

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 509**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2010 E 10740741 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.07.2015 EP 2445935**

54 Título: **Polipéptidos multiméricos de HLA-G que incluyen monómeros $\alpha 1$ - $\alpha 3$ 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:

24.09.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 546 509 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 multiméricos de HLA-G que incluyen monómeros $\alpha 1$ - $\alpha 3$ y usos farmacéuticos de los mismos

La presente invención se refiere a polipéptidos multiméricos y a los usos farmacéuticos de los mismos. La invención se refiere más específicamente a multímeros que comprenden los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 3$ de un antígeno HLA-G. La invención también se refiere a los procedimientos para producir tales multímeros, composiciones farmacéuticas que los comprenden, así como sus usos para tratar diferentes enfermedades, entre ellas el rechazo de órganos o tejidos.

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

Los antígenos de clase I comprenden los antígenos clásicos, HLA-A, HLA-B y HLA-C, que muestran 3 dominios globulares ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$) asociados a la microglobulina $\beta 2$, así como los antígenos no clásicos HLA-E, HLA-F y HLA-G.

El HLA-G es una molécula del HLA de clase I no clásico expresada por los trofoblastos extravellosos de la placenta normal de humano, las células epiteliales tímicas y la córnea. Los antígenos HLA-G se expresan esencialmente en las células citotrofoblásticas de la placenta y funcionan como agentes inmunomoduladores que protegen al feto frente al sistema inmunitario materno (ausencia del rechazo por la madre). Se ha descrito la secuencia del gen de HLA-G [1,2] y comprende 4396 pares de bases. Este gen se compone de 8 exones, 7 intrones y un extremo sin traducir en 3', que corresponden respectivamente a los siguientes dominios: exón 1: secuencia señal, exón 2: dominio extracelular $\alpha 1$, exón 3: dominio extracelular $\alpha 2$, exón 4: dominio extracelular $\alpha 3$, exón 5: región transmembranaria, exón 6: dominio citoplasmático I, exón 7: dominio citoplasmático II (sin traducir), exón 8: dominio citoplasmático III y región sin traducir en 3'.

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 una revisión).

La isoforma proteica madura HLA-G1 comprende los tres dominios externos ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$), la región transmembranaria y el dominio citoplasmático.

La isoforma proteica HLA-G2 no comprende el dominio $\alpha 2$, a saber, los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 3$ están unidos directamente, seguidos por el dominio transmembranario y el dominio citoplasmático.

La isoforma proteica HLA-G3 carece de los dominios $\alpha 2$ y $\alpha 3$, a saber, comprende el dominio $\alpha 1$ directamente unido al dominio transmembranario y el dominio citoplasmático.

La isoforma proteica HLA-G4 carece del dominio $\alpha 3$, a saber, comprende el dominio $\alpha 1$, el dominio $\alpha 2$, el dominio transmembranario y el dominio citoplasmático.

Todas las isoformas solubles de HLA-G carecen de los dominios transmembranario y citoplasmático. Más en concreto:

- La isoforma proteica HLA-G5 contiene los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$, así como una secuencia peptídica adicional en el extremo carboxilo de 21 restos aminoácidos codificados por el intrón 4 (como resultado de la retención del intrón 4 después del ajuste del transcrito y la maduración del ARN).
- La isoforma proteica HLA-G6 corresponde a la HLA-G5 sin $\alpha 2$, a saber, HLA-G6 contiene los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 3$, así como una secuencia peptídica adicional en el extremo carboxilo de 21 restos aminoácidos codificados por el intrón 4 (como resultado de la retención del intrón 4 después del ajuste del transcrito y la maduración del ARN).
- La isoforma proteica HLA-G7 contiene sólo el dominio $\alpha 1$, así como 2 restos aminoácidos adicionales en el extremo carboxilo codificados por el intrón 2 (como resultado de la retención del intrón 2 después del ajuste del transcrito y la maduración del ARN).

Todas estas isoformas se han descrito en [4,5,6] y en la solicitud de patente europea EP 0.677.582.

Los estudios previos han demostrado que las proteínas HLA-G son capaces de inhibir las respuestas alógenas, tales como la respuesta de los linfocitos T proliferativos, la citólisis mediada por los linfocitos T citotóxicos y la citólisis mediada por los linfocitos NK (citolíticos) [7,8 9]. Los estudios más recientes han demostrado también que la HLA-G es capaz de inducir la diferenciación de los linfocitos T reguladores que, a continuación, consiguen inhibir las respuestas alógenas por sí mismos, y se sabe que participan en la tolerancia de los aloinjertos [10,11]. Debido a esta amplia función inhibidora, se ha demostrado que la expresión de HLA-G está correlacionada con una mejor aceptación de los trasplantes alógenos, tanto si la HLA-G se expresa en el injerto o si se detecta en el plasma de los pacientes, como una molécula soluble [12,13,14]. Como resultado, se han propuesto procedimientos basados en las HLA-G para tratar el rechazo de aloinjertos o xenoinjertos en los trasplantes de órganos o tejidos. También se ha propuesto que las proteínas HLA-G se usen para el tratamiento de cánceres (patente europea EP 1.054.688),

enfermedades inflamatorias (patente europea EP 1.189.627) y, más en general, enfermedades relacionadas con la inmunidad. También se ha propuesto que la fusión de las proteínas HLA-G a ligandos específicos dirigirá selectivamente las HLA-G a células o tejidos concretos (solicitud de patente internacional WO 2007/091078). Sin embargo, se debe advertir que no se han proporcionado resultados o datos experimentales que demuestren que tales fusiones de acción selectiva sean activas.

Se ha demostrado que las HLA-G se unen a tres receptores principales: ILT2/LILRB1/CD85j, ILT4/LILRB2/CD85d y KIR2DL4. El ILT2 se expresa principalmente en los linfocitos T, linfocitos B, linfocitos NK, monocitos y células dendríticas. El ILT4 se expresa solo en las células mieloides, esto es, principalmente monocitos y células dendríticas. El KIR2DL4 se expresa principalmente en los linfocitos NK de la decidua y en un pequeño subconjunto de linfocitos NK periféricos. Debido al extenso patrón de expresión de sus receptores inhibidores, la HLA-G puede ejercer su función tolerógena en todos los efectores de las respuestas inmunitarias que son responsables de la inmunidad antiviral, reacciones autoinmunitarias, inmunidad antitumoral, enfermedades inflamatorias y rechazo de trasplantes.

El KIR2DL4 es un receptor específico de la HLA-G. El KIR2DL4 se acopla al dominio $\alpha 1$ de HLA-G y, más en concreto, a los restos Met⁷⁶ y Gln⁷⁹ que son característicos de HLA-G [15]. Además se ha demostrado que estos dos restos son cruciales para la función inhibidora de HLA-G a través de KIR2DL4, y que al mutarlos se impedía que la HLA-G inhibiera *in vitro* la actividad citolítica de los linfocitos NK que expresaban el KIR2DL4. A pesar de su especificidad por HLA-G, es probable que el KIR2DL4 no desempeñe ningún papel significativo en la función inhibidora de HLA-G, excepto en el contexto del embarazo, principalmente debido a que su expresión está limitada a los linfocitos NK de la decidua y porque, *in vitro* e *in vivo*, se ha demostrado que los ILT desempeñan una función clave a través de la interacción con el dominio $\alpha 3$ de HLA-G. Es posible que el dominio $\alpha 1$ de HLA-G desempeñe un papel directo en la función de HLA-G, a través de KIR2DL4 u otro, así como algún receptor desconocido, pero las pruebas disponibles hasta la fecha apuntan a que la función tolerógena de HLA-G está mediada principalmente, o quizá completamente, por la interacción de su dominio $\alpha 3$ con las moléculas de ILT2 e ILT4.

ILT2 e ILT4 no son receptores específicos de HLA-G y se ha demostrado que se pueden unir a otras moléculas de HLA de clase I a través de su dominio $\alpha 3$ [16,17,18]. Se ha descrito con detalle la capacidad del dominio de clase I de HLA para fijarse a las moléculas de ILT. Se ha descrito que ILT2, en particular, se fija a «la mayoría, o quizá a todas» las moléculas de HLA de clase I.

Sin embargo, la HLA-G es el ligando que tiene más afinidad por ILT2 e ILT4, como se ilustra en la tabla 1 de Shiroishi et al [19].

Así pues, ILT2 e ILT4 se fijan a HLA-G con más fuerza que las moléculas del HLA de clase I clásico (véase [20,21]).

Esta mayor capacidad de fijación a ILT que tiene HLA-G en comparación con otras moléculas de HLA de clase I está particularmente bien ilustrada por el hecho de que la HLA-G de la superficie de las células tumorales, pero no las moléculas del HLA de clase I clásico, son capaces de comprometer a los receptores ILT2 y/o ILT4 de los efectores citolíticos con suficiente fuerza para bloquear el funcionamiento de estos efectores y así proteger las células tumorales de la destrucción inmunitaria [22].

ILT2 e ILT4 no se fijan a las mismas estructuras de HLA-G [21]. De hecho, el ILT2 reconoce sólo las estructuras de HLA-G asociadas a la microglobulina $\beta 2$ ($\beta 2m$), mientras que el ILT4 tiene la capacidad de reconocer tanto las cadenas pesadas de HLA-G libres de $\beta 2m$ y las asociadas a $\beta 2m$ [21,23]. Hasta ahora, el ILT4 se fija a las cadenas pesadas de HLA-G libres de $\beta 2m$ claramente mejor que a las asociadas a $\beta 2m$.

El antígeno HLA-G adopta una conformación de dímero *in vivo* como resultado de la formación de un puente disulfuro intermolecular entre el resto de la cisteína 42 de los dominios $\alpha 1$ de dos moléculas de HLA-G [20,23 y 25; solicitud de patente internacional WO2007/011044].

