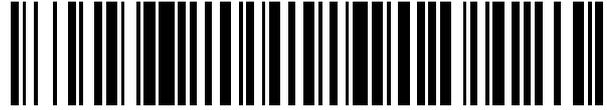


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 515 241**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2010 E 10732451 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.07.2014 EP 2445934**

54 Título: **Polipéptidos multímeros de HLA-G que incluyen al menos dos dominios alfa3 y usos farmacéuticos de los mismos**

30 Prioridad:

25.06.2009 WO PCT/IB2009/006491

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

29.10.2014

73 Titular/es:

**COMMISSARIAT À L'ÉNERGIE ATOMIQUE ET
AUX ÉNERGIES ALTERNATIVES (100.0%)
Bâtiment "Le Ponant D" 25, rue Leblanc
75015 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**LE MAOULT, JOËL y
CAROSELLA, EDGARDO DELFINO**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 515 241 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

Polipéptidos multímeros de HLA-G que incluyen al menos dos dominios alfa3 y usos farmacéuticos de los mismos

5 La presente invención se refiere a polipéptidos multímeros y usos farmacéuticos de los mismos. La invención se refiere más específicamente a multímeros que comprenden dominios alfa3 de un antígeno HLA-G. La invención también se refiere a procedimientos de producción de tales multímeros, composiciones farmacéuticas que comprenden los mismos, además de a sus usos para tratar diversas enfermedades que incluyen rechazo de órgano/tejido.

Los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) se dividen en tres clases principales, concretamente los antígenos de clase I, antígenos de clase II (HLA-DP, HLA-DQ y HLA-DR) y antígenos de clase III.

10 Los antígenos de clase I comprenden antígenos clásicos, HLA-A, HLA-B y HLA-C, que presentan 3 dominios globulares ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$) asociados a microglobulina beta2, además de antígenos no clásicos HLA-E, HLA-F y HLA-G.

15 HLA-G es una molécula de clase I de HLA no clásica expresada por trofoblastos extravillosos de placenta humana normal, células epiteliales tímicas y córnea. Los antígenos HLA-G se expresan esencialmente por las células citotrofoblásticas de la placenta y sirven de agentes inmunomoduladores que protegen el feto del sistema inmunitario materno (ausencia de rechazo por la madre). Se ha descrito la secuencia del gen HLA-G [1, 2] y comprende 4396 pares de bases. Este gen está compuesto por 8 exones, 7 intrones y un extremo sin traducir de 3', correspondiente respectivamente a los siguientes dominios: exón 1: secuencia señal, exón 2: dominio extracelular alfa1, exón 3: dominio extracelular alfa2, exón 4: dominio extracelular alfa3, exón 5: región transmembrana, exón 6: dominio citoplásmico I, exón 7: dominio citoplásmico II (sin traducir), exón 8: dominio citoplásmico III (sin traducir) y región sin traducir de 3'.

20 Se han identificado siete isoformas de HLA-G, entre las cuales 4 están unidas a la membrana (HLA-G1, HLA-G2, HLA-G3 y HLA-G4) y 3 son solubles (HLA-G5, HLA-G6 y HLA-G7) (véase [3] para revisión).

La isoforma de la proteína HLA-G1 madura comprende los tres dominios externos ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$), la región transmembrana y el dominio citoplásmico.

La isoforma de la proteína HLA-G2 no comprende el dominio $\alpha 2$, es decir, los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 3$ están directamente unidos, seguido del dominio transmembrana y el dominio citoplásmico.

25 La isoforma de la proteína HLA-G3 carece de tanto los dominios $\alpha 2$ como $\alpha 3$, es decir, comprende el dominio $\alpha 1$ directamente unido al dominio transmembrana y al dominio citoplásmico.

La isoforma de la proteína HLA-G4 carece del dominio $\alpha 3$, es decir, comprende el dominio $\alpha 1$, el dominio $\alpha 2$, el dominio transmembrana y el dominio citoplásmico.

Las isoformas de HLA-G soluble carecen todas de los dominios transmembrana y citoplásmicos. Más específicamente:

30 - La isoforma de la proteína HLA-G5 contiene los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$, además de una secuencia de péptidos del extremo C adicional de 21 residuos de aminoácidos codificada por el intrón 4 (como resultado de la retención del intrón 4 después del corte y empalme del transcrito y maduración de ARN).

35 - La isoforma de la proteína HLA-G6 se corresponde con HLA-G5 sin $\alpha 2$, es decir, HLA-G6 contiene los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 3$, además de una secuencia de péptidos del extremo C adicional de 21 residuos de aminoácidos codificada por el intrón 4 (como resultado de la retención del intrón 4 después del corte y empalme del transcrito y maduración de ARN).

- La isoforma de la proteína HLA-G7 contiene solo el dominio alfa1, además de 2 residuos de aminoácidos del extremo C adicionales codificados por el intrón (como resultado de la retención del intrón 2 después del corte y empalme del transcrito y maduración de ARN).

40 Todas estas isoformas se han descrito en [4, 5, 6] y la solicitud europea EP 0 677 582.

45 Estudios previos han mostrado que las proteínas HLA-G pueden inhibir respuestas alógenas tales como la respuesta de células de linfocitos T proliferativos, citólisis mediada por linfocitos T citotóxicos y citólisis mediada por células NK [7, 8, 9]. Más estudios recientes también han mostrado que HLA-G puede inducir la diferenciación de linfocitos T reguladores, que pueden entonces inhibir respuestas alógenas por sí mismos, y se sabe que participan en la tolerancia de aloinjertos [10, 11]. Debido a esta amplia función inhibitoria, se ha mostrado que la expresión de HLA-G se correlaciona con una mejor aceptación de trasplantes alógenos, si HLA-G se expresa por el injerto o se detecta en el plasma de pacientes, como molécula soluble [12, 13, 14]. Como resultado, se han propuesto procedimientos basados en HLA-G para tratar rechazo de injerto en trasplante de órgano/tejido alógeno o xenógeno. También se han propuesto proteínas HLA-G para el tratamiento de cánceres (documento EP 1 054 688), trastornos inflamatorios (documento EP 1 189 627) y, más generalmente, enfermedades inmunorrelacionadas. También se ha propuesto fusionar proteínas HLA-

G con ligandos específicos con el fin de elegir como diana HLA-G para células o tejidos particulares (documento WO 2007/091078). Debe observarse, sin embargo, que no se han proporcionado resultados o datos experimentales para mostrar que tales fusiones que eligen diana sean activas.

Se ha mostrado que HLA-G se une a tres receptores principales: ILT2/LILRB1/CD85j, ILT4/LILRB2/CD85d y KIR2DL4.

5 ILT2 se expresa principalmente por linfocitos T, linfocitos B, células NK, monocitos y células dendríticas. ILT4 se expresa solo por células mieloides, es decir, principalmente monocitos y células dendríticas. KIR2DL4 se expresa principalmente por células NK deciduales y por un pequeño subconjunto de células NK periféricas. Debido a los amplios patrones de expresión de sus receptores inhibidores, HLA-G puede ejercer su función tolerogénica sobre todos los efectores de respuestas inmunitarias que son responsables de reacciones de inmunidad antiviral auto-inmunes, inmunidad antitumoral, enfermedades inflamatorias y rechazo de trasplantes.

10 KIR2DL4 es un receptor específico para HLA-G. KIR2DL4 se acopla sobre el dominio alfa1 de HLA-G, y más específicamente sobre los residuos MeI⁷⁶ y Gln⁷⁹ que son característicos para HLA-G [15]. Se mostró adicionalmente que estos dos residuos son cruciales para la función inhibidora de HLA-G mediante KIR2DL4, y que mutándolos se previno la inhibición de la actividad citolítica de células NK que expresan KIR2DL4 por HLA-G *in vitro*. A pesar de su especificidad por HLA-G, KIR2DL4 probablemente no desempeña una función significativa en la función inhibidora de HLA-G, excepto en el contexto de embarazo, principalmente debido a su expresión que se limita a células NK deciduales, y debido a que *in vitro* e *in vivo*, se mostró que ILT2 desempeñó la función clave mediante la interacción con el dominio alfa3 de HLA-G. Es posible que el dominio alfa1 de HLA-G desempeñe una función directa en la función de HLA-G, mediante KIR2DL4 u otro receptor hasta ahora desconocido, pero las pruebas disponibles hasta la fecha señalan una función tolerogénica de HLA-G que está principalmente mediada, si no completamente, por la interacción de su dominio alfa3 con moléculas ILT2 y ILT4.

15 ILT2 e ILT4 no son receptores específicos para HLA-G, y se mostró que pueden unirse a otras moléculas de clase I de HLA mediante su dominio alfa3 [16, 17, 18]. Se ha descrito bien la capacidad del dominio de clase I de HLA para unirse a moléculas ILT. ILT2, en particular, se ha informado que se une "a la mayoría, si no a todas" de las moléculas de clase I de HLA.

20 Sin embargo, HLA-G es el ligando de mayor afinidad por ILT2 e ILT4, como se ilustra en la Tabla 1 de Shiroishi y col. [19].

Así, ILT2 y ILT4 se unen más fuertemente a HLA-G que a moléculas de clase I de HLA clásicas (véase [20, 21]).

25 Esta capacidad de unión a ILT más fuerte de HLA-G en comparación con otras moléculas de clase I de HLA se ilustra particularmente bien por el hecho de que HLA-G en la superficie de células tumorales, pero no moléculas de clase I de HLA clásicas, puede cooperar con los receptores de ILT2 y/o ILT4 de efectores citolíticos con fuerza suficiente para bloquear la función de estos efectores y así proteger las células tumorales de la destrucción inmunitaria [22].

