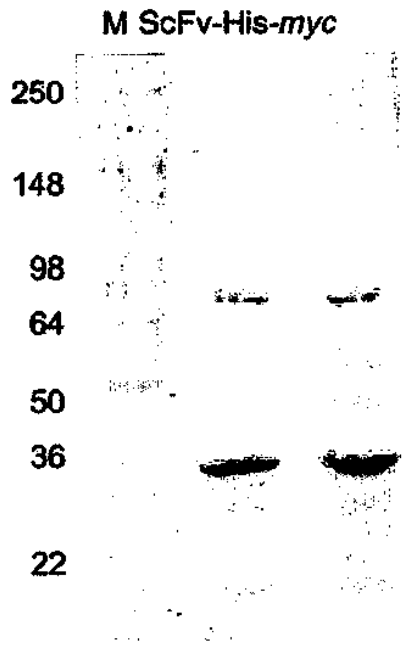


Fig. 3c

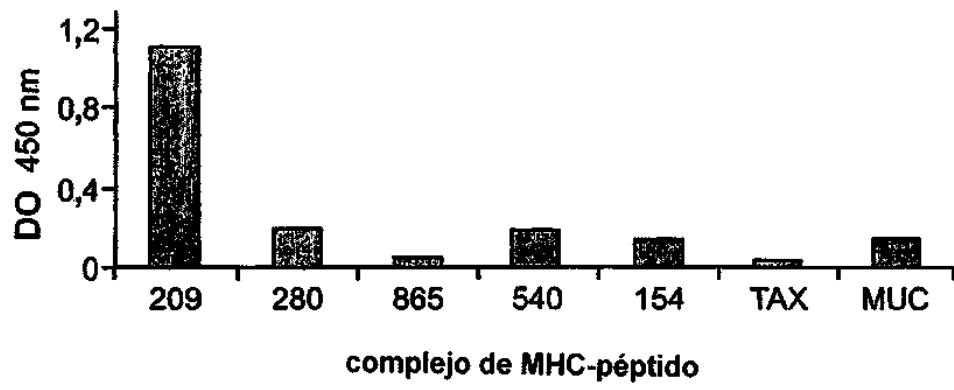


Fig. 4

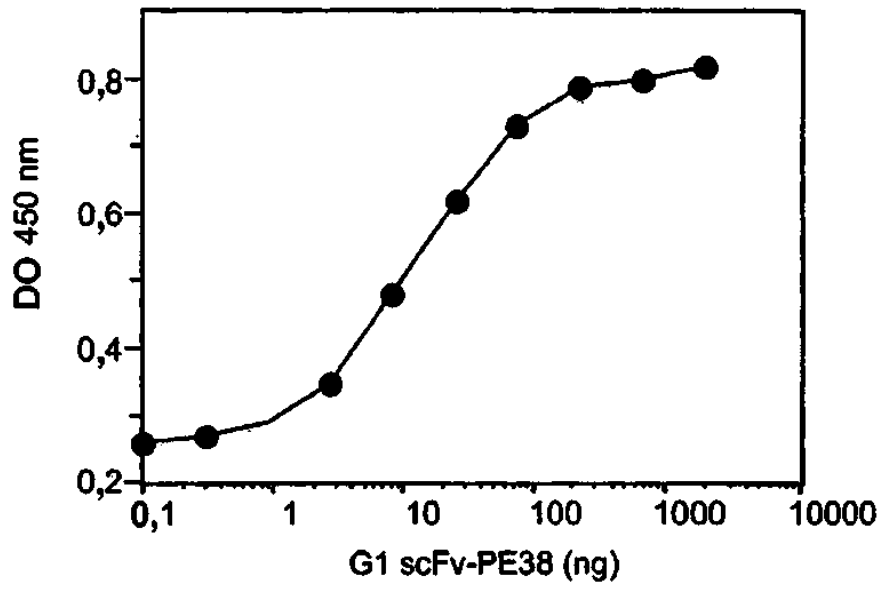


Fig. 5a

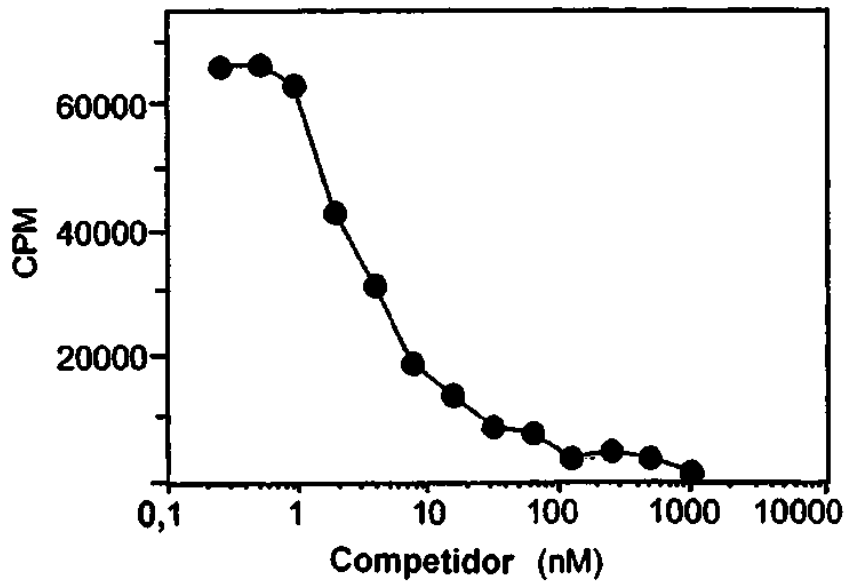


Fig. 5b