La estructura dimérica de HLA-G se ha descrito en Shiroishi et al [20]. Existen dos moléculas de HLA-G de tipo silvestre en una unidad asimétrica; cada monómero está unido covalentemente al compañero simétrico a través del puente disulfuro Cys42-Cys42 a lo largo del eje cristalográfico binario. La proteína HLA-G1 completa está compuesta de la cadena H, asociada a la microglobulina $\beta 2$ ($\beta 2m$) y a un péptido noamérico similar a la estructura del MHC de clase I clásico. Se ha propuesto que los sitios de fijación al receptor de los dímeros de HLA-G son más accesibles que los de los correspondientes monómeros, de manera que los dímeros tendrían una afinidad más alta y una velocidad de disociación más lenta que los monómeros. Sin embargo, no está claro qué conformación es la más activa para los propósitos farmacéuticos, qué isoforma es la más eficaz, o cómo se podrían producir los dímeros u oligómeros de HLA-G adecuados.

Surge de lo anterior que la mejor función inhibidora de HLA-G se debe:

1. A una única secuencia de su dominio $\alpha 3$, que le confiere una mejor capacidad de fijación a ILT que las otras moléculas de HLA de clase I. Esta secuencia única del dominio $\alpha 3$ de HLA-G, como se deduce de la figura 3 de Shiroishi et al. [21], conduce a la creación de un área de fijación a ILT más fuerte y más hidrófoba.

2. A su capacidad única para dimerizar. La dimerización de HLA-G se produce por la creación de puentes disulfuro entre las cisteínas de la posición 42 (dominio $\alpha 1$) de dos moléculas de HLA-G (véase la figura 8 de Gonen-Gross et al. [24]) y es crucial para la función de HLA-G. De hecho, se ha demostrado que las moléculas mutantes de HLA-G que carecen de la cisteína de la posición 42 y que no forman dímeros también carecen de la función inhibidora [24]. La figura 4 de Shiroishi et al. [20] da a conocer la estructura del dímero de HLA-G unido por disulfuro.

Así pues, para resumir los datos sobre la función inhibidora de HLA-G: transcurre principalmente por la fijación de los dímeros de HLA-G a las moléculas de ILT a través de su dominio $\alpha 3$ único. Sin embargo, la estructura del complejo ILT4/HLA-G [21] revela que ILT4 muestra un reconocimiento notablemente diferente para fijación al complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC1) en comparación con ILT2, y que se fija más al dominio $\alpha 3$ que a $\beta 2m$.

Producir el HLA-G en líneas celulares puede ser tedioso. De hecho, la molécula completa de HLA-G1/G5 es un complejo trimolecular de una cadena pesada completa de HLA-G (dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$) asociado no covalentemente a $\beta 2m$ y a un nonapéptido. Se conoce bien la función de tal construcción, pero debido a la complejidad de su estructura, es difícil producirla, es arriesgada su purificación y es poco estable.

Los inventores acaban de encontrar inesperadamente que los multímeros de los péptidos pequeños que contienen los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 3$, que se pueden obtener sintéticamente, son funcionales, más puros, por lo tanto más estables, más fáciles de producir porque no requieren ni extracción de líquidos biológicos ni controles específicos (porque en la producción no intervienen agentes biológicos), lo que disminuye el riesgo de peligro biológico, siguiendo las prácticas correctas de fabricación: ya que las prácticas correctas de fabricación tienen estándares de seguridad en términos de riesgo biológico que tienen aplicación en esta memoria.

Así pues, la presente invención se refiere a multímeros o polipéptidos multiméricos, caracterizados por que comprenden al menos dos monómeros, en donde cada uno de dichos monómeros se selecciona del grupo que consiste en el péptido P2 (denominado también de aquí en adelante monómero $\alpha 1$ - $\alpha 3$) de fórmula P1-X3 o X2-X3, en donde P1 es de fórmula X1-X2, en donde X1 representa un conector peptídico que comprende al menos de 10 a 30 aminoácidos y hasta 100 aminoácidos, e incluye una cisteína en su extremo amino, y X2 representa un dominio $\alpha 1$ (o péptido $\alpha 1$) de HLA-G, y X3 representa un dominio $\alpha 3$ (o péptido $\alpha 3$) de HLA-G.

Así pues, los multímeros de la invención incluyen:

- Dímeros y multímeros que comprenden monómeros que consisten en un conector peptídico (X1) + $\alpha 1(X2)$ + $\alpha 3(X3)$ y/o monómeros que consisten en $\alpha 1(X2)$ + $\alpha 3(X3)$; y
- Dímeros y multímeros (P2)_n, que comprenden exclusivamente los monómeros de $\alpha 1$ + $\alpha 3$ X2-X3, tal y como se define más arriba (en donde n es un entero ≥ 2); entre dichos multímeros, se incluyen:
- Homomultímeros de los monómeros $\alpha 1$ - $\alpha 3$ (n monómeros P2), en donde todos los monómeros son idénticos; y
- Heteromultímeros de los monómeros $\alpha 1$ - $\alpha 3$ (n monómeros P2), en donde los dominios $\alpha 3$ y/o $\alpha 1$ son diferentes en monómeros diferentes.

Así pues, los multímeros de acuerdo con la invención incluyen dímeros, así como moléculas que comprenden 3, 4, 5, 6, 7 o incluso más monómeros, tal y como se define más arriba en la presente memoria. Los multímeros de acuerdo con la presente invención pueden comprender hasta 100, 500, 1.000 o incluso más de dichos monómeros.

Los monómeros $\alpha 1$ - $\alpha 3$ de la presente invención también se pueden denominar monómeros $\alpha 3$ - $\alpha 1$, incluso aunque el dominio $\alpha 1$ se encuentre siempre en el extremo amino de dichos monómeros.

Los inventores han hallado, inesperadamente, que los multímeros $\alpha 1$ - $\alpha 3$ tienen un actividad significativa sobre todos los tumores líquidos en comparación con los multímeros de $\alpha 3$ - $\alpha 3$ y con las formas solubles de HLA-G (HLA-G5 y HLA-G6).

Los tumores líquidos son tumores en donde las células malignas circulan en un líquido (sangre o sistema linfático) y en donde hay una proliferación anormal de dichas células malignas.

Los tumores líquidos incluyen tumores de origen linfático y mieloides; más precisamente, incluyen tanto tumores sanguíneos (leucemia) como tumores de los órganos que forman sangre [principalmente tumores de la médula ósea (mieloma, macroglobulinemia) y tumores de los ganglios linfáticos (linfoma)].

De hecho, los multímeros $\alpha 1$ - $\alpha 3$ son inesperadamente activos tanto en los tumores de células linfáticas como en los tumores de células mieloides.

Así pues, son específicamente activos contra los tumores líquidos que expresan ILT2 y/o ILT4, tales como, por ejemplo, leucemias de origen linfocítico (p. ej.: leucemia linfocítica de linfocitos B o leucemia linfocítica de linfocitos T)

o leucemias de origen mielocítico (p. ej.: leucemia mielomonocítica crónica y/o aguda). Más específicamente, los inventores han encontrado sorprendentemente que los péptidos $\alpha 1$ - $\alpha 3$, cuando se ensamblan correctamente en multímeros, tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de los tumores líquidos.

5 Los resultados obtenidos demuestran que los multímeros de acuerdo con la presente invención tienen una actividad eficaz contra los tumores linfáticos y contra los tumores mieloides.

Resulta sorprendente que los multímeros de monómeros $\alpha 1$ - $\alpha 3$ tengan una actividad eficaz contra los tumores de células linfáticas (ILT2⁺/ILT4⁺) y de células mieloides (ILT2⁺/ILT4⁺).

De hecho, es contrario a lo que se sabía hasta ahora con respecto a la función de HLA-G en los tumores sólidos para escapar del sistema inmunitario.

10 Así pues, estos multímeros representan fármacos candidatos muy valiosos para tratar tales tumores líquidos.

Los dímeros de control comprenden dos monómeros, en donde cada monómero corresponde a los péptidos que comprenden un conector peptídico L1 o L2 tal y como se define en las figuras 8 y 9, y en los ejemplos, a saber, que incluyen un aminoácido cisteína y un dominio $\alpha 3$ (o péptido $\alpha 3$) de HLA-G [($\alpha 3$ -L1 de SEQ ID n.º 3) × 2 y ($\alpha 3$ -L2 de SEQ ID n.º 5) × 2].

15 De acuerdo con la presente invención:

- El péptido P1 también puede comprender en el extremo carboxilo y/o en el extremo amino de X2 menos de 20, más preferiblemente menos de 15, y lo más preferiblemente menos de 10 o 5, aminoácidos adicionales que flanquean el dominio $\alpha 1$ de una isoforma nativa de HLA-G.
- 20 – El conector peptídico X1 comprende al menos de 10 a 30 aminoácidos hasta 100 aminoácidos (para conseguir más flexibilidad) e incluye una cisteína en su extremo amino, preferiblemente en las posiciones 1, 2, 3 o 4 desde el extremo amino.
- X2, que comprende un dominio o péptido $\alpha 1$, designa un péptido que comprende la secuencia aminoacídica de un dominio $\alpha 1$ de un antígeno HLA-G, o un fragmento funcional del mismo, y está esencialmente desprovisto de otros dominios de HLA-G. Más preferiblemente, el péptido $\alpha 1$ comprende la secuencia aminoacídica de un dominio $\alpha 1$ de un antígeno HLA-G. En un multímero de la invención, se prefiere que todos los péptidos (o dominios) $\alpha 1$ tengan la misma secuencia aminoacídica. Sin embargo, se contempla también que en un multímero de la invención estén presentes péptidos $\alpha 1$ de diferente secuencia.
- 25 – X3, que comprende un dominio o péptido $\alpha 3$, designa un péptido que comprende la secuencia aminoacídica de un dominio $\alpha 3$ de un antígeno HLA-G, o un fragmento funcional del mismo, y está esencialmente desprovisto de otros dominios de HLA-G. Más preferiblemente, el péptido $\alpha 3$ comprende la secuencia aminoacídica de un dominio $\alpha 3$ de un antígeno HLA-G. En un multímero de la invención, se prefiere que todos los $\alpha 3$ tengan la misma secuencia aminoacídica. No obstante, también se contempla que en un multímero de la presente invención estén presentes péptidos $\alpha 3$ de diferente secuencia. Más preferiblemente, el péptido $\alpha 3$ comprende la secuencia aminoacídica del dominio $\alpha 3$ de un antígeno HLA-G.
- 30 – El dominio $\alpha 3$ de HLA-G está codificado por el exón 4 y corresponde a los aminoácidos 207 a 298 de la HLA-G de humano de SEQ ID n.º 6.
- El dominio $\alpha 1$ de HLA-G está codificado por el exón 2 y corresponde a los aminoácidos 25 a 114 de la HLA-G de humano de SEQ ID n.º 6.
- Un «fragmento funcional» designa un fragmento que conserva la capacidad de inducir la inhibición del crecimiento tumoral *in vivo* o *in vitro*. Más preferiblemente, un fragmento funcional de los péptidos $\alpha 3$ o $\alpha 1$ comprende al menos 20, más preferiblemente al menos 30, 40 o 50, aminoácidos consecutivos del dominio $\alpha 3$ o $\alpha 1$.
- 40