30 ILT2 e ILT4 no se unen a las mismas estructuras de HLA-G [21]. De hecho, ILT2 reconoce solo estructuras de HLA-G asociadas a $\beta 2$ microglobulina ($\beta 2m$), mientras que ILT4 tiene la capacidad de reconocer tanto cadenas pesadas de HLA-G asociadas a $\beta 2m$ como libres de $\beta 2m$ [21, 23]. Además, ILT4 se une claramente a cadenas pesadas de HLA-G libres de $\beta 2m$ mejor que a las asociadas a $\beta 2m$.

Parece que el antígeno HLA-G adopta una conformación dímera *in vivo* como resultado de la formación de un puente disulfuro intermolecular entre el residuo de cisteína 42 de los dominios $\alpha 1$ de dos moléculas HLA-G [20, 23 y 25; documento WO2007/011044].

35 La estructura dímera de HLA-G se ha descrito en Shiroishi y col. [20]. Existen dos moléculas de HLA-G naturales en una unidad asimétrica; cada monómero se une covalentemente con el componente simétrico mediante el puente disulfuro de Cys42-Cys42 junto con el eje cristalográfico de 2 pliegues. La proteína HLA-G1 de longitud completa está compuesta por la cadena H, $\beta 2$ -microglobulina ($\beta 2m$) asociada y un péptido nonamérico similar a la estructura de clase I de MHC clásica. Se ha propuesto que los sitios de unión al receptor de los dímeros de HLA-G son más accesibles que aquellos de monómeros correspondientes, de manera que los dímeros tendrían una mayor afinidad y velocidad de disociación más lenta que los monómeros. Sin embargo, no está claro qué conformación es la más activa para el fin farmacéutico, qué isoforma es la más eficaz o cómo pueden producirse dímeros u oligómeros de HLA-G apropiados.

De lo anterior surge que la función inhibidora superior de HLA-G es debida:

40 1. A una secuencia única de su dominio alfa3 que le confiere una mejor capacidad de unión a ILT que la de otras moléculas de clase I de HLA. Esta secuencia única del dominio alfa 3 de HLA-G, como se deduce de la Figura 3 de Shiroishi y col., [21], conduce a la creación de área de unión a ILT más grande, más hidrófoba y más fuerte.

2. A su capacidad única para dimerizar. La dimerización de HLA-G se produce mediante la creación de

puentes disulfuro entre las cisteínas en la posición 42 (dominio alfa I) de dos moléculas de HLA-G (véase la Figura 8 de Gonen-Gross y col. [24]) y es crucial para la función de HLA-G. De hecho, se mostró que las moléculas de HLA-G mutantes que carecen de la cisteína en la posición 42 y no hacen dímeros también carecen de función inhibidora [24]. La Figura 4 de Shiroishi y col. [20] proporciona la estructura del dímero de HLA-G unido por disulfuro.

5

Así, para resumir los datos sobre la función inhibidora de HLA-G: pasa principalmente por la unión de dímeros de HLA-G a moléculas de ILT mediante su dominio alfa3 único. Sin embargo, la estructura compleja de ILT4/HLA-G [21] revela que ILT4 muestra sorprendentemente reconocimiento de la unión de histocompatibilidad principal de clase I (MHC I) distinta en comparación con ILT2, uniéndose más al dominio $\alpha 3$ que a $\beta 2m$.

10 La producción de HLA-G mediante líneas celulares puede ser tediosa. De hecho, la molécula de HLA-G1/G5 completa es un complejo trimolecular de una cadena pesada completa de HLA-G (dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$) no covalentemente asociada a $\beta 2m$ y un nonapéptido. La función de una construcción tal está bien establecida, pero debido a la complejidad de su estructura, su producción es difícil, su purificación arriesgada y su estabilidad es mala.

15 Los inventores han encontrado ahora inesperadamente que multímeros de péptidos pequeños que contienen solo dominio alfa3 de HLA-G, que pueden obtenerse sintéticamente, son funcionales, más puros, por tanto más estables, más fáciles de producir debido a que no requieren ni extracción de fluidos biológicos ni control específico (debido a que dicha producción no implica agentes biológicos), disminuyendo así el riesgo de riesgo biológico, siguiendo prácticas GMP: debido a que las prácticas GMP tienen patrones de seguridad en términos de riesgo biológico que se recogen en la presente memoria.

20 Así, la presente invención se refiere a multímeros o polipéptidos multiméricos, caracterizados porque comprenden al menos dos monómeros, siendo cada uno de dichos monómeros seleccionado del grupo que consiste en un péptido P1 (llamado también aquí después monómero de alfa3) de fórmula X1-X2 en la que X1 representa un conector peptídico flexible que incluye un aminoácido de cisteína y X2 representa un dominio alfa3 (o péptido alfa3) de HLA-G.

25 Así, los multímeros de la invención incluyen dímeros de fórmula P1-P1 y multímeros de fórmula (P1) n que comprenden exclusivamente monómeros de alfa3.

Los siguientes multímeros también están incluidos en la presente invención:

- homomultímeros de monómeros de alfa3 (n monómeros P1), en los que todos los monómeros son idénticos;
- heteromultímero de monómeros de alfa3 (n monómeros P1, en los que el dominio $\alpha 3$ de monómeros diferentes es diferente), siendo n un número entero comprendido entre 2 y 1000 o incluso más.

30 Así, los multímeros según la invención incluyen dímeros, además de moléculas que comprenden 3, 4, 5, 6, 7 o incluso más monómeros P1. Los multímeros según la presente invención pueden comprender hasta 100, 500, 1000 o incluso más monómeros P1.

35 Los inventores han mostrado inesperadamente que los multímeros que comprenden al menos dos monómeros de alfa3 (también llamados polipéptidos alfa3) inhiben eficazmente el rechazo de injerto *in vivo*. Más específicamente, los inventores han descubierto sorprendentemente que los monómeros de alfa3, cuando se ensamblan correctamente en multímeros, tienen la capacidad de inducir tolerancia inmunitaria eficaz *in vivo*, más específicamente en rechazo de injerto.

40 Los antígenos HLA-G sirven de agentes inmunomoduladores que protegen al feto del sistema inmunitario materno. Se ha informado de diversas isoformas de HLA-G, que están tanto unidas a la membrana como son solubles. Estas isoformas contienen distintos dominios funcionales seleccionados de dominios globulares extracelulares, designados $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$, un dominio transmembrana y un dominio citoplásmico. Aunque se ha documentado la actividad biológica y el mecanismo de acción de ciertas isoformas de HLA-G (tales como HLA-G1 madura), la contribución relativa de cada dominio a la actividad inmunorreguladora, especialmente en forma soluble, no se ha estudiado en detalle.

45 A este respecto, como se ha especificado anteriormente, se ha documentado que la actividad inhibidora del antígeno HLA-G está mediada por la unión a los receptores inhibidores de ILT ILT2 o ILT4. Más específicamente, se ha propuesto que tal unión se produce mediante el dominio alfa3 de HLA-G (Shiroishi y col., [21]).

Los inventores han observado ahora que los polipéptidos alfa3, que comprenden solo dominios alfa3 de HLA-G, pueden proteger el rechazo de injerto *in vivo* o la inhibición de aloproliferación *in vitro*.

50 Los resultados obtenidos muestran que los multímeros según la presente invención presentan alta actividad inmunorreguladora *in vivo* y, por tanto, representan fármacos eficaces para tratar trastornos inmunorrelacionados, particularmente para reducir respuestas inmunitarias no deseadas o perjudiciales en un sujeto. Los resultados

obtenidos muestran más específicamente que los multímeros de la presente invención pueden inducir el 100 % o incluso más aumento en la supervivencia del injerto *in vivo* en comparación con placebo o multímeros $\alpha 1$ - $\alpha 3$ que comprenden al menos dos monómeros, consistiendo cada uno de dichos monómeros en un péptido que comprende del extremo N al extremo C un dominio alfa1 de HLA-G y un dominio alfa3 de HLA-G (llamados indistintamente después monómero de alfa3-alfa1 o monómero de alfa1-alfa3 aunque el dominio alfa1 esté siempre en el extremo N).

De hecho, los multímeros alfa3 de la invención son significativamente más eficaces en comparación con la isoforma HLA-G6 soluble, comprendiendo los multímeros de alfa3 un conector peptídico no flexible o multímeros de alfa1-alfa3.

Así, estos multímeros representan candidatos a fármaco muy valiosos para tratar tales trastornos, además de otras enfermedades inmunorrelacionadas, tales como enfermedades inflamatorias o autoinmunitarias, tales como psoriasis o dermatitis atópica.

Según la presente invención:

- El péptido P1 también puede comprender en el extremo C y/o en el extremo N de X2 menos de 20, más preferentemente menos de 15 y lo más preferentemente menos de 10 ó 5 aminoácidos adicionales que flanquean el dominio alfa3 en una isoforma HLA-G nativa.
- El conector peptídico flexible X1 comprende al menos 10-30 aminoácidos e incluye una cisteína en su extremo N, preferentemente en las posiciones 1, 2, 3 ó 4 del extremo N (véase SEC ID N°: 3, por ejemplo, en la que el conector L1, correspondiente a los aminoácidos 1-12, presenta en la posición 2 de su extremo N una cisteína); puede ser más largo para ganar más flexibilidad (hasta 100 aminoácidos). Dicho conector peptídico flexible comprende esencialmente los residuos de aminoácidos glicina, serina y treonina; más preferentemente comprende esencialmente los residuos de aminoácidos glicina y serina.
- X2 que comprende un dominio alfa3 o péptido designa un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de un dominio alfa3 de un antígeno HLA-G, o un fragmento funcional del mismo, y carece esencialmente de otros dominios de HLA-G. Más preferentemente, el péptido alfa3 comprende la secuencia de aminoácidos de un dominio alfa3 de un antígeno HLA-G. En un multímero de la invención, se prefiere que todos los monómeros de alfa3 tengan la misma secuencia de aminoácidos. Sin embargo, también se contempla que los péptidos alfa3 de secuencias diferentes estén presentes en un multímero de la invención.
- El dominio alfa3 de HLA-G está codificado por el exón 4 y se corresponde con los aminoácidos 207-298 de HLA-G humano de SEC ID N°: 6.
- El dominio alfa1 de HLA-G está codificado por el exón 2 y se corresponde con los aminoácidos 25-114 de HLA-G humano de SEC ID N°: 6.
- Un "fragmento funcional" designa un fragmento que retiene la capacidad para inducir tolerancia al injerto *in vivo* y/o inhibición de la aloproliferación *in vitro*. Más preferentemente, un fragmento funcional de péptidos alfa3 comprende al menos 20, más preferentemente al menos 30, 40 ó 50 aminoácidos consecutivos del dominio alfa3.

