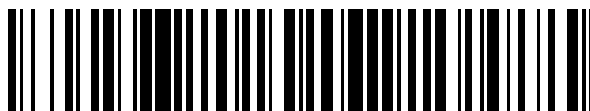


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 549 128**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/30** (2006.01)

**C12N 15/62** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.05.2007** **E 07777164 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2015** **EP 2024507**

54 Título: **Proteínas de fusión, usos de las mismas y procesos para producir las mismas**

30 Prioridad:

**19.05.2006 US 801798 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**23.10.2015**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**REITER, YORAM;  
NOY, ROY y  
OVED, KFIR**

74 Agente/Representante:

**CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes**

ES 2 549 128 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

Proteínas de fusión, usos de las mismas y procesos para producir las mismas.

- 5 La presente invención se refiere a una proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 1 de la presente invención, una composición de acuerdo con la reivindicación 2 de la presente invención, una construcción de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 3 de la presente invención, un vector de acuerdo con la reivindicación 4 de la presente invención, una célula transformada de acuerdo con la reivindicación 5 de la presente invención, una preparación aislada de cuerpos de inclusión expresados por bacterias de acuerdo con la reivindicación 6 de la presente invención, un proceso para producir una proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 7 de la presente invención.

De acuerdo con la teoría de vigilancia inmunológica actual, el sistema inmune continuamente localiza y destruye células transformadas. Sin embargo, algunas células escapan de una respuesta inmunológica aparentemente eficaz y en consecuencia se convierten en tumores (1-4). La evasión tumoral de la respuesta inmunológica es un fenómeno bien establecido demostrado en numerosos estudios y está causado por una amplia variedad de mecanismos sugeridos (1-4). Entre estos mecanismos se encuentran: la producción de citocinas supresoras, la pérdida de péptidos inmunodominantes, la resistencia a mecanismos de eliminación (apoptosis) y la pérdida de CMH de clase I (1-4). Uno de los mecanismos de evasión que muestra estar fuertemente correlacionado con la progresión tumoral es la pérdida o regulación descendente de moléculas CMH de clase I. Este mecanismo de invasión es abundante en muchos tumores y puede resultar de varias mutaciones diferentes. Varios estudios revelaron puntos débiles en la ruta de carga y presentación de CMH de clase I, incluyendo pérdida de beta-2-microglobulina, mutaciones TAP1/TAP2, mutaciones LMP, pérdida de heterocigosidad en los genes CMH, y regulación descendente de alelos CMH específicos.

Las estrategias de inmunoterapia contra el cáncer actuales emplean típicamente las dos ramas del sistema inmune: los sistemas humoral y celular. En el primero, la inyección sistémica de anticuerpos monoclonales de alta afinidad (mAbs) dirigidos contra antígenos asociados con el tumor de superficie celular ha demostrado actividad anti-tumoral estadísticamente significativa en ensayos clínicos (5, 6). Además, los mAbs anti-tumorales que llevan efectores, tales como citocinas o toxinas, están siendo evaluados actualmente en ensayos clínicos (7). El segundo enfoque principal para la inmunoterapia contra el cáncer específico emplea el brazo celular del sistema inmune, principalmente los linfocitos T citotóxicos CD8+. Se están usando actualmente dos estrategias principales para aumentar la eficacia anti-tumoral del brazo celular del sistema inmune: (1) inmunización activa de pacientes con péptidos conocidos por ser reconocidos por los linfocitos T, y (ii) terapias de transferencia adoptiva que permiten la selección, activación y expansión de sub-poblaciones de linfocitos T altamente reactivos con una mejor potencia anti-tumoral. En el primer enfoque, los péptidos restringidos por CMH obtenidos a partir de antígenos asociados con tumor identificados recientemente (tales como gp100, el grupo MAGE, NY-ESO-1) se usan para vacunar pacientes. Estos péptidos derivados de antígeno específico de tumor son altamente específicos debido a su expresión exclusiva en tejidos específicos (8-11). La segunda estrategia, transferencia de células adoptiva, recientemente ha mostrado resultados impresionantes en pacientes con melanoma metastásico en los que los linfocitos T reactivos a tumor altamente seleccionados contra diferentes antígenos de diferenciación auto-derivados sobre-expresados se aislaron, se consumieron *ex vivo* y se introdujeron de nuevo en los pacientes. En este enfoque se demostraron una repoblación clonal persistente de linfocitos T, proliferación *in vivo*, actividad funcional, y tráfico a sitios de tumor (12-14).