En una realización típica, el fragmento funcional contiene al menos 60 aminoácidos consecutivos del dominio $\alpha 1$ o del dominio $\alpha 3$. La funcionalidad del fragmento se puede verificar tal y como se describe en el apartado experimental.

45 En particular, la funcionalidad se puede verificar mediante la preparación de un multímero de los fragmentos, la administración del multímero a un modelo animal, y la verificación de la tasa de inhibición tumoral. La funcionalidad también se puede verificar mediante la preparación de un multímero de los fragmentos, la adición de los multímeros al medio de cultivo de las células tumorales, y la verificación de la tasa de inhibición tumoral. Cuando el multímero inhibe el crecimiento tumoral al menos un 50%, en comparación con el placebo, el fragmento se puede considerar que es funcional.

- La secuencia aminoacídica de los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 3$ se pueden obtener directamente de las publicaciones de Geraghty et al. [1] o Ellis et al. [2]. Estas secuencias también están disponibles en línea (véase, por ejemplo, los números de GenBank para HLA-G: primera clonación de la secuencia genómica: Geraghty et

al., *PNAS* 1987: PubMed ID: 3480534, GeneID: 3135; primera clonación del ADNc de HLA-G1: Ellis et al., *Journal of Immunology* 1990. PubMed ID: 2295808).

Además, las secuencias de HLA-G5, HLA-G6 y HLA-G7 están también disponibles en las patentes de los Estados Unidos US 5.856.442, US 6.291.659, la patente francesa FR 2.810.047, o Paul et al., *Hum. Immunol.* 2000; 61: 1138, de donde se puede obtener directamente la secuencia de los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 3$.

- Se debe saber que existen variantes naturales de los antígenos HLA-G, p. ej., como resultado de polimorfismos, que están incluidos en la presente solicitud. De igual forma, las variantes de las secuencias anteriores que contienen determinadas (p. ej., entre 1 y 10, preferiblemente de 1 a 5, lo más preferiblemente 1, 2, 3, 4 o 5) sustituciones o inserciones aminoacídicas también están incluidas en la presente invención.
- La terminología «multímero» (o polipéptido multimérico) designa una molécula (o una composición o producto) que comprende al menos dos monómeros, tal y como se define más arriba, a saber, los monómeros $\alpha 1$ - $\alpha 3$ (o $\alpha 3$ - $\alpha 1$) asociados entre sí por un puente disulfuro o un vehículo.

En una realización específica, el péptido $\alpha 3$ consiste esencialmente en los aminoácidos 183 a 274 de un antígeno maduro de HLA-G o un fragmento funcional del mismo.

En una realización específica, el péptido $\alpha 1$ consiste esencialmente en los aminoácidos 1 a 90 de un antígeno maduro de HLA-G, o un fragmento funcional del mismo.

La secuencia de un péptido $\alpha 3$ preferido se da a conocer en la SEQ ID n.º 1.

La secuencia de un péptido $\alpha 1$ preferido se da a conocer en la SEQ ID n.º 2.

La secuencia de un monómero $\alpha 3$ se da a conocer en la SEQ ID n.º 3. El conector corresponde a las posiciones 1 a 12 y contiene una cisteína en la posición 2; las posiciones 13 y 14 corresponden a dos aminoácidos del dominio $\alpha 2$ (véase la SEQ ID n.º 6 que corresponde a HLA-G y en la que $\alpha 2$ corresponde a las posiciones 115 a 206). Las posiciones 15 a 106 corresponden al dominio $\alpha 3$ y las posiciones 107 a 108 corresponden a dos aminoácidos del dominio transmembranario; puede estar insertada toda la cola hidrófila de HLA-G. Los principales restos de contacto con las moléculas de ILT están en las posiciones 27 y 29.

Otra secuencia de un monómero $\alpha 3$ se da a conocer en la SEQ ID n.º 5. El conector corresponde a las posiciones 1 a 18 y contiene una cisteína en la posición 1; las posiciones 19 y 20 corresponden a dos aminoácidos del dominio $\alpha 2$ (véase la SEQ ID n.º 6 que corresponde a HLA-G y en la que $\alpha 2$ corresponde a las posiciones 115 a 206). Las posiciones 21 a 111 corresponden al dominio $\alpha 3$ y las posiciones 112 a 113 corresponden a dos aminoácidos del dominio transmembranario.

La secuencia de un monómero $\alpha 1$ - $\alpha 3$ preferido se da a conocer en la SEQ ID n.º 4. Las posiciones 1 a 90 de la SEQ ID n.º 4 corresponden al dominio $\alpha 1$; las posiciones 91 a 182 de la SEQ ID n.º 4 corresponden al dominio $\alpha 3$ y las posiciones 183 y 184 corresponden a dos aminoácidos del dominio transmembranario; pueden estar insertada toda la cola hidrófila de HLA-G. La Cys42 se utiliza para la dimerización. Los principales restos de contacto con las moléculas de ILT se encuentran en las posiciones 103 y 105.

Dentro de los multímeros de la presente invención, los diferentes monómeros pueden estar conectados entre sí de diferente manera, tal como, sin limitación, mediante puente disulfuro (en especial para un dímero) o mediante un grupo espaciador y/o un vehículo.

En una realización preferida de la presente invención, los monómeros $\alpha 3$ - $\alpha 1$ que se definen más arriba en la presente memoria están unidos covalentemente o mediante una interacción de afinidad.

Un ejemplo concreto de un multímero de la invención es un dímero.

En este sentido, la invención se refiere a un dímero de $\alpha 1$ - $\alpha 3$, que tiene dos monómeros de SEQ ID n.º 4, en donde los dos péptidos $\alpha 1$ están unidos por un puente disulfuro. Más en concreto, los dos péptidos $\alpha 1$ están unidos por un puente disulfuro entre los restos cisteína de la posición del aminoácido 42 de los antígenos HLA-G de humano.

En otra realización concreta, los monómeros $\alpha 3$ - $\alpha 1$ están unidos por un espaciador o un vehículo. En una realización concreta, los monómeros están unidos a un vehículo, mediante lo cual se produce un multímero. El vehículo puede ser de diferente naturaleza. Es preferiblemente biocompatible y, lo más preferiblemente, inerte desde el punto de vista biológico. El vehículo puede ser una molécula, tal como una proteína, p. ej., albúmina (p. ej., seroalbúmina de humano) o un vehículo sólido inerte. Los monómeros pueden estar unidos al vehículo a través de diferentes tipos de reacciones de acoplamiento, tal como la interacción de afinidad o el uso de grupos funcionales. La interacción de afinidad se puede obtener al revestir el vehículo con ligandos que se fijan a péptidos $\alpha 3$ o $\alpha 1$ (p. ej., anticuerpos o fragmentos de los mismos). La interacción de afinidad también se puede obtener mediante la adición de un miembro de una pareja de fijación (p. ej., avidina y biotina) a los monómeros $\alpha 3$ - $\alpha 1$ y al vehículo, respectivamente. El

acoplamiento también se puede obtener mediante grupos bifuncionales, tal como maleimida, etc. Además, se debe observar que los multímeros pueden contener monómeros unidos a un vehículo y además comprometidos en el puente disulfuro intermolecular.

5 En una realización concreta, un multímero de la presente invención es una molécula que comprende dos o más monómeros $\alpha 3$ - $\alpha 1$ unidos a un vehículo.

Los multímeros de esta invención se pueden producir mediante diferentes técnicas. Tal y como se explicó anteriormente, los monómeros se pueden acoplar entre sí mediante diferentes técnicas de acoplamiento, tal como la unión covalente (p. ej., puente disulfuro, grupo bifuncional, etc.) o la reacción de afinidad.

Para la producción de un multímero mediante puentes disulfuro:

10 Los monómeros $\alpha 3$ de SEQ ID n.º 3 o de SEQ ID n.º 5 se sintetizaron químicamente. Los monómeros se sintetizaron primero. A continuación se realizó la dimerización mediante la generación de un puente disulfuro entre las cisteínas del conector X1 de dos monómeros (cisteína 2 de la SEQ ID n.º 3 o cisteína 1 de la SEQ ID n.º 5). La pureza de los productos sintetizados se verificó por espectrometría de masas.