En una realización típica, el fragmento funcional contiene al menos 60 aminoácidos consecutivos del dominio alfa3. La funcionalidad del fragmento puede verificarse como se ha desvelado en la sección experimental. En particular, la funcionalidad puede verificarse preparando un multímero de los fragmentos, administrando el multímero a un modelo animal antes del trasplante de órgano/tejido y verificando la tasa de supervivencia del injerto. Si el multímero prolonga la duración de la supervivencia del injerto el 50%, en comparación con placebo, el fragmento puede considerarse funcional.

- La secuencia de aminoácidos de los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 3$ puede derivarse directamente de las publicaciones de Geraghty y col. [1], o Ellis y col. [2]. Estas secuencias también están disponibles en línea (véanse, por ejemplo, Genbank numbers for HLA-G: first cloning of genomic sequence: Geraghty y col., PNAS 1987: PubMed ID: 3480534, GeneID: 3135; First cloning of HLA-G1 cDNA: Ellis y col., Journal of Immunology, 1990. PubMed ID: 2295808).

Además, las secuencias de HLA-G5, HLA-G6 y HLA-G7 también están disponibles de los documentos US5.856.442, US6.291.659, FR2.810.047 o Paul y col., Hum. Immunol 2000; 61: 1138, de los que puede obtenerse directamente la secuencia del dominio alfa1 y alfa3.

- Debe entenderse que existen variantes naturales de los antígenos HLA-G, por ejemplo, como resultado de polimorfismo, que están incluidas en la presente solicitud. Por tanto, variantes de las secuencias anteriores que contienen ciertas sustituciones o inserciones de aminoácidos (por ejemplo, entre 1 y 10, preferentemente de 1 a 5, lo más preferentemente 1, 2, 3, 4 ó 5) también están incluidas en la presente invención.

- El término "multímero" (o polipéptido multimérico) designa una molécula (o una composición o producto) que comprende al menos dos monómeros P1 (P1-P1) como se han definido anteriormente (es decir, monómeros de alfa3 asociados juntos mediante un puente disulfuro) o un soporte.

5 En una realización específica, el péptido alfa3 consiste esencialmente en los aminoácidos 183-274 de un antígeno HLA-G maduro, o un fragmento funcional del mismo.

El péptido alfa1 consiste esencialmente en los aminoácidos 1-90 de un antígeno HLA-G maduro, o un fragmento funcional del mismo.

La secuencia de un péptido alfa3 preferido se proporciona en SEC ID N°: 1.

La secuencia del péptido alfa1 se proporciona en SEC ID N°: 2.

10 La secuencia de un monómero de alfa3 preferido se proporciona en SEC ID N°: 3 (alfa3-L1). El conector L1 se corresponde con las posiciones 1-12 y contiene una cisteína en la posición 2; las posiciones 13 y 14 se corresponden con dos aminoácidos del dominio alfa2 (véase SEC ID N°: 6 correspondiente a HLA-G y en la que alfa2 se corresponde con las posiciones 115-206). Las posiciones 15-106 se corresponden con el dominio alfa3 y las posiciones 107-108 se corresponden con dos aminoácidos del dominio transmembrana; toda la cola hidrófila de HLA-G puede insertarse. Los
15 principales residuos de contacto con moléculas ILT están en las posiciones 27 y 29 de dicha SEC ID N°: 3.

Otra secuencia de un monómero de alfa3 se proporciona en SEC ID N°: 5. El conector L2 se corresponde con las posiciones 1-18 y contiene una cisteína en la posición 1; las posiciones 19 y 20 se corresponden con dos aminoácidos del dominio alfa2 (véase SEC ID N°: 6 correspondiente a HLA-G y en la que alfa2 se corresponde con las posiciones 115-206). Las posiciones 21-111 se corresponden con el dominio alfa3 y las posiciones 112-113 se corresponden con
20 dos aminoácidos del dominio transmembrana.

La secuencia de monómero de alfa1-alfa3 (que no es parte de la presente invención) se proporciona en SEC ID N°: 4. Las posiciones 1-90 de SEC ID N°: 4 se corresponden con el dominio alfa1; las posiciones 91-182 de SEC ID N°: 4 se corresponden con el dominio alfa3 y las posiciones 183-184 se corresponden con dos aminoácidos del dominio transmembrana; puede insertarse toda la cola hidrófila de HLA-G. Cys42 se usa para la dimerización. Los principales
25 residuos de contacto con moléculas de ILT están en las posiciones 103 y 105.

Dentro de los multímeros de la presente invención, los diversos monómeros pueden unirse juntos de diferente manera tal como, sin limitación, mediante puentes disulfuro (especialmente para un dímero), o mediante un grupo espaciador y/o un soporte.

30 En una realización preferida de la presente invención, los monómeros de alfa3, como se definen aquí anteriormente, se unen covalentemente o mediante una interacción por afinidad.

Un ejemplo particular de un multímero de la invención es un dímero P1-P1.

A este respecto, la invención se refiere a un dímero de alfa3 que tiene dos monómeros P1 de SEC ID N°: 3 asociados juntos mediante un puente disulfuro. Más específicamente, los dos péptidos alfa3 se unen mediante un puente disulfuro entre los residuos de cisteína presentes en el extremo N del conector X1.

35 En otra realización particular, los monómeros de alfa3 se unen mediante un espaciador o un soporte. En una realización particular, los monómeros se unen a un soporte, produciendo así un multímero. El soporte puede ser de naturaleza diferente. Es preferentemente biocompatible, y lo más preferentemente biológicamente inerte. El soporte puede ser una molécula, tal como una proteína, por ejemplo, albúmina (por ejemplo, albúmina de suero humano), o un soporte sólido inerte. Los monómeros pueden unirse al soporte mediante diferentes tipos de reacciones de
40 acoplamiento, tales como interacción por afinidad o el uso de grupos funcionales. La interacción por afinidad puede obtenerse recubriendo el soporte con ligandos que se unen al péptido alfa3 (por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de los mismos). La interacción por afinidad también puede obtenerse añadiendo a los monómeros de alfa3 y al vehículo, respectivamente, un miembro de un par de unión (por ejemplo, avidina y biotina). El acoplamiento también puede obtenerse mediante grupos bifuncionales tales como maleimida, etc. Además, debe observarse que los multímeros
45 pueden contener monómeros unidos a un soporte y adicionalmente que interaccionan en el puente disulfuro intermolecular.

En una realización particular, un multímero de la presente invención es una molécula que comprende dos o más monómeros de alfa3 unidos a un soporte.

50 Los multímeros de la presente invención pueden producirse por diversas técnicas. Como se trata anteriormente, los monómeros pueden acoplarse juntos mediante diferentes técnicas de acoplamiento, tales como enlace covalente (por ejemplo, puente disulfuro, grupo bifuncional, etc.) o reacción de afinidad.

Para la producción de un multímero de monómeros de alfa3 P1 como se ha definido anteriormente mediante enlace disulfuro:

5 en una primera etapa, dos monómeros de alfa3 P1 que comprenden un grupo SH lateral (proporcionado por el conector peptídico X1) se ponen en contacto en disolución, en condiciones que permiten la formación de un enlace disulfuro; en una segunda etapa y, preferentemente, los dímeros o multímeros se separan. Los multímeros pueden separarse de los monómeros, por ejemplo, basándose en su peso molecular, por ejemplo, por electroforesis en gel (tal como PAGE). La formación adecuada de multímeros también puede verificarse usando tal procedimiento sobre muestras de alícuotas, para medir la cantidad relativa de multímero presente en la disolución y, si fuera necesario, ajustar la condición de reacción. Condiciones que permiten la formación de 10 enlace disulfuro incluyen, por ejemplo, una temperatura de 10-30 °C durante 2-24 horas.

Para la producción de un multímero mediante el uso de un soporte, los monómeros normalmente se incuban en presencia del soporte en condiciones que permiten la unión de los monómeros sobre el soporte y, preferentemente, el multímero se separa. El soporte puede ser por ejemplo, un soporte sólido. El soporte también puede ser una proteína, tal como albúmina de suero. Con el fin de facilitar la interacción entre los monómeros y el soporte, el soporte puede 15 funcionalizarse para contener grupos reactivos que pueden interaccionar con los monómeros. Como un ejemplo, el soporte puede recubrirse con un ligando de péptido alfa3, tal como anticuerpos o fragmentos de los mismos (por ejemplo, fragmentos Fab, fragmentos CDR, ScFv, etc.) o un reactivo de acoplamiento químico (por ejemplo, maleimida). Como un ejemplo, el soporte puede recubrirse con un fragmento Fc anti-IgG humana y el ligando puede ser una IgG policlonal humana dirigida contra un antígeno HLA-G1. En un caso tal, los monómeros, soporte y ligando 20 pueden incubarse juntos, con el fin de permitir la asociación apropiada de los monómeros a las perlas.