Un nuevo enfoque inmunoterapéutico presentado recientemente aprovecha dos áreas bien establecidas: (i) la eficacia conocida de los linfocitos T citotóxicos CD8+ en la eliminación de células que presentan complejos CMH/péptidos altamente inmunogénicos, y (ii) los antígenos de superficie celular específicos de tumor dirigidos a través de fragmentos recombinantes de anticuerpos, principalmente fragmentos Fv de cadena sencilla (scFVs). Este enfoque utiliza una proteína de fusión recombinante compuesta de dos entidades funcionalmente distintas: (i) una molécula CMH de clase I de cadena sencilla que lleva un tumor altamente inmunogénico o péptido derivado de un virus, y (ii) un fragmento scFv de alta afinidad, específico de tumor (15). Varios grupos han mostrado previamente que un péptido CMH biotinilado multimerizado en estreptavidina o complejos de péptido de matriz de influenza (Flu)/HLA-A2 monomérico acoplados a través de conjugación química a anticuerpos específicos de tumor podrá inducir la lisis mediada por linfocitos T *in vitro* de células tumorales revestidas (16-20). Sin embargo, estos enfoques utilizan conjugación química y usan anticuerpos completos o fragmentos más grandes, por ejemplo fragmentos Fab. Sin embargo, la producción y homogeneidad a causa de la estrategia de acoplamiento, así como la capacidad de penetración tumoral son limitadas debido al gran tamaño de dichas moléculas. Lev y col. describen una fusión genética creada entre HLA-A2 recombinante de cadena sencilla y scFv específicos de tumor. Se mostró que estas

fusiones son funcionales *in vitro* e *in vivo*, siendo capaces de inducir específicamente el linfocito T mediado en lisis *in vitro* e *in vivo* de células tumorales revestidas por diana (15). La estabilidad de la nueva molécula quimérica es altamente dependiente de la presencia del péptido en el surco de CMH. Por lo tanto, la disociación del péptido del dominio scHLA-A2 de la molécula quimérica puede deteriorar su estabilidad. Oved y col. abordan este problema construyendo nuevas moléculas quiméricas en las que el péptido se conecta a la construcción scHLA-A2/scFv a través de un enlazador corto. Esta nueva proteína de fusión se ensayó para evaluar su actividad bioquímica y biológica *in vitro* (21).

Existe una necesidad ampliamente reconocida de una nueva proteína de fusión que pueda mantener su actividad dual: unir células diana de tumor a través del resto scFv, así como mediar una citotoxicidad potente, eficaz y específica a través del reclutamiento de linfocitos T CD8+ cuya especificidad se gobierna por el péptido restringido por HLA-A2 unido covalentemente.

El brazo efector de linfocitos T citotóxicos (CTL) CD8+ restringido por CMH de clase I de la respuesta inmune adaptativa está mejor equipado para reconocer las células tumorales como extrañas e iniciar la cascada de eventos que dan como resultado la destrucción tumoral. Sin embargo, los tumores han desarrollado estrategias sofisticadas para escapar de mecanismos efectores inmunes, de los cuales el mejor estudiado es la regulación descendente de moléculas CMH de clase I que presentan los antígenos reconocidos por los CTL.

Para superar la limitación de los enfoques previos y desarrollar nuevos enfoques para inmunoterapia, se construyó una molécula recombinante en la que una CMH de cadena sencilla se dirige específicamente a las células tumorales a través de su fusión a fragmentos de anticuerpos recombinantes específicos de cáncer o un ligando que se une a receptores expresados por células tumorales.

KFIR OVED y col. se refieren a «antibody-mediated targeting of human single-chain class I MHC with covalently linked peptides inducing efficient killing of tumor cells by tumor or viral-specific cytotoxic T lymphocytes», cancer immunology, immunotherapy, Springer, Berlín, Al., vol. 54, Nº 9, 1 de septiembre de 2005, páginas 867-879.

Hassan R y col. se refieren a "Mesothelin: a new target for immunotherapy", clinical cancer research, the American association for cancer research, Estados Unidos, vol. 10, Nº 12, parte 01, 15 de junio de 2004, páginas 3937-3942.

La proteína de fusión de la presente invención se define en la reivindicación 1, la composición de la presente invención se define en la reivindicación 2, la construcción de ácido nucleico de la presente invención se define en la reivindicación 3, el vector de la presente invención se define en la reivindicación 4, la célula transformada de la presente invención se define en la reivindicación 5, la preparación aislada de cuerpos de inclusión expresados por bacterias de la presente invención se define en la reivindicación 6, el proceso para producir una proteína de fusión de la presente invención se define en la reivindicación 7.

Esta invención proporciona una proteína de fusión que comprende aminoácidos consecutivos que, comenzando en el extremo amino de la proteína, corresponden a aminoácidos consecutivos presentes en (i) un péptido restringido por CMH humano de citomegalovirus, (ii) un primer enlazador peptídico, (iii) una  $\beta$ -2 microglobulina humana, (iv) un segundo enlazador peptídico, (v) una cadena HLA-A2 de una molécula CMH de clase I humana, (vi) un tercer enlazador peptídico, (vii) una región variable de una cadena pesada de un fragmento scFv de un anticuerpo, y (viii) una región variable de una cadena ligera de tal fragmento scFv, en la que los aminoácidos consecutivos que corresponden a (vii) y (viii) se unen juntos directamente por un enlace peptídico o por aminoácidos consecutivos que corresponden a un cuarto enlazador peptídico, y el fragmento scFv se obtiene a partir de un anticuerpo que se une específicamente a mesotelina.

Esta divulgación también proporciona composiciones que comprenden la proteína de fusión y un vehículo.

Esta divulgación proporciona adicionalmente una construcción de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende aminoácidos consecutivos