15 • Monómeros $\alpha 3$ - $\alpha 1$: en una primera etapa, los péptidos $\alpha 1$ - $\alpha 3$ se sintetizan químicamente; en una segunda etapa, los monómeros $\alpha 1$ - $\alpha 3$ se replegaron para permitir la generación de puentes disulfuro entre las dos cisteínas dentro del dominio $\alpha 3$ (cisteínas 111 y 167 de la SEQ ID n.º 4). En una tercera etapa, los dímeros se obtienen mediante la generación de un puente disulfuro entre las cisteínas libres del dominio $\alpha 1$ de dos monómeros (cisteína 42 de la SEQ ID n.º 4). En una cuarta etapa, y preferiblemente, los dímeros o multímeros se separan. Los multímeros se pueden separar de los monómeros, p. ej., en función de su masa molecular, p. ej., mediante electroforesis en gel (tal como PAGE). La formación adecuada de los multímeros también se puede verificar con tal procedimiento en muestras alícuotas, para medir la cantidad relativa de multímero presente en la solución y, si fuera necesario, ajustar las condiciones de la reacción. Las condiciones que permiten la formación del enlace disulfuro incluyen, por ejemplo, una temperatura de 10 a 30 °C durante 2 a 24 horas. La etapa 2 se puede realizar, como alternativa, antes de la etapa 1.

25 • Los monómeros $\alpha 3$, en donde el péptido $\alpha 3$ comprende un conector que comprende un grupo SH lateral, se preparan en las mismas condiciones que se especifican más arriba para los multímeros de $\alpha 3$ - $\alpha 1$ (etapas 2 y 3).

30 Para la producción de un multímero mediante el uso de un vehículo, los monómeros se incuban típicamente en presencia del vehículo en las condiciones que permiten la adhesión de los monómeros al vehículo y, preferiblemente, se separa el multímero. El vehículo puede ser, p. ej., un vehículo sólido. El vehículo también puede ser una proteína, tal como la seroalbúmina. Para facilitar la interacción entre los monómeros y el vehículo, el vehículo se puede funcionalizar para que contenga los grupos reactivos capaces de interaccionar con los monómeros. A modo de ejemplo, el vehículo puede estar revestido con un ligando de los péptidos $\alpha 1$ o $\alpha 3$, tal como anticuerpos o fragmentos de los mismos (p. ej., fragmentos Fab, fragmentos CDR, ScFv, etc.) o un reactante de acoplamiento químico (p. ej., maleimida). Otra alternativa es que el vehículo se puede funcionalizar mediante un reactante capaz de fijarse a un ligando de los polipéptidos $\alpha 1$. A modo de ejemplo, el vehículo puede estar revestido con un anticuerpo contra el fragmento Fc de IgG de humano y el ligando puede ser una IgG policlonal humana dirigida contra un antígeno HLA-G1. En tal caso, los monómeros, el vehículo y el ligando se pueden incubar juntos para permitir la asociación adecuada de los monómeros a las perlas.

40 Los multímeros de $\alpha 1$ - $\alpha 3$ de la invención se pueden producir mediante técnicas conocidas de por sí en la técnica, tales como técnicas recombinantes, técnicas enzimáticas o síntesis artificial, preferiblemente mediante síntesis artificial, tal como la síntesis de Merrifield.

Los multímeros de $\alpha 3$ también se pueden producir mediante las técnicas conocidas de por sí.

45 En una realización preferida, los péptidos $\alpha 3$ y $\alpha 1$ - $\alpha 3$ se producen por síntesis artificial con el uso de la química y los sintetizadores conocidos.

Los multímeros de $\alpha 1$ - $\alpha 3$ pueden comprender aminoácidos naturales o bien restos de aminoácidos no naturales o modificados. Pueden estar en conformación L y/o D. Los péptidos pueden comprender tanto enlaces amina como enlaces peptidomiméticos modificados. De igual forma, los péptidos pueden tener los extremos protegidos y/o modificados, p. ej., a través de la alteración química o física de las funciones laterales, llegado el caso.

50 En otra realización, el vehículo y los monómeros pueden estar modificados para que contengan grupos de reacción cruzada (p. ej., avidina y biotina). En tal caso, la incubación del vehículo y los monómeros ocasionará la multimerización sobre el vehículo.

55 El multímero formado (a saber, el complejo entre el vehículo y el monómero $\alpha 3$ - $\alpha 1$) se puede aislar con diferentes tecnologías conocidas de por sí en la técnica, entre ellas centrifugación, sedimentación, separación electromagnética, etc.

Los ejemplos específicos de multímeros de la invención son:

- multímeros de los monómeros $\alpha 3$ - $\alpha 1$ de SEQ ID n.º 4 unidos por puente disulfuro; y
- multímeros de los monómeros $\alpha 3$ - $\alpha 1$ de SEQ ID n.º 4 unidos a un vehículo.

5 Tal y como se menciona en los ejemplos, estos multímeros son capaces de promover la inhibición de tumores líquidos (tumores de origen linfocítico y tumores de origen mielóide).

Además, los dímeros del monómero $\alpha 3$ - $\alpha 1$ de SEQ ID n.º 4 también representan objetos específicos de la invención. La invención de hecho demuestra que dichos dímeros tienen una actividad sustancial *in vivo* para tratar los tumores líquidos, y que se pueden usar para preparar multímeros muy activos.

10 La invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un multímero tal y como se define más arriba, o se puede obtener mediante un procedimiento que se describe más arriba y, preferiblemente, al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Un objeto más de esta invención es una composición farmacéutica que comprende un dímero de $\alpha 3$ - $\alpha 1$ que tiene dos monómeros de SEQ ID n.º 4 y, preferiblemente, al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

15 Los vehículos o excipientes idóneos incluyen cualquier vehículo farmacéuticamente aceptable, tales como tamponantes, estabilizantes, diluyentes, sales, conservantes, emulsionantes, edulcorantes, etc. El vehículo típicamente comprende una solución acuosa o no acuosa isotónica, que se puede preparar de acuerdo con las técnicas conocidas. Las soluciones adecuadas incluyen solutos tamponados, tal como una solución tamponada con fosfato, soluciones con cloruro, solución de Ringer y similares. La preparación farmacéutica es típicamente en forma de una composición inyectable, preferiblemente una composición inyectable líquida, aunque también se pueden contemplar otras formas, tales como comprimidos, cápsulas, jarabes, etc. Las composiciones de acuerdo con la invención se pueden administrar por una serie de vías diferentes, tal como por vía sistémica, parenteral, oral, rectal, nasal o vaginal. Se administran preferiblemente mediante inyección, tal como inyección intravenosa, intraarterial, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea. También se contempla la administración transdérmica. La dosis específica la puede ajustar el experto en la técnica, según el tipo de enfermedad, el sujeto, la duración del tratamiento, la presencia de otros ingredientes activos, etc. Típicamente, las composiciones comprenden dosis unitarias de entre 10 ng y 100 mg del multímero, más preferiblemente entre 1 μ g y 50 mg, incluso más preferiblemente entre 100 μ g y 50 mg. Las composiciones de la presente invención se administran preferiblemente en cantidades eficaces, a saber, en cantidades que son, con el tiempo, suficientes para al menos reducir o impedir la progresión de la enfermedad. En este sentido, las composiciones de esta invención se utilizan preferiblemente en cantidades que permiten la reducción de una respuesta inmunitaria perjudicial o indeseada en un sujeto.

20 Dichos polipéptidos multiméricos se pueden utilizar como agentes tolerógenos capaces de imitar la función completa de HLA-G. Los usos terapéuticos principales de estos compuestos estaría en los trasplantes, para inducir y mantener la tolerancia a los aloinjertos, pero también puede estar en las enfermedades autoinmunitarias o enfermedades inflamatorias, para detener las respuestas autoinmunitarias y la inflamación, y posiblemente restablecer la autotolerancia. Las ventajas de tales polipéptidos son los protocolos de producción o purificación, comparativamente más fáciles, más baratos, más controlados y más seguros que los procedimientos de producción clásicos que implican los organismos procariontes o eucariotes.

Tal y como se mencionó más arriba, los multímeros de la presente invención tienen actividad antitumoral fuerte contra los tumores líquidos y, por lo tanto, se pueden utilizar para tratar los tumores líquidos.

40 La presente invención también se refiere a un multímero o a una composición farmacéutica tal y como se describe más arriba en la presente memoria para tratar los tumores líquidos (leucemia y tumores mieloides).

45 Hay que saber que la cantidad de la composición realmente administrada debe ser determinada y adaptada por un médico, a la luz de las circunstancias relevantes, entre ellas la afección o afecciones a tratar, la composición exacta administrada, la edad, peso y respuesta de cada paciente, la gravedad de los síntomas del paciente y la vía de administración elegida. Por lo tanto, los intervalos de dosis mostrados más arriba están diseñados para proporcionar guía y apoyo generales para las enseñanzas de la presente memoria, pero no pretender limitar el alcance de la invención.

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

- Figura 1: Modelo tridimensional del polipéptido ($\alpha 3$) \times 2. A: Modelo del polipéptido dimerizado. Cada monómero se encuentra en un gris diferente. La cisteína libre introducida de forma artificial se muestra mediante esferas, lo que permite la dimerización. B: Superposición de la estructura del péptido $\alpha 3$ con la de la molécula completa de HLA-G. La molécula completa de HLA-G (que incluye la microglobulina $\beta 2$ y el péptido) se muestra en hebras claras. El péptido $\alpha 3$ se muestra en una representación tridimensional de

cintas. La estructura del dominio $\alpha 3$ de HLA-G y del péptido $\alpha 3$ están superpuestas.