Los multímeros alfa3 de la invención pueden producirse por técnicas conocidas por sí mismas en la materia, tales como técnicas recombinantes, técnicas enzimáticas o síntesis artificial, preferentemente por síntesis artificial, tal como la síntesis de Merrifield.

25 En una realización preferida, los péptidos alfa3 X2 y los monómeros de alfa3 P1 se producen por síntesis artificial usando química conocida y sintetizadores.

Los multímeros de alfa3 pueden comprender tanto aminoácidos naturales como residuos de aminoácidos no naturales o modificados. Pueden estar en la conformación L y/o D. Los péptidos pueden comprender tanto enlaces amina como enlaces de peptidomiméticos modificados. Por tanto, los péptidos pueden estar terminalmente protegidos y/o modificados, por ejemplo, mediante alteración química o física de, por ejemplo, funciones laterales.

30 En una realización adicional, el soporte y monómeros pueden modificarse para contener grupos reactivos de forma cruzada (por ejemplo, avidina y biotina). En un caso tal, la incubación del soporte y monómeros producirá la multimerización sobre el soporte.

35 El multímero formado (es decir, el complejo entre el soporte y el monómero de alfa3) puede aislarse usando diversas técnicas conocidas por sí mismas en la materia, que incluyen centrifugación, sedimentación, separación electromagnética, etc.

Ejemplos específicos de multímeros de la invención son:

- multímeros de monómeros de alfa3 de SEC ID N°: 3 unidos mediante puente disulfuro;
- multímeros de monómeros de alfa3 de SEC ID N°: 3 unidos a un soporte tal como una microperla.

Como se ha mencionado en los ejemplos, estos multímeros pueden promover la tolerancia al injerto *in vivo*.

40 Además, los dímeros de monómero de alfa3 de SEC ID N°: 3 también representan objetivos específicos de la invención. La invención de hecho muestra que dichos dímeros tienen actividad sustancial *in vivo* para tratar el rechazo de injerto y pueden usarse para preparar multímeros muy activos.

45 La invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un multímero como se ha definido anteriormente u obtenible mediante un procedimiento como se ha desvelado anteriormente y, preferentemente, al menos un vehículo o soporte farmacéuticamente aceptable.

Otro objetivo de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende un dímero de alfa3 que tiene dos monómeros de SEC ID N°: 3 y, preferentemente, al menos un vehículo o soporte farmacéuticamente aceptable.

50 Vehículos o soportes adecuados incluyen cualquier vehículo farmacéuticamente aceptable tal como agentes de tamponamiento, agentes estabilizantes, diluyentes, sales, conservantes, agentes emulsionantes, edulcorantes, etc. El vehículo normalmente comprende una disolución acuosa o no acuosa isotónica que puede prepararse según técnicas conocidas. Disoluciones adecuadas incluyen solutos tamponados, tales como disolución tamponada con fosfato,

disoluciones de cloruro, disolución de Ringer y similares. La preparación farmacéutica normalmente está en forma de una composición inyectable, preferentemente una composición líquida inyectable, aunque también pueden contemplarse otras formas, tales como comprimidos, cápsulas, jarabes, etc. Las composiciones según la invención pueden administrarse por varias vías diferentes, tales como por la vía sistémica, parenteral, oral, rectal, nasal o vaginal.

5 Se administran preferentemente mediante inyección, tal como inyección intravenosa, intraarterial, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea. También se contempla administración transdérmica. La dosificación específica puede ajustarse por el experto, dependiendo de la afección patológica, el sujeto, la duración del tratamiento, la presencia de otros principios activos, etc. Normalmente, las composiciones comprenden dosis unitarias de entre 10 ng y 100 mg de multímero, más preferentemente entre 1 µg y 50 mg, incluso más preferentemente entre 100 µg y 50 mg. Las
10 composiciones de la presente invención se administran preferentemente en cantidades eficaces, es decir, en cantidades que son, con el tiempo, suficientes para al menos reducir o prevenir la progresión de la enfermedad. A este respecto, las composiciones de la presente invención se usan preferentemente en cantidades que permiten la reducción de una respuesta inmunitaria perjudicial o no deseada en un sujeto.

15 Dichos polipéptidos multiméricos pueden usarse como agentes tolerogénicos que pueden imitar la función completa de HLA-G. Los principales usos terapéuticos de estos compuestos serían trasplante, con el fin de inducir y mantener la tolerancia a aloinjertos, pero también pueden ser enfermedades autoinmunitarias, o enfermedades inflamatorias, con el fin de detener las respuestas auto-inmunitarias e inflamación, y posiblemente restablecer la auto-tolerancia. Las ventajas de tales polipéptidos son protocolos de producción/purificación comparativamente más fáciles, más baratos, más controlados, más seguros que los procedimientos de producción clásicos que implican organismos procariontes o
20 eucariotes y significativamente más activos que la isoforma de HLA-G6 o péptidos de control como se definen en los ejemplos [(alfa3-L2)x2].

Como se ha mencionado anteriormente, los multímeros de la presente invención tienen fuerte actividad inmunorreguladora y pueden usarse para tratar una variedad de condiciones de enfermedad asociadas a respuesta inmunitaria anormal o no deseada. Más específicamente, los multímeros de la invención son adecuados para tratar
25 trastornos inmunorrelacionados tales como, particularmente, rechazo de órgano o tejido, enfermedades inflamatorias o enfermedades auto-inmunitarias. Pueden inhibir sustancialmente el rechazo de injerto alógeno *in vivo*.

La presente invención también se refiere a un multímero o composición como se ha desvelado anteriormente para tratar rechazo de injerto.

30 La invención se refiere además a un procedimiento de tratamiento de rechazo de injerto en un sujeto, comprendiendo el procedimiento administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad eficaz de una composición como se ha desvelado anteriormente.

El término tratar designa, por ejemplo, la promoción de la toleración al injerto dentro del sujeto receptor. El tratamiento puede realizarse antes, durante y/o después del injerto, y puede usarse como terapia alternativa a los agentes inmunosupresores existentes o como una terapia combinada con agentes inmunosupresores actuales. La invención es
35 aplicable a trasplante alógeno, semi-alógeno o incluso xenógeno, y puede usarse para cualquier tipo de órganos o tejidos trasplantados que incluyen, sin limitación, tejidos sólidos, tejidos líquidos o células, que incluyen corazón, piel, riñón, hígado, pulmón, hígado-riñón, etc.

40 La invención también se refiere a un procedimiento mejorado de trasplante de un órgano o tejido en un sujeto, comprendiendo la mejora administrar al sujeto, antes, durante y/o después del trasplante, una cantidad eficaz de una composición como se ha desvelado anteriormente.

La invención se refiere además a un procedimiento de promoción de la tolerancia al injerto en un sujeto, comprendiendo el procedimiento administrar al sujeto, antes, durante y/o después del trasplante, una cantidad eficaz de una composición como se ha desvelado anteriormente.

45 La invención se refiere además a un procedimiento de reducción del rechazo de injerto en un sujeto, comprendiendo el procedimiento administrar al sujeto, antes, durante y/o después del trasplante, una cantidad eficaz de una composición como se ha desvelado anteriormente.

En una realización preferida, la composición se administra al menos dos veces al sujeto. De hecho, los resultados mostrados en la presente solicitud demuestran que una administración repetida conduce a un elevado beneficio adicional, por ejemplo, a una tolerancia al injerto significativamente elevada adicional *in vivo*.

50 Debe entenderse que la cantidad de la composición en realidad administrada debe determinarse y adaptarse por un médico, en vista de las circunstancias relevantes que incluyen la afección o afecciones que van a tratarse, la composición exacta administrada, la edad, peso y respuesta del paciente individual, la gravedad de los síntomas del paciente y la vía de administración elegida. Por tanto, los intervalos de dosificación anteriores pretenden proporcionar orientación general y soporte para las enseñanzas en el presente documento, pero no pretenden limitar el alcance de la

invención.

Además de las disposiciones anteriores, la invención también comprende otras disposiciones que surgirán de la siguiente descripción, que se refiere a ejemplos de implementación de la presente invención y también a los dibujos adjuntos, en los que:

- 5 - **Figura 1:** Modelo 3D del dímero (alfa3)x2. **A:** Modelo del polipéptido dimerizado. Cada monómero está en un gris diferente. La cisteína libre artificialmente introducida se muestra por esferas, permitiendo la dimerización. **B:** Superposición de la estructura del péptido alfa3 con la de la molécula de HLA-G completa. La molécula de HLA-G completa (que incluye beta-2 microglobulina y péptido) se muestra en hilos claros. El péptido alfa3 se muestra en representación de cinta 3D. Las estructuras del dominio alfa3 de HLA-G y del péptido alfa3 están superpuestas.
- 10 - **Figura 2:** Modelo 3D de la unión del polipéptido (alfa3)x2 a moléculas de ILT4. Solo se muestra la mitad del dímero de (alfa3)x2.
- **Figura 3:** Unión de diferentes dímeros a los receptores de HLA-G ILT2, ILT4, KIR2DL4: (alfa3-L1)x2: dímero P1-P1 según la invención en el que L1 representa un conector particular X1; (alfa3-L2)x2: péptido de control; (alfa1-alfa3)x2: péptido de control. Un pico que está situado a la derecha de la barra vertical indica reconocimiento por el receptor indicado.
- 15 - **Figura 4:** Resultados de toxicidad celular.
- **Figura 5:** Efecto de diferentes péptidos sobre la aloproliferación de linfocitos T *in vitro*: (alfa3-L1)x2: dímero P1-P1 según la invención en el que L1 representa un conector particular X1; (alfa3-L2)x2: péptido de control; (alfa1-alfa3)x2: péptido de control. Gráfico de barras: proliferación indexada según controles, los EEM se informan como barras de error. % de inhibición: representa el grado de inhibición mediada por los péptidos.
- 20 - **Figura 6:** Estructuras generales de dímeros de (alfa3-L1)x2 y (alfa3-L2)x2.
- **Figura 7:** Esquema estructural de monómeros de alfa3-L1 y alfa3-L2.
- **Figura 8:** Esquema estructural de dímeros de (alfa3-alfa1)x2.