- Figura 2: Modelo tridimensional de la fijación del polipéptido $(\alpha 3) \times 2$ a las moléculas de ILT4. Sólo se muestra una mitad del dímero $(\alpha 3) \times 2$.
- 5 – Figura 3: Fijación de diferentes dímeros a los receptores de HLA-G ILT2, ILT4, KIR2DL4: $(\alpha 3-L1) \times 2$: péptido de control; $(\alpha 3-L2) \times 2$: péptido de control; $(\alpha 3-\alpha 1) \times 2$: dímero P2-P2 de acuerdo con la invención.
- Figura 4: Efecto de diferentes dímeros sobre la multiplicación celular de la línea tumoral RAJI (linfoma de Burkitt) (número de acceso de la ATCC CCL-86).
- Figura 5: Efecto de diferentes dímeros sobre la multiplicación celular de la línea tumoral DAUDI (linfoma de Burkitt) (número de acceso de la ATCC CCL-213).
- 10 – Figura 6: Efecto de diferentes dímeros sobre la multiplicación celular de la línea tumoral U937 (linfoma histiocítico-monocito) (número de acceso CLR-1593.2).
- Figura 7: Resumen de los efectos de los diferentes dímeros sobre la multiplicación celular de diferentes líneas celulares malignas (Daudi, número de acceso CCL-213; U937, número de acceso CRL-1593.2; KG1, número de acceso CCL-246; NKL transfectada con ILT4 (NKL-ILT4, Robertson M. J. et al., *Exp. Hematol.* 1996, 24: 406-415; Raji, número de acceso CCL-86).
- 15 – Figura 8: Estructura general de los dímeros de control $(\alpha 3-L1) \times 2$ y $(\alpha 3-L2) \times 2$.
- Figura 9: Esquema estructural de los monómeros de control $\alpha 3-L1$ y $\alpha 3-L2$.
- Figura 10: Estructura general de los dímeros $(\alpha 3-\alpha 1) \times 2$.

Ejemplos

20 Ejemplo 1: Preparación de los péptidos de SEQ ID n.º 1 a 5

Los péptidos de las SEQ ID n.º 1 a 5 se sintetizaron con un sintetizador de péptidos.

Se han producido diferentes dímeros:

- $(\alpha 3-L1) \times 2$ (SEQ ID n.º 3), en donde L1 corresponde a un conector peptídico flexible de acuerdo con la invención, a saber, que comprende principalmente restos aminoácídicos de glicina y serina;
- 25 – $(\alpha 3-L2) \times 2$ (SEQ ID n.º 5), en donde L2 corresponde a los aminoácidos 1 a 18 de dicha SEQ ID n.º 5 y procede de los restos aminoácídicos de $\alpha 1$ 42 a 30 (desde los extremos amino y carboxilo) de HLA-G (véase la SEQ ID n.º 6);
- $(\alpha 3-\alpha 1) \times 2$ que corresponde a la SEQ ID n.º 4.

Las figuras 8, 9 y 10 ilustran las estructuras generales de los péptidos sintetizados.

30 Ejemplo 2: Dímeros de $\alpha 3$ y de $\alpha 3-\alpha 1$ mediante puente disulfuro

1) Dímeros de $\alpha 3$

Se sintetizaron químicamente los monómeros $\alpha 3$ de SEQ ID n.º 3 o SEQ ID n.º 5. Primero se sintetizaron los monómeros, luego se replegaron para permitir la generación de puentes disulfuro entre las dos cisteínas del dominio $\alpha 3$ (cisteínas 35 y 91 de la SEQ ID n.º 3, cisteínas 41 y 97 de la SEQ ID n.º 5). A continuación se realizó la dimerización mediante la generación de un puente disulfuro entre las cisteínas del conector X1 de dos monómeros (cisteína 2 de la SEQ ID n.º 3, cisteína 1 de la SEQ ID n.º 5). La pureza de los productos sintetizados se verificó mediante espectrometría de masas.

La visualización de los multímeros de $\alpha 3$ se consiguió por separación mediante electroforesis: las muestras se desnaturalizaron con calor en presencia de tampón de Laemmli en condiciones no reductoras (sin β -mercaptoetanol) y luego se separaron mediante migración electroforética en SDS-PAGE al 12%. A continuación, la presencia de los dímeros se visualizó después de la tinción con azul de coomassie.

En la figura 1 se muestra un modelo tridimensional del dímero de SEQ ID n.º 3. Basándose en la modelización computacional, esta estructura es capaz de fijarse al receptor de HLA-G ILT4 (mostrado en la figura 2; véase también la figura 3).

45 2) Dímeros de $\alpha 3-\alpha 1$

Se sintetizaron químicamente los monómeros $\alpha 3-\alpha 1$ de SEQ ID n.º 4. Primero se sintetizaron los monómeros, luego

se replegaron para permitir la generación de puentes disulfuro entre las dos cisteínas del dominio $\alpha 3$ (cisteínas 111 y 167 de la SEQ ID n.º 4). A continuación se realizó la dimerización mediante la generación de un puente disulfuro entre dos cisteínas del dominio $\alpha 1$ de dos monómeros (cisteína 42 de la SEQ ID n.º 4). La pureza de los productos sintetizados se verificó por espectrometría de masas.

- 5 La visualización de los multímeros de $\alpha 3$ se consiguió por separación mediante electroforesis: las muestras se desnaturalizaron con calor en presencia de tampón de Laemmli en condiciones no reductoras (sin β -mercaptoetanol) y luego se separaron mediante migración electroforética en SDS-PAGE al 12%. A continuación, la presencia de los dímeros se visualizó después de la tinción con azul de coomassie.

La secuencia del polipéptido $\alpha 1 + \alpha 3$ se muestra en la SEQ ID n.º 4.

10 Ejemplo 3: Ensayos de fijación al receptor

Para analizar la fijación a los receptores de HLA-G ILT2, ILT4 y KIR2DL4, se utilizaron 12 μg de dímeros obtenidos de acuerdo con el ejemplo 2 para revestir covalentemente perlas de poliestireno Bio-Plex-COOH (Bio-Rad) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. A continuación se resuspendieron las perlas a una concentración de 2.000 perlas por 50 μl en tampón de ensayo Luminex a 1 \times (Interchim). Los receptores recombinantes fusionados a la parte Fc de una IgG humana (ILT2-Fc, ILT4-Fc, R&D Biosystems) se añadieron a continuación a 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Después, las perlas y los receptores se incubaron durante 90 minutos en la oscuridad en un agitador antes de lavar 2 veces con 200 μl de PBS a 1 \times y Tween al 0,05%. A continuación, las perlas se resuspendieron en 50 μl de tampón de ensayo Luminex en PBS que contiene 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de anticuerpo de cabra anti-IgG de humano conjugado a ficoeritrina (Sigma) durante 30 minutos en la oscuridad en un agitador rotatorio. Las perlas se lavaron luego dos veces con 200 μl de PBS a 1 \times y Tween al 0,05%, y se resuspendieron en 300 μl de PBS a 1 \times .

La fluorescencia, indicadora del reconocimiento del péptido por los receptores, se evaluó mediante citometría de flujo, la cual se realizó en un citómetro Epics XL (Beckman Coulter) con el programa informático EXPO32 (Beckman Coulter).

25 La figura 3 ilustra los resultados y muestra claramente que todos los péptidos que contienen el dominio $\alpha 3$ se fijan de hecho con especificidad al receptor ILT4.

Ejemplo 4: Efecto *in vitro* de los dímeros de $\alpha 3$ - $\alpha 1$ sobre la proliferación celular

El efecto de los dímeros del ejemplo 1 sobre la multiplicación de las líneas celulares tumorales se evaluó con las líneas celulares Raji (linfocitos B, linfoma de Burkitt; figura 4, número de acceso de la ATCC CCL-86), Daudi (linfocitos B, linfoma de Burkitt; figura 5, número de acceso de la ATCC CCL-213), U937 (monocitos, linfoma histiocítico; figura 6, número de acceso CRL-1593.2), KG-1 (leucemia mielomonocítica; figura 7, número de acceso CCL-246) y línea NKL transfectada con ILT4 (NKL-ILT4, leucemia, linfocitos NK; figura 7, Robertson M. J. et al., *Exp. Hematol.* 1996, 24: 406-415). Brevemente: se colocaron 10.000 células en los pocillos de una placa de 96 pocillos en un volumen final de 200 μl de medio de cultivo. Se les añadieron los péptidos para obtener una concentración final de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Todos los pocillos se hicieron por duplicado. Las células se incubaron durante 12 horas antes de añadirles la timidina tritiada y después se incubaron otra vez durante 24 horas a 37 °C y CO₂ al 5% en un incubador humidificado. Al final del cultivo, la incorporación de la timidina ³H en el ADN se cuantificó 18 horas después en un contador β (Wallac 1450, Amersham Biosciences).

40 Los resultados presentados en la figura 4 para la línea tumoral Raji, en la figura 5 para la línea tumoral DAUDI, y en la figura 6 para la línea tumoral U937, demuestran que los dímeros de $\alpha 3$ - $\alpha 1$ (SEQ ID n.º 4) inhiben la multiplicación de las células tumorales en un 83,7 %, 81,2 % y 92,6 %, respectivamente. En cambio, los dímeros de $\alpha 3$ _L2 (SEQ ID n.º 5) no inhibieron significativamente la proliferación de las líneas celulares tumorales, y los dímeros de $\alpha 3$ _L1 (SEQ ID n.º 3) inhibieron la proliferación de tan solo una de las tres líneas celulares. La figura 7 muestra específicamente el efecto inhibitorio de los dímeros de $\alpha 1$ - $\alpha 3$ sobre la proliferación de 5 líneas celulares tumorales de origen linfático y mieloide.

45 Así pues, las figuras 4 a 7 demuestran que los dímeros de $\alpha 3$ - $\alpha 1$ de acuerdo con la invención son significativamente activos contra los tumores de linfocitos B y contra las células mononucleares. Esto fue completamente inesperado si se tiene en cuenta que los linfocitos B son ILT2⁺/ILT4⁺ y que las células mononucleares son ILT2⁺/ILT4⁺.

Ejemplo 5: Producción de multímeros de $\alpha 3$ y de $\alpha 3$ - $\alpha 1$ con un vehículo

50 Se utilizaron perlas de látex modificadas con sulfato (de 5 μm al 4 % p/v, Invitrogen) como vehículo. Se revistieron con monómeros $\alpha 1$ bien directa o indirectamente, a saber, con el anticuerpo 4H84 anti-HLA-G capaz de reconocer todas las isoformas de HLA-G por su dominio $\alpha 1$ (0,5 mg/ml, BD Pharmingen).

55 Para el revestimiento indirecto, se incubaron 10⁸ perlas de látex modificadas con sulfato con el anticuerpo purificado contra la HLA-G de humano a 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante 2 h a 37 °C, seguido de una incubación de 2 h con SAB (2 mg/ml). Después del lavado, las perlas se incubaron con 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ del péptido $\alpha 1$ de HLA-G (90-mero, producido como en el ejemplo 1) a 4 °C durante 16 horas.

ES 2 546 509 T3

Para generar las perlas revestidas directamente con el péptido HLA-G, 10^8 perlas de látex modificadas con sulfato se revistieron con $1 \mu\text{g/ml}$ del péptido $\alpha 1$ de HLA-G a 4°C durante 16 horas, seguido de una incubación de 2 h con SAB (2 mg/ml).

5 Todas las perlas se lavaron posteriormente 2 veces con PBS a $1\times$. Se utilizaron 5 ml del péptido $\alpha 1$ de HLA-G ($1 \mu\text{g/ml}$) para 5×10^6 perlas de látex modificadas con sulfato.

Tales multímeros de la invención se utilizaron para inducir o incrementar *in vivo* la tolerancia del injerto.

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.
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.
5. Kirszenbaum M, Moreau P, Teyssier M, Lafon C, Gluckman E, et al. (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, et al. (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.
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.
9. Rouas-Freiss N, Khalil-Daher I, Riteau B, Menier C, Paul P, et al. (1999) The immunotolerance role of HLA-G. *Semin Cancer Biol* 9: 3-12.

10. LeMaoult 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.

11. Naji A, Le Rond S, Durrbach A, Krawice-Radanne I, Creput C, et al. (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, et al. (2000) Implication of HLA-G molecule in heart-graft acceptance. *Lancet* 355: 2138.

13. Creput C, Durrbach A, Menier C, Guettier C, Samuel D, et al. (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, et al. (2006) Soluble HLA-G Expression and Renal Graft Acceptance. *Am J Transplant* 6: 2152-2156.

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, et al. (1997) A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells. *J Exp Med* 186: 1809-1818.

17. Colonna M, Samaridis J, Cella M, Angman L, Allen RL, et al. (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, et al. (1999) Tetrameric complexes of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G bind to peripheral blood myelomonocytic cells. *J Exp Med* 189: 1149-1156.

19. Shiroishi M, Tsumoto K, Amano K, Shirakihara Y, Colonna M, et al. (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, et al. (2006) Efficient Leukocyte Ig-like Receptor Signaling and Crystal Structure of Disulfide-linked HLA-G Dimer. *J Biol Chem* 281: 10439-10447.

21. Shiroishi M, Kuroki K, Rasubala L, Tsumoto K, Kumagai I, et al. (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, et al. (2007) Trogocytosis-based generation of suppressive NK cells. *EMBO J* 26: 1423-1433.

23. Gonen-Gross T, Achdout H, Arnon TI, Gazit R, Stern N, et al. (2005) The CD85J/Leukocyte Inhibitory Receptor-1 Distinguishes between Conformed and β 2-Microglobulin-Free HLA-G Molecules. *J Immunol* 175: 4866-4874.

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

25. Boyson JE, Erskine R, Whitman MC, Chiu M, Lau JM, et al. (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, et al. (2001) Characterization of HLA-G1, -G2, -G3, and -G4 isoforms transfected in a human melanoma cell line. *Transplant Proc* 33: 2360-2364.

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

LISTA DE SECUENCIAS

<110> COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE LE MAOULT, Joël CAROSELLA, Edgardo Delfino

5 <120> Polipéptidos multiméricos de HLA-G que incluyen monómeros α 1- α 3 y usos farmacéuticos de los mismos

<130> BLOcp263/347

<160> 6

10

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 92

15

<212> PRT

<213> humano

<220>

<223> HLA-G alpha3 peptide

20

<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

<210> 2

25

<211> 90

<212> PRT

<213> humano

<220>

<223> HLA-G alpha1 peptide

30

<400> 2

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

ES 2 546 509 T3

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

<210> 3
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> alpha3-L1 peptide

10

<400> 3
 Gly Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Ala Asp Pro
 1 5 10 15

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> humano

15

<220>
 <223> HLA-G alpha1-alpha3 peptide

20

<400> 4

ES 2 546 509 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> alpha3-L2 peptide

10 <400> 5

ES 2 546 509 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> humano

<220>
<223> HLA-G

10

<400> 6
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 2 546 509 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 por comprender al menos dos monómeros, cada uno de dichos monómeros se selecciona del grupo que consiste en un péptido P2 de fórmula P1-X3 o X2-X3, en donde P1 es de fórmula X1-X2, en donde
- 5 – X1 representa un conector peptídico que comprende al menos 10-30 aminoácidos y hasta 100 aminoácidos e incluye una cisteína en su extremo amino, y
- X2 representa un dominio $\alpha 1$ (o péptido $\alpha 1$) de HLA-G y
- X3 representa un dominio $\alpha 3$ de HLA-G.
2. Multímeros de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizados por que el péptido P1 comprende en el extremo carboxilo y/o en el extremo amino de X2 menos de 20, más preferiblemente menos de 15, y lo más preferiblemente menos de 10 o 5, aminoácidos adicionales que flanquean el dominio $\alpha 1$ de una isoforma nativa de HLA-G.
- 10
3. Multímeros de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, caracterizados por que dicha cisteína en el extremo amino está en las posiciones 1, 2, 3 o 4 desde el extremo amino.
4. Multímeros de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizados por que el monómero $\alpha 1$ - $\alpha 3$ se da a conocer en la SEQ ID n.º 4.
- 15
5. Multímeros de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizados por que están en la forma de un dímero $\alpha 1$ - $\alpha 3$, con dos monómeros de SEQ ID n.º 4, asociados entre sí mediante el puente disulfuro entre los restos cisteína 42 del dominio $\alpha 1$.
6. Multímeros de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizados por que los monómeros $\alpha 1$ - $\alpha 3$ están unidos a través de un espaciador o de un vehículo.
- 20
7. Composición farmacéutica que comprende un multímero de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
8. Multímeros de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7, para tratar tumores líquidos, preferiblemente leucemia y tumores mieloides.