25 **Ejemplo 1: Preparación de péptidos de SEC ID N°: 1-5**

Los péptidos de SEC ID N°: 1-5 se sintetizaron usando un sintetizador de péptidos.

Se han producido diferentes dímeros:

- (alfa3-L1)x2 (SEC ID N°: 3) en la que L1 se corresponde con un conector peptídico flexible según la invención, es decir, que comprende principalmente los residuos de aminoácidos glicina y serina;
- 30 - (alfa3-L2)x2 (SEC ID N°: 5) en la que L2 se corresponde con los aminoácidos 1-18 de dicho SEC ID N°: 5 y se deriva de los residuos de aminoácidos de alfa1 42-30 (del extremo N y al extremo C) de HLA-G (véase SEC ID N°: 6);
- (alfa1-alfa3)x2; SEC ID N°: 4 se corresponde con un monómero de alfa1-alfa3 (que no es parte de la presente invención).

35 Las Figuras 6, 7 y 8 ilustran las estructuras generales de los péptidos sintetizados.

Ejemplo 2: Dímeros de alfa3 y alfa3-alfa1 mediante enlace disulfuro

1) Dímeros de alfa3

Los monómeros de alfa3 de SEC ID N°: 3 o SEC ID N°: 5 se sintetizaron químicamente. Los monómeros se sintetizaron primero, luego se replegaron permitiendo la generación de enlaces disulfuro entre las dos cisteínas dentro del dominio alfa3 (cisteínas 35 y 91 de SEC ID N°: 3, cisteínas 41 y 97 de SEC ID N°: 5). Entonces se realizó la dimerización generando un puente disulfuro entre las cisteínas dentro del conector X1 de dos monómeros (cisteína 2 de SEC ID N°: 3, cisteína 1 de SEC ID N°: 5). La pureza de los productos sintetizados se verificó por espectrometría de masas.

La visualización de los multímeros de alfa3 se logró por separación por electroforesis: las muestras se desnaturalizaron por calor en presencia de tampón de Laemmli en condición no reductora (sin β -mercaptoetanol) y luego se separaron por migración electroforética en SDS-PAGE al 12 %. La presencia de dímeros se visualizó luego después de la coloración por azul de Coomassie.

Se muestra un modelo tridimensional del dímero de SEC ID N°: 3 en la Figura 1. Basándose en la modelización computacional, esta estructura puede unirse al receptor de HLA-G ILT4 (mostrado en la Figura 2; véase también la Figura 3).

2) Dímeros de alfa1-alfa3 (que no es parte de la presente invención)

5 Los monómeros de alfa1- alfa3 de SEC ID N°: 4 se sintetizaron químicamente. Los monómeros se sintetizaron primero, luego se replegaron permitiendo la generación de enlaces disulfuro entre las dos cisteínas dentro del dominio alfa3 (cisteínas 111 y 167 de SEC ID N°: 4). Entonces se realizó la dimerización generando un puente disulfuro entre dos cisteínas dentro del dominio alfa1 de dos monómeros (cisteína 42 de SEC ID N°: 4). La pureza de los productos sintetizados se verificó por espectrometría de masas.

10 La visualización de los multímeros de alfa3 se logró por separación por electroforesis: las muestras se desnaturalizaron por calor en presencia de tampón de Laemmli en condición no reductora (sin β -mercaptoetanol) y luego se separaron por migración electroforética en SDS-PAGE al 12 %. La presencia de dímeros se visualizó luego después de la coloración por azul de Coomassie.

La secuencia del polipéptido alfa1+alfa3 se muestra en SEC ID N°: 4.

15 **Ejemplo 3: Ensayos de unión a receptor**

Para probar la unión a los receptores de HLA-G ILT2, ILT4 y KIR2DL4, 12 μ g de dímeros obtenidos según el Ejemplo 2 se recubrieron covalentemente sobre perlas de poliestireno Bio-Plex-COOH (Bio-Rad) según las recomendaciones del fabricante. Entonces, las perlas se resuspendieron a una concentración de 2000 perlas por 50 μ l en 1x tampón de ensayo Luminex (Interchim). Entonces se añadieron receptores recombinantes fusionados a la parte Fc de una IgG humana (ILT2-Fc, ILT4-Fc, R&D Biosystems) a 2 μ g/ml. Entonces, las perlas y los receptores se incubaron durante 90 minutos en la oscuridad sobre un agitador antes de lavar dos veces con 200 μ l de 1x PBS, 0,05 % de Tween. Entonces, las perlas se resuspendieron en 50 μ l de PBS-tampón de ensayo de Luminex que contenía 2 μ g/ml de anticuerpo de cabra anti-IgG humana conjugada con ficoeritrina (Sigma) durante 30 minutos en la oscuridad en un agitador rotatorio. Entonces, las perlas se lavaron dos veces con 200 μ l de 1x PBS, 0,05 % de Tween y se resuspendieron en 300 μ l de 1x PBS.

La fluorescencia, indicativa del reconocimiento de péptidos por los receptores, se evaluó por citometría de flujo realizada en un citómetro Epics XL (Beckman Coulter) usando el software EXPO32 (Beckman Coulter).

La Figura 3 ilustra los resultados y muestra claramente que todos los péptidos que contienen el dominio alfa3 de hecho se unen específicamente al receptor de ILT4.

30 **Ejemplo 4: Toxicidad celular**

La toxicidad celular del dímero (alfa3-L1)x2 sintético del Ejemplo 1 se evaluó en células mononucleares periféricas (CMSP) recientemente aisladas a 100.000 células / ml en pocillos de 200 μ l, para la dosis de dímeros que oscila de 0 a 100 μ g/ml y durante tiempos de incubación que oscilan de 0 a 24 horas a 37 °C. La toxicidad se evaluó analizando la viabilidad celular usando incorporación de azul de tripano en células muertas y cálculo de la relación de células vivas frente a células muertas.

Los resultados (Figura 4) muestran que dichos dímeros no son tóxicos hacia CMSP.

Ejemplo 5: Reacción de linfocitos mezclados (MLR)

Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de sangre completa heparinizada de donantes voluntarios sanos por centrifugación en gradiente de densidad sobre Ficoll-Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich). Las CMSP se usaron como células respondedoras o estimulantes irradiadas con γ (25 Gy). Para evaluar las funciones de péptidos sintéticos en ensayos de alo-estimulación, 10⁵ células respondedoras en 100 μ l se incubaron previamente con péptido a una concentración de 100 μ g/ml durante 6 horas, y luego se mezclaron con 10⁵ CMSP estimulantes alógenas irradiadas con γ (25 gy) en 100 μ l para obtener una concentración de péptido final de 50 μ g/ml en un volumen final de 200 μ l por pocillo. Todas las muestras se realizaron por triplicado, y para cada combinación alógena se incluyeron células respondedoras solas, células estimuladas irradiadas solas, controles autólogos y controles sin tratar. Después de una incubación de 5 días a 37 °C y 5 % de CO₂ en una estufa de incubación humidificada, los cultivos se pulsaron con timidina tritiada (1 μ Ci por pocillo, Amersham Biosciences). La incorporación de ³H timidina en ADN se cuantificó 18 horas después en un contador β (Wallac 1450, Amersham Biosciences).

La Figura 5 ilustra los resultados y muestra que los dímeros de alfa3 según la invención [(alfa3-L1)x2 en dicha Figura 5] inhiben significativamente la aloproliferación de linfocitos T en comparación con el dímero de (alfa3-L2)x2 y dímero de (alfa1-alfa3)x2.