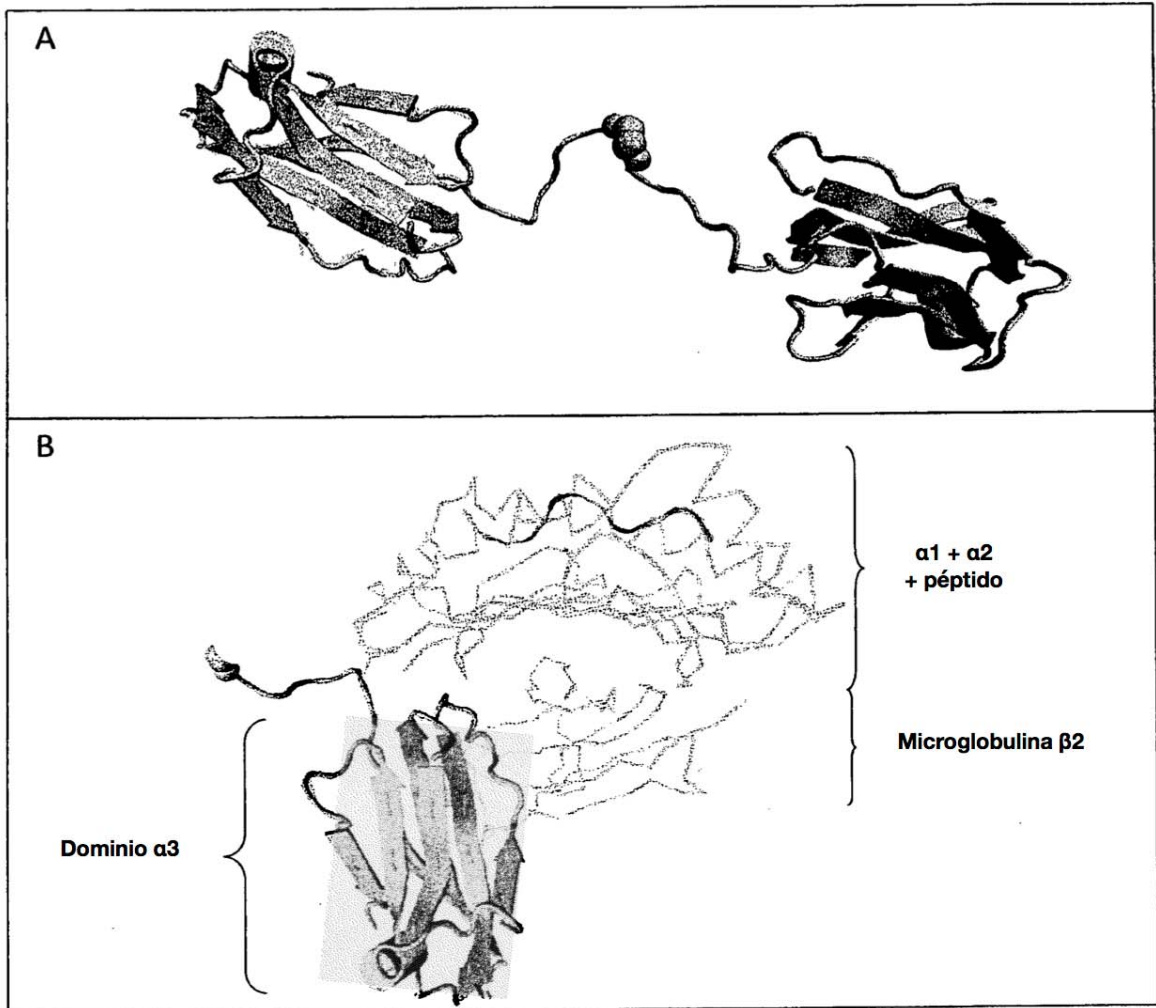


FIGURA 1

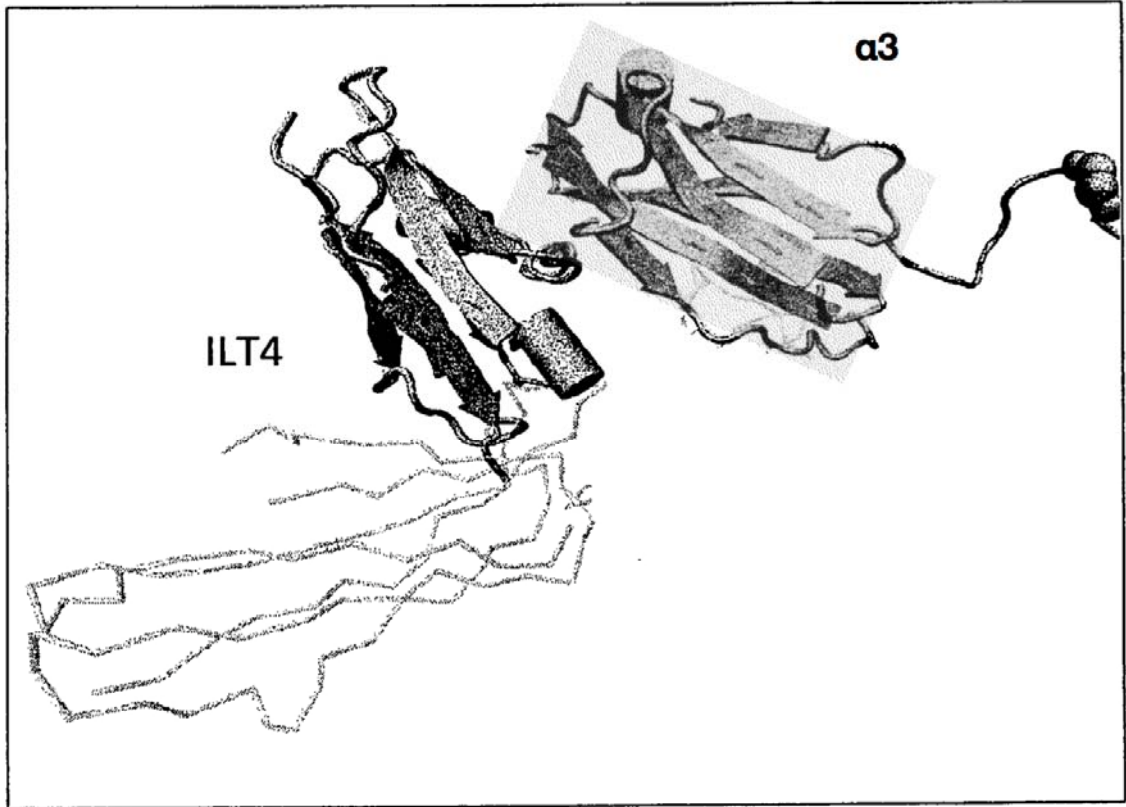


FIGURA 2

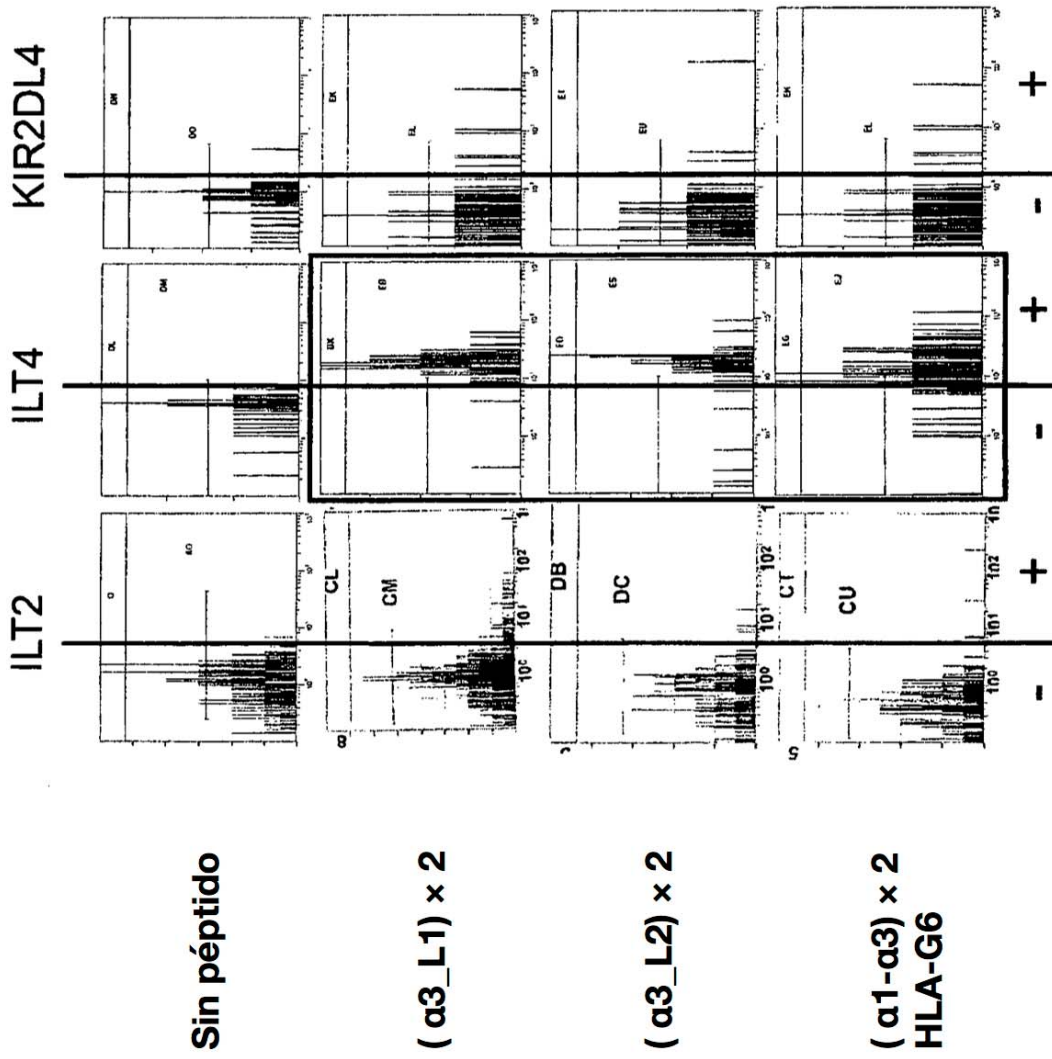


FIGURA 3

Efecto de los péptidos de HLA-G sobre la multiplicación celular de la línea tumoral RAJI (linfoma de Burkitt)

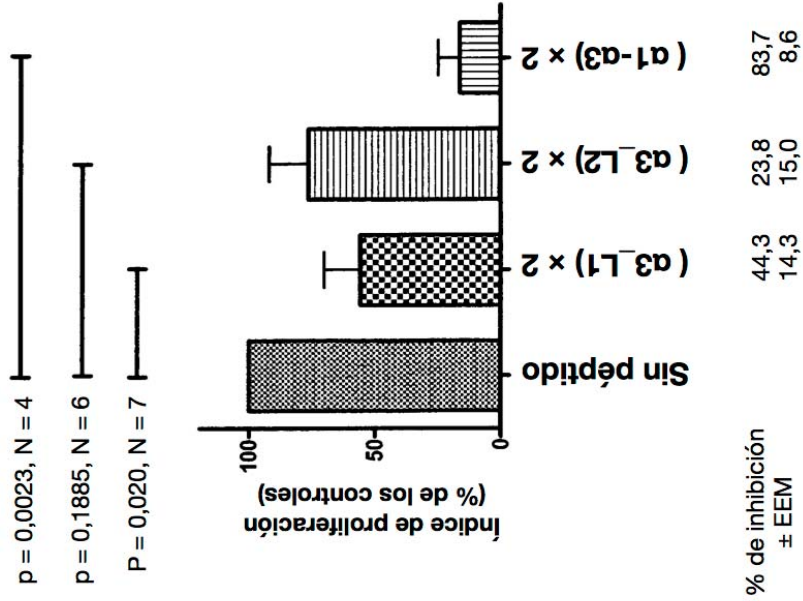
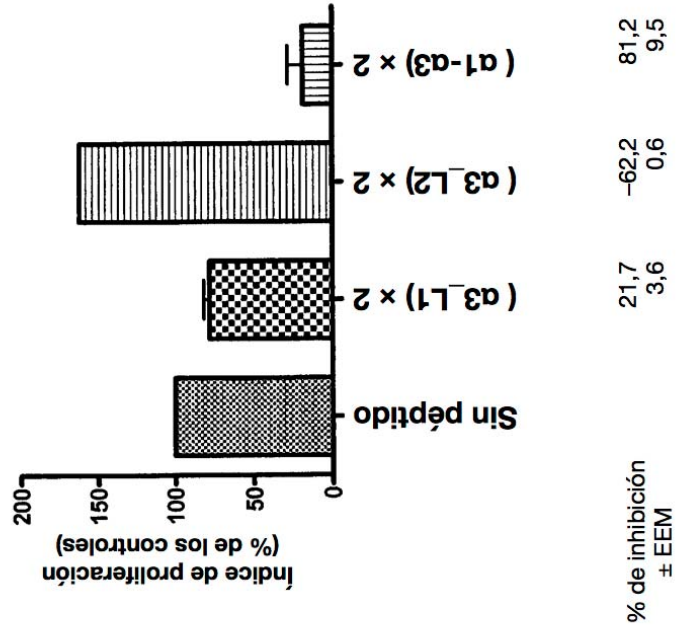


FIGURA 4

Efecto de los péptidos de HLA-G sobre la multiplicación celular de la línea tumoral DAUDI (linfoma de Burkitt)

$p = 0,0743, N = 2$
 $p = 0,0057, N = 2$
 $P = 0,106, N = 2$ n.s.