REFERENCIAS

1. Geraghty DE, Koller BH, Orr HT (1987) A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with shortened cytoplasmic segment. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 9145-9149.
- 5 2. Ellis SA, Palmer MS, McMichael AJ (1990) Human trophoblast and the choriocarcinoma cell line BeWo express a truncated HLA Class I molecule. *J Immunol* 144: 731-735.
3. Carosella, E. D., Dausset, J., Kirszenbaum, M. (1996) HLA-G revisited. *Immunol Today* 17: 407-409.
4. Kirszenbaum M, Moreau P, Gluckman E, Dausset J, Carosella E (1994) An alternatively spliced form of HLA-G mRNA in human trophoblasts and evidence for the presence of HLA-G transcript in adult lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 4209-4213.
- 10 5. Kirszenbaum M, Moreau P, Teyssier M, Lafon C, Gluckman E y col. (1995) Evidence for the presence of the alternatively spliced HLA-G mRNA forms in human mononuclear cells from peripheral blood and umbilical cord blood. *Hum Immunol* 43: 237-241.
6. Moreau P, Carosella E, Teyssier M, Prost S, Gluckman E y col. (1995) Soluble HLA-G molecule. An alternatively spliced HLA-G mRNA form candidate to encode it in peripheral blood mononuclear cells and human trophoblasts. *Hum Immunol* 43: 231-236.
- 15 7. Rouas-Freiss N, Marchal RE, Kirszenbaum M, Dausset J, Carosella ED (1997) The alpha1 domain of HLA-G1 and HLA-G2 inhibits cytotoxicity induced by natural killer cells: is HLA-G the public ligand for natural killer cell inhibitory receptors? *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 5249-5254.
8. Rouas-Freiss N, Goncalves RM, Menier C, Dausset J, Carosella ED (1997) Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 11520-11525.
- 20 9. Rouas-Freiss N, Khalil-Daher I, Riteau B, Menier C, Paul P y col. (1999) The immunotolerance role of HLA-G. *Semin Cancer Biol* 9: 3-12.
10. LeMaout J, Krawice-Radanne I, Dausset J, Carosella ED (2004) HLA-G1-expressing antigen-presenting cells induce immunosuppressive CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 7064-7069.
- 25 11. Naji A, Le Rond S, Durrbach A, Krawice-Radanne I, Creput C y col. (2007) CD3+CD4^{low} and CD3+CD8^{low} are induced by HLA-G: novel human peripheral blood suppressor T-cell subsets involved in transplant acceptance. *Blood* 110: 3936-3948.
12. Lila N, Carpentier A, Amrein C, Khalil-Daher I, Dausset J y col. (2000) Implication of HLA-G molecule in heart-graft acceptance. *Lancet* 355: 2138.
- 30 13. Creput C, Durrbach A, Menier C, Guettier C, Samuel D y col. (2003) Human leukocyte antigen-G (HLA-G) expression in biliary epithelial cells is associated with allograft acceptance in liver-kidney transplantation. *J Hepatol* 39: 587-594.
14. Qiu J, Terasaki PI, Miller J, Mizutani K, Cai J y col. (2006) Soluble HLA-G Expression and Renal Graft Acceptance. *Am J Transplant* 6: 2152-2156.
- 35 15. Yan WH, Fan LA (2005) Residues met76 and gln79 in HLA-G alpha1 domain involve in KIR2DL4 recognition. *Cell Res* 15: 176-182.
16. Colonna M, Navarro F, Bellon T, Llano M, Garcia P y col. (1997) A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells. *J Exp Med* 186: 1809-1818.
- 40 17. Colonna M, Samaridis J, Cella M, Angman L, Allen RL y col. (1998) Human myelomonocytic cells express an inhibitory receptor for classical and nonclassical MHC class I molecules. *J Immunol* 160: 3096-3100.
18. Allan DS, Colonna M, Lanier LL, Churakova TD, Abrams JS y col. (1999) Tetrameric complexes of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G bind to peripheral blood myelomonocytic cells. *J Exp Med* 189: 1149-1156.
- 45 19. Shiroishi M, Tsumoto K, Amano K, Shirakihara Y, Colonna M y col. (2003) Human inhibitory receptors Ig-like transcript 2 (ILT2) and ILT4 compete with CD8 for MHC class I binding and bind preferentially to HLA-G. *Proc Natl*

Acad Sci USA 100: 8856-8861.

20. Shiroishi M, Kuroki K, Ose T, Rasubala L, Shiratori I y col. (2006) Efficient Leukocyte Ig-like Receptor Signaling and Crystal Structure of Disulfide-linked HLA-G Dimer. *J Biol Chem* 281: 10439-10447.

5 21. Shiroishi M, Kuroki K, Rasubala L, Tsumoto K, Kumagai I y col. (2006) Structural basis for recognition of the nonclassical MHC molecule HLA-G by the leukocyte Ig-like receptor B2 (LILRB2/LIR2/ILT4/CD85d). *PNAS* 103: 16412-16417.

22. Caumartin J, Favier B, Daouya M, Guillard C, Moreau P y col. (2007) Trogocytosis-based generation of suppressive NK cells. *EMBO J* 26: 1423-1433.

10 23. Gonen-Gross T, Achdout H, Arnon TI, Gazit R, Stem N y col. (2005) The CD85J/Leukocyte Inhibitory Receptor-1 Distinguishes between Conformed and {beta}2-Microglobulin-Free HLA-G Molecules. *J Immunol* 175: 4866-4874.

24. Gonen-Gross T, Achdout H, Gazit R, Hanna J, Mizrahi S y col. (2003) Complexes of HLA-G protein on the cell surface are important for leukocyte Ig-like receptor-1 function. *J Immunol* 171: 1343-1351.

15 25. Boyson JE, Erskine R, Whitman MC, Chiu M, Lau JM y col. (2002) Disulfide bond-mediated dimerization of HLA-G on the cell surface. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 16180-16185.

26. Riteau B, Moreau P, Menier C, Khalil-Daher I, Khosrotehrani K y col. (2001) Characterization of HLA-G1, -G2, -G3, and -G4 isoforms transfected in a human melanoma cell line. *Transplant Proc* 33: 2360-2364.

20 27. Lila N, Amrein C, Guillemain R, Chevalier P, Latremouille C y col. (2002) Human leukocyte antigen-G expression after heart transplantation is associated with a reduced incidence of rejection. *Circulation* 105: 1949-1954.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE

LE MAOULT, Joël

CAROSELLA, Edgardo Delfino

25

<120> POLIPÉPTIDOS MULTÍMEROS DE HLA-G QUE INCLUYEN AL MENOS DOS DOMINIOS ALFA3 Y USOS FARMACÉUTICOS DE LOS MISMOS

<130> BLOcp263/407

30

<160> 6

<170> Patent In versión 3.3

35

<210> 1

<211> 92

<212> PRT

<213> humana

40

<220>

<223> péptido alfa3 de HLA-G

ES 2 515 241 T3

<400> 1

```

Asp Pro Pro Lys Thr His Val Thr His His Pro Val Phe Asp Tyr Glu
1           5           10           15

Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe Tyr Pro Ala Glu Ile Ile
           20           25           30

Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln Thr Gln Asp Val Glu Leu
           35           40           45

Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe Gln Lys Trp Ala Ala
           50           55           60

Val Val Val Pro Ser Gly Glu Glu Gln Arg Tyr Thr Cys His Val Gln
65           70           75           80

His Glu Gly Leu Pro Glu Pro Leu Met Leu Arg Trp
           85           90
    
```

5 <210> 2

<211> 90

<212> PRT

<213> humana

10 <220>

<223> péptido alfa1 de HLA-G

<400> 2

15

```

Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Ser Ala Ala Val Ser Arg Pro Gly
1           5           10           15

Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Met Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln
           20           25           30

Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ser Ala Cys Pro Arg Met Glu Pro Arg
           35           40           45

Ala Pro Trp Val Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Glu Glu Glu Thr
           50           55           60

Arg Asn Thr Lys Ala His Ala Gln Thr Asp Arg Met Asn Leu Gln Thr
65           70           75           80

Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala
           85           90
    
```