Péptido

FIGURA 5

Efecto de los péptidos de HLA-G sobre la multiplicación celular de la línea tumoral U937 (linfoma histiocítico-monocito)

p = 0,031, N = 2

p = 0,2478, N = 2 n.s.

P = 0,2120, N = 2 n.s.

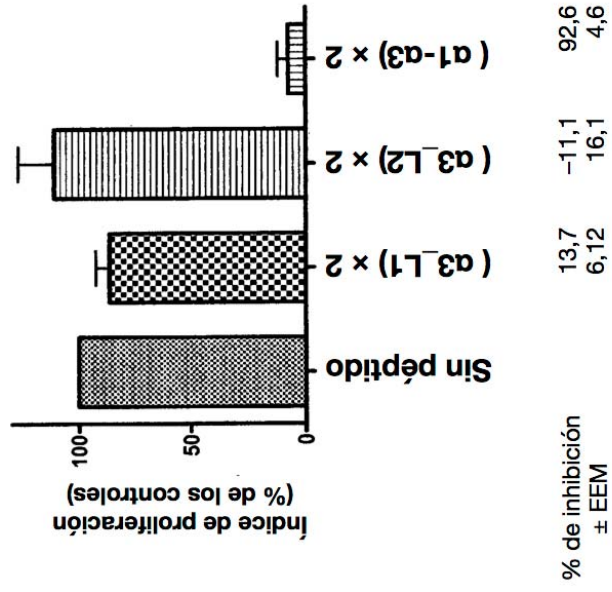
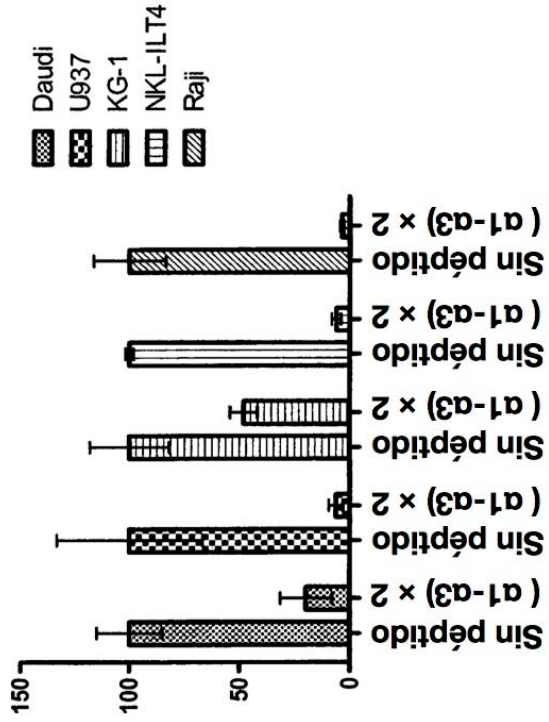


FIGURA 6

Efecto del péptido ($\alpha 1-\alpha 3$) x 2 sobre la proliferación de las líneas celulares tumorales

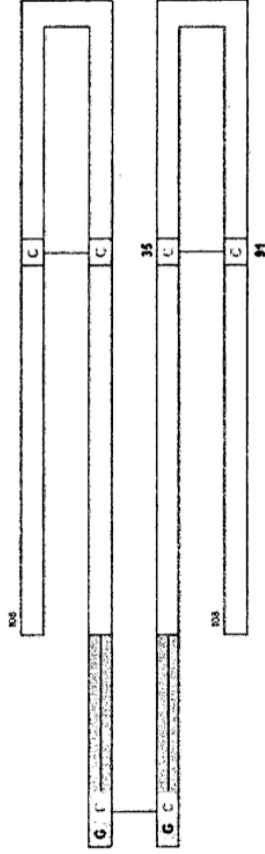


Péptido

FIGURA 7

Péptido ($\alpha 3_L1$)

GCGGGGGSRADPPKTHVTHHPVFDYEATLRCWALGFYPAEIILTWQ
 RDGEDQTQDVELVETRPAGDGTQKWA^{AV}WVPSGEEQRYTCHVQHEGLP
 EPLMLRWKQ (SEQ ID NO:3)



Péptido ($\alpha 3_L2$)

CASDSDFRVFQTDKEMLQRADPPKTHVTHHPVFDYEATLRCWALGFYPAEIIL
 LTWQRDGEDQTQDVELVETRPAGDGTQKWA^{AV}WVPSGEEQRYTCHVQHEGLP
 EGLPEPLMLRWKQ (SEQ ID NO:5)

FIGURA 8

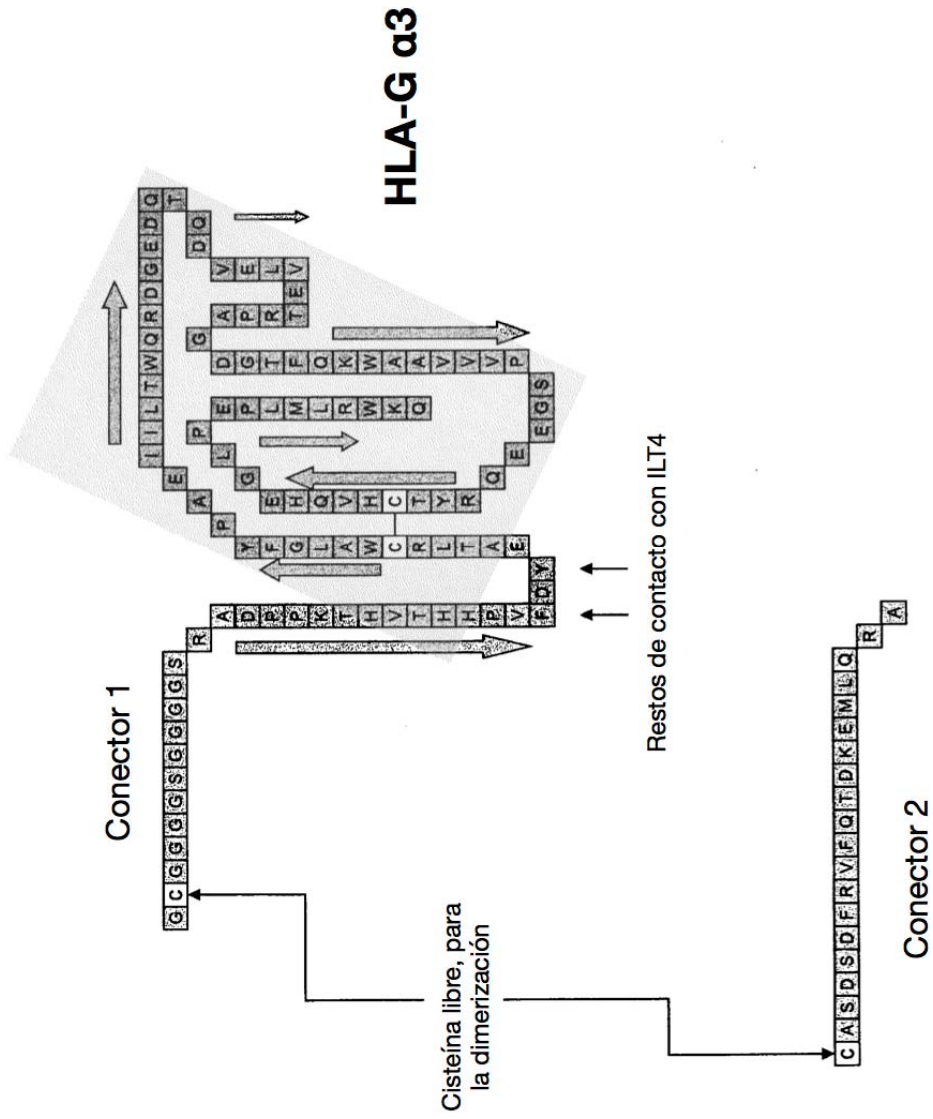


FIGURA 9

Péptido $\alpha 1$ - $\alpha 3$ (HLA-G6)

$\alpha 1$ GSHSMRYFSAAVSRPGRGEPFIAMGYVDDTQFVRFDSDSA**C**PRME
 PRAPVEQEGPEYWEETRNTKAHAQTDRMNLQTLRGYYNQSEADP
 $\alpha 3$ PKTHVTHHPV**F**YEATLR**C**WALGFYPAEIIITWQRDGEDQTQDVVELV
 ETRPAGDGTFFQKWAAVVPSGEEQRYT**C**HVQHEGLPEPLMLRWKQ

(SEQ ID NO:4)

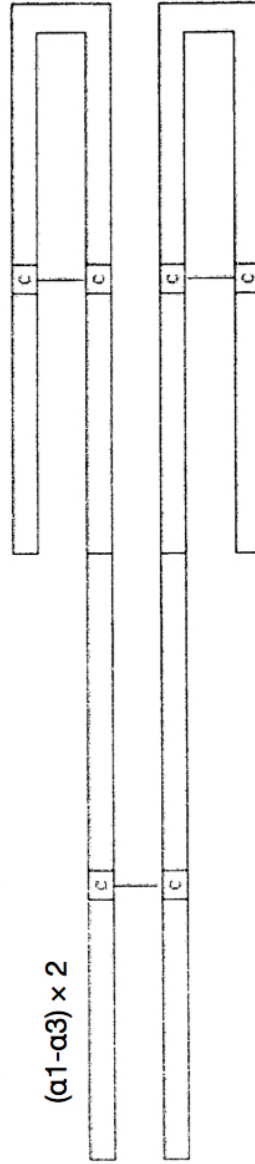


FIGURA 10