ES 2 515 241 T3

<210> 3

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

5

<220>

<223> péptido alfa3-L1

<400> 3

10

```

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

<210> 4

<211> 184

<212> PRT

<213> humana

15

<220>

<223> péptido alfa1-alfa3 de HLA-G

20

<400> 4

ES 2 515 241 T3

Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Ser Ala Ala Val Ser Arg Pro Gly
 1 5 10 15

Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Met Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln
 20 25 30

Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ser Ala Cys Pro Arg Met Glu Pro Arg
 35 40 45

Ala Pro Trp Val Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Glu Glu Glu Thr
 50 55 60

Arg Asn Thr Lys Ala His Ala Gln Thr Asp Arg Met Asn Leu Gln Thr
 65 70 75 80

Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Asp Pro Pro Lys Thr His
 85 90 95

Val Thr His His Pro Val Phe Asp Tyr Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp
 100 105 110

Ala Leu Gly Phe Tyr Pro Ala Glu Ile Ile Leu Thr Trp Gln Arg Asp
 115 120 125

Gly Glu Asp Gln Thr Gln Asp Val Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala
 130 135 140

Gly Asp Gly Thr Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly
 145 150 155 160

Glu Glu Gln Arg Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Glu
 165 170 175

Pro Leu Met Leu Arg Trp Lys Gln
 180

<210> 5

<211> 114

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido alfa3-L2

10

<400> 5

ES 2 515 241 T3

Cys Ala Ser Asp Ser Asp Phe Arg Val Phe Gln Thr Asp Lys Glu Met
1 5 10 15

Leu Gln Arg Ala Asp Pro Pro Lys Thr His Val Thr His His Pro Val
20 25 30

Phe Asp Tyr Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe Tyr Pro
35 40 45

Ala Glu Ile Ile Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln Thr Gln
50 55 60

Asp Val Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe Gln
65 70 75 80

Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Glu Glu Gln Arg Tyr Thr
85 90 95

Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Glu Pro Leu Met Leu Arg Trp
100 105 110

Lys Gln

<210> 6

<211> 338

5 <212> PRT

<213> humana

<220>

<223> HLA-G

10

<400> 6

ES 2 515 241 T3

Met Val Val Met Ala Pro Arg Thr Leu Phe Leu Leu Leu Ser Gly Ala
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Glu Thr Trp Ala Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe
20 25 30

Ser Ala Ala Val Ser Arg Pro Gly Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala
35 40 45

Met Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ser
50 55 60

Ala Cys Pro Arg Met Glu Pro Arg Ala Pro Trp Val Glu Gln Glu Gly
65 70 75 80

Pro Glu Tyr Trp Glu Glu Glu Thr Arg Asn Thr Lys Ala His Ala Gln
85 90 95

ES 2 515 241 T3

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

Glu Ala Ser Ser His Thr Leu Gln Trp Met Ile Gly Cys Asp Leu Gly
 115 120 125

Ser Asp Gly Arg Leu Leu Arg Gly Tyr Glu Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly
 130 135 140

Lys Asp Tyr Leu Ala Leu Asn Glu Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala
 145 150 155 160

Asp Thr Ala Ala Gln Ile Ser Lys Arg Lys Cys Glu Ala Ala Asn Val
 165 170 175

Ala Glu Gln Arg Arg Ala Tyr Leu Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu
 180 185 190

His Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys Glu Met Leu Gln Arg Ala Asp Pro
 195 200 205

Pro Lys Thr His Val Thr His His Pro Val Phe Asp Tyr Glu Ala Thr
 210 215 220

Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe Tyr Pro Ala Glu Ile Ile Leu Thr
 225 230 235 240

Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln Thr Gln Asp Val Glu Leu Val Glu
 245 250 255

Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val
 260 265 270

Val Pro Ser Gly Glu Glu Gln Arg Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu
 275 280 285

Gly Leu Pro Glu Pro Leu Met Leu Arg Trp Lys Gln Ser Ser Leu Pro
 290 295 300

Thr Ile Pro Ile Met Gly Ile Val Ala Gly Leu Val Val Leu Ala Ala
 305 310 315 320

Val Val Thr Gly Ala Ala Val Ala Ala Val Leu Trp Arg Lys Lys Ser
 325 330 335

Ser Asp

REIVINDICACIONES

1. Multímeros, **caracterizados porque** comprenden al menos dos monómeros, estando cada uno de dichos monómeros seleccionado del grupo que consiste en un péptido P1 de fórmula X1-X2 en la que X1 representa un conector peptídico flexible que incluye un aminoácido de cisteína y X2 representa un dominio alfa3 de HLA-G.
- 5 2. Multímeros según la reivindicación 1, **caracterizados porque** el péptido P1 comprende en el extremo C y/o en el extremo N de X2 menos de 20, o menos de 15 o menos de 10 ó 5 aminoácidos adicionales que flanquean el dominio alfa3 en una isoforma de HLA-G nativa.
3. Multímeros según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, **caracterizados porque** el conector peptídico flexible X1 comprende al menos 10-30 aminoácidos y hasta 100 aminoácidos e incluye una cisteína en su extremo N.
- 10 4. Multímeros según la reivindicación 3, **caracterizados porque** dicha cisteína está en las posiciones 1, 2, 3 ó 4 del extremo N.
5. Multímeros según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizados porque** dicho conector peptídico flexible comprende esencialmente residuos de aminoácidos de glicina y serina.
- 15 6. Multímeros según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizados porque** el monómero de alfa3 es proporcionado en SEC ID N^o: 3.
7. Multímero según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado porque** está en forma de un dímero de alfa3 que tiene dos monómeros de SEC ID N^o: 3 asociados juntos mediante un puente disulfuro entre residuos de cisteína presentes en el extremo N del conector X1.
- 20 8. Una composición farmacéutica que comprende un multímero según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y al menos un vehículo o soporte farmacéuticamente aceptable.
9. Los multímeros según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o la composición farmacéutica según la reivindicación 8, para su uso en el tratamiento de rechazo de injerto.
10. Los multímeros según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o la composición farmacéutica según la reivindicación 8 para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmune.

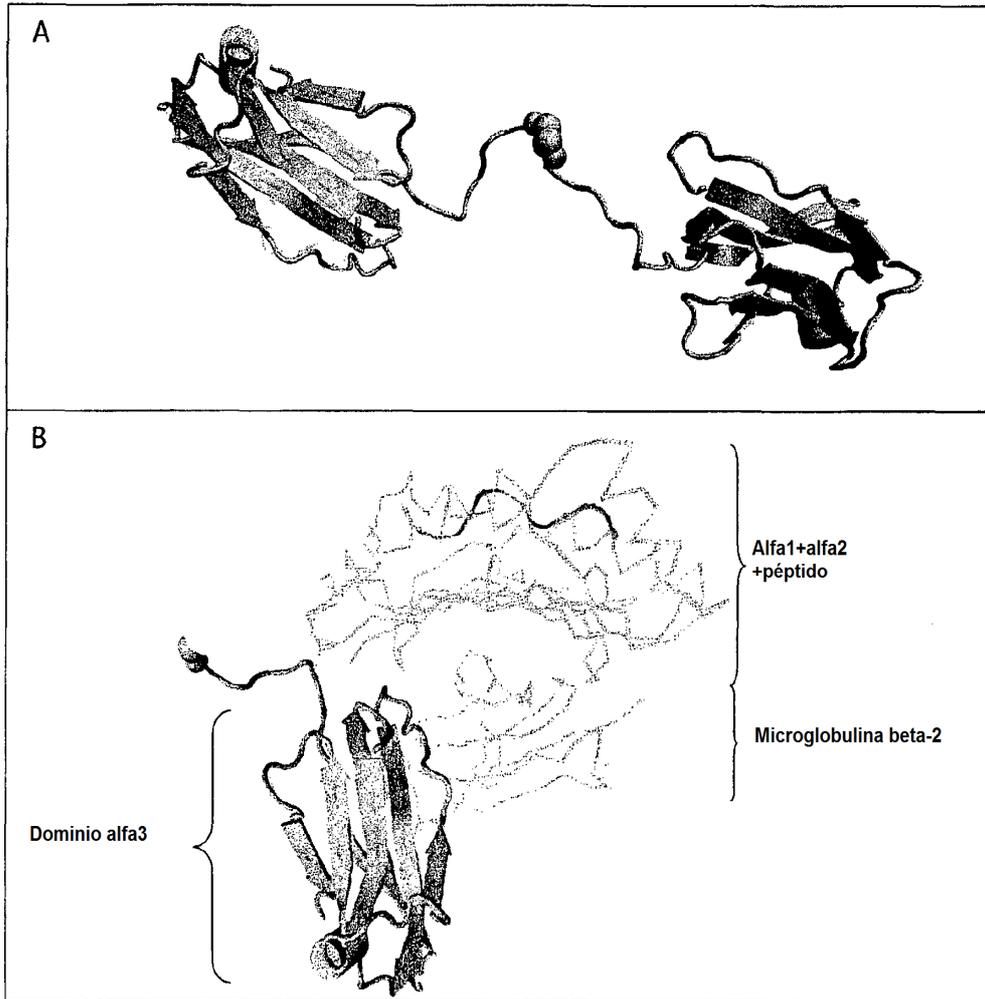


FIGURA 1

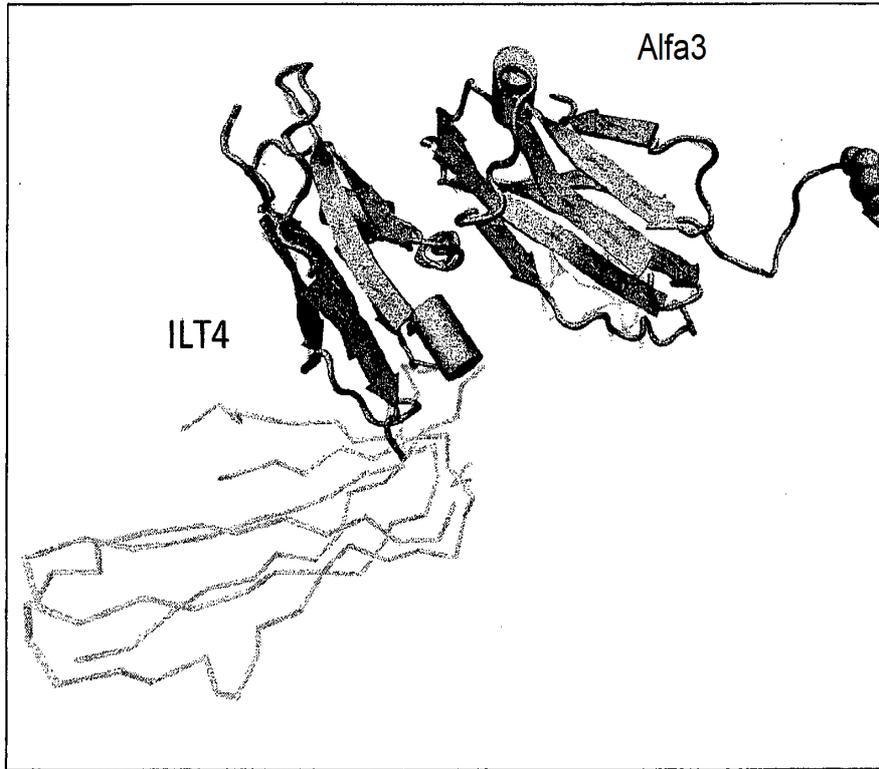


FIGURA 2

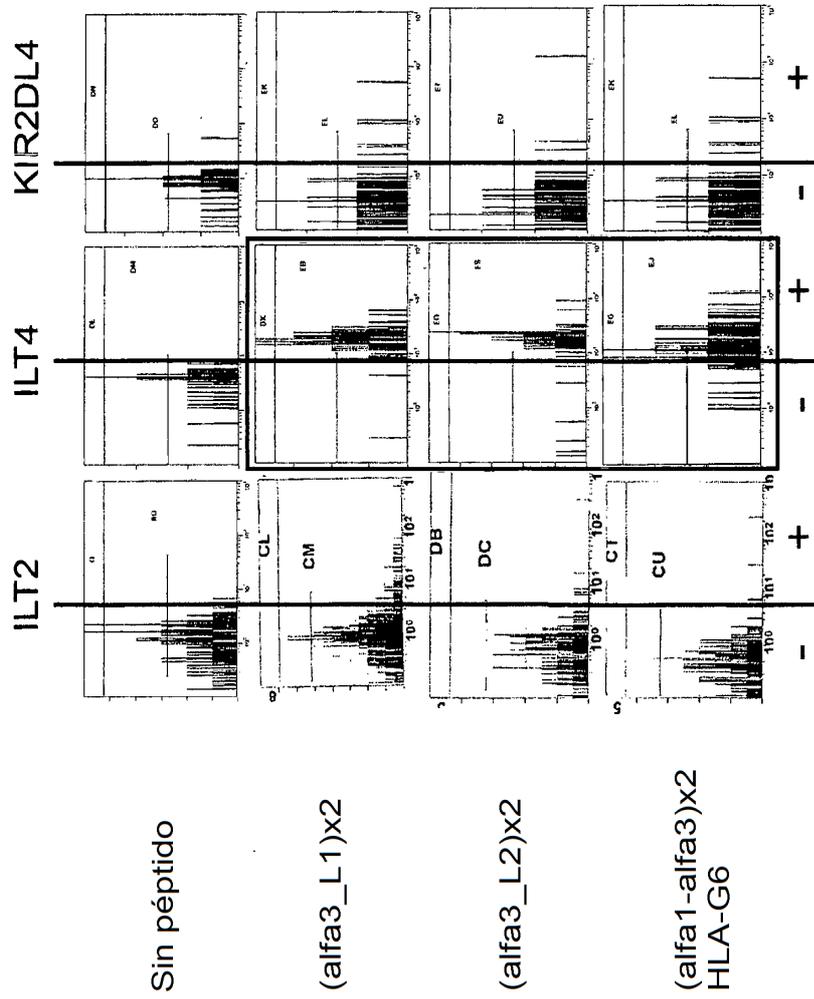


FIGURA 3

Toxicidad celular de (alfa3-L1)x2

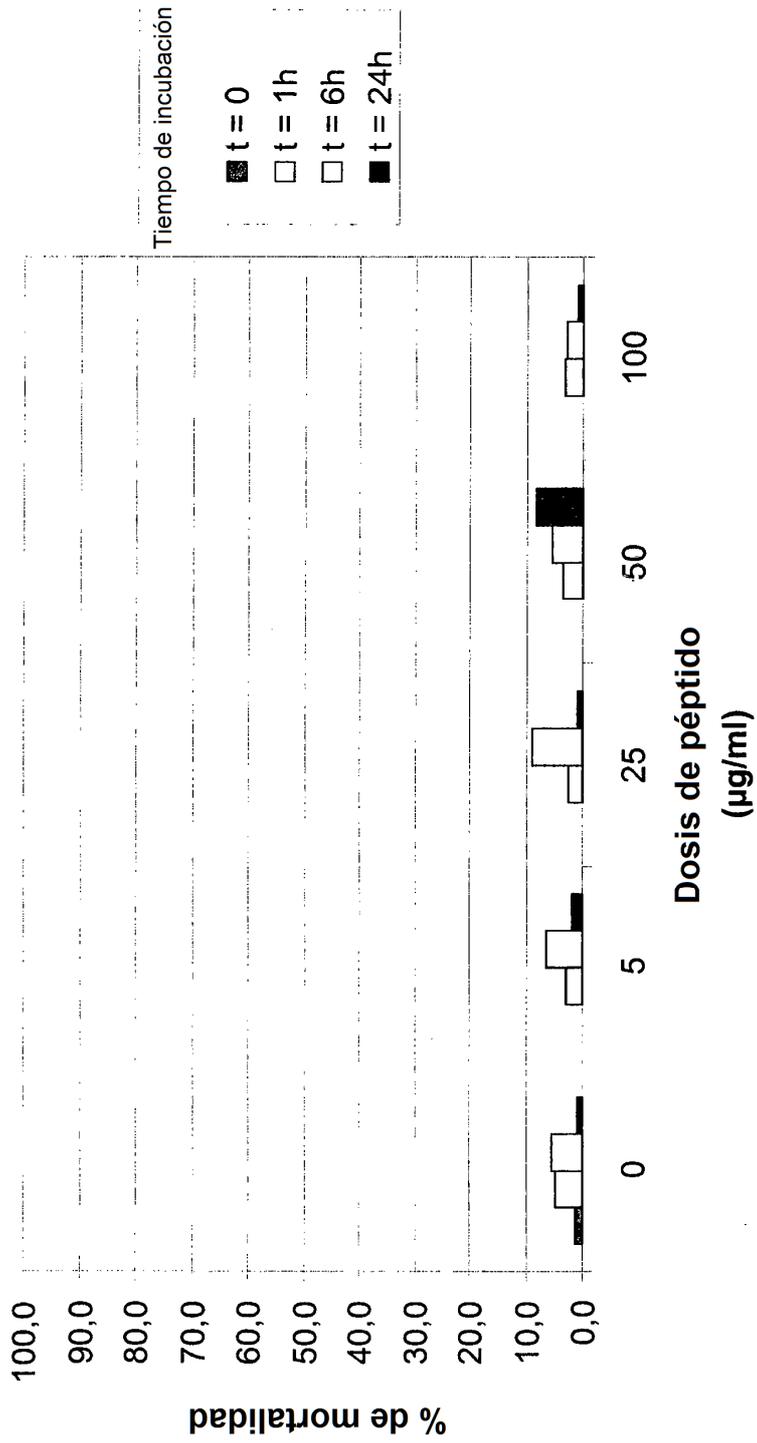
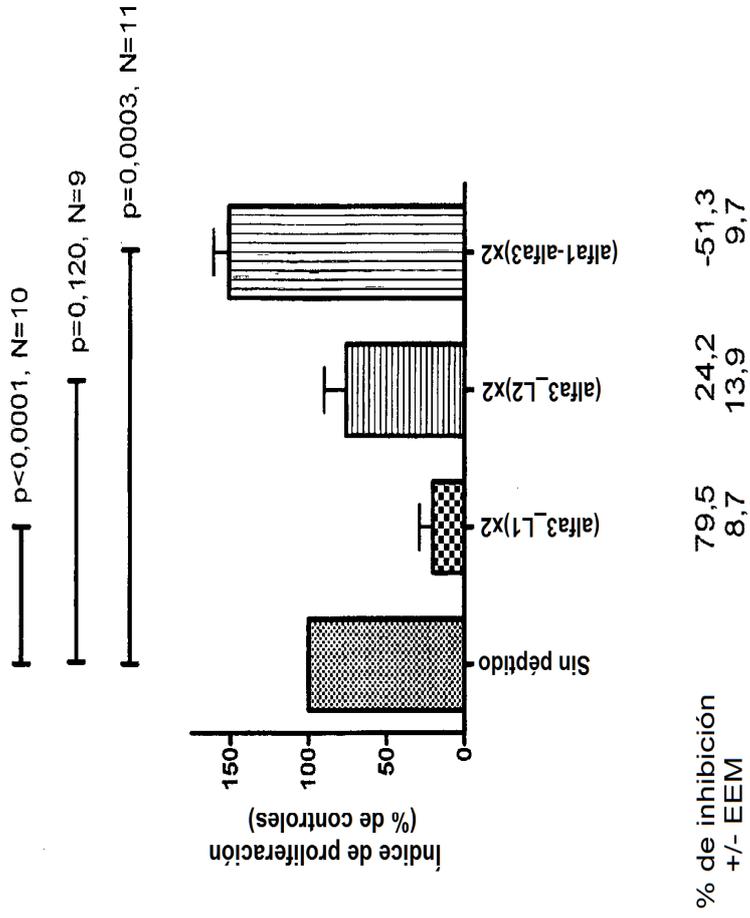


FIGURA 4

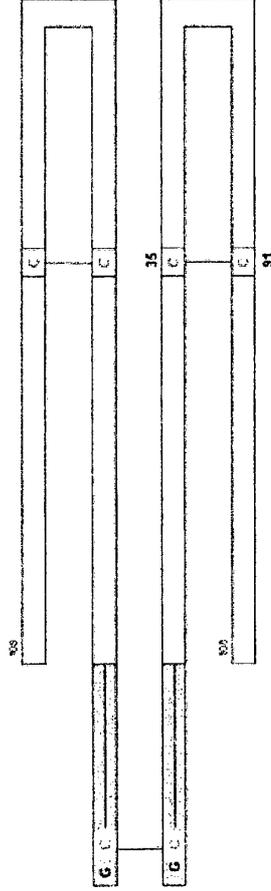
Efecto de péptidos HLA-G sobre la aloproliferación de linfocitos T



Péptido
FIGURA 5

Péptido (alfa3_L1)

GCGGGGGGGSRADPPKTHVTHHPVFDYEATLRCWALGFYPAEIILTWQ
 RDGEDQTQDVELVETRPA GDGTFQKWA AVVPSGEEQRYTCHVQHEGLP
 EPLMLRWKQ (SEC ID N°: 3)



Péptido (alfa3_L2)

CASDSERFVQTDKEMLQRADPPKTHVTHHPVFDYEATLRCWALGFYPAEI
 LTWQRDGEDQTQDVELVETRPA GDGTFQKWA AVVPSGEEQRYTCHVQ
 EGLPEPLMLRWKQ (SEC ID N°: 5)

FIGURA 6

Péptido alfa1-alfa3 (HLA-G6)

alfa 1 GSHSMRYFSAAVSRPGRGEPFIAMGYVDDTQFVRFDSDSACPRME
 PRAPWEQEGPEYWEETRNTKAHAQTRMNLQTLRGYYNQSEADP
 alfa 3 PKTHVTHHPV**FD**YEATLR**C**WALGFYPAEIIITWQRDGEDQTQDVELV
 ETRPAGDGTFFQWAAVVVPSGEEQRYT**C**HVQHEGLPEPLMLRWKQ

(SEC ID N°: 4)

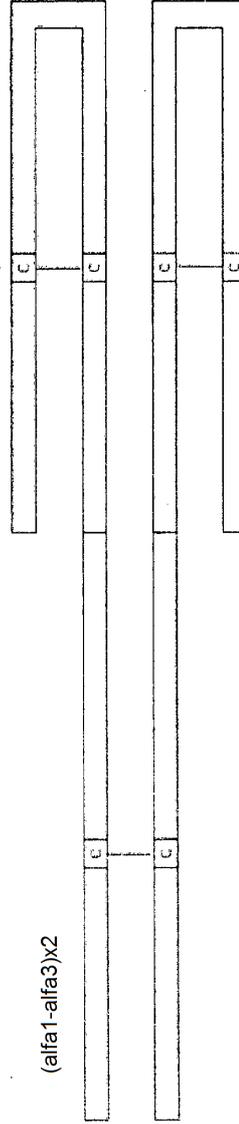


FIGURA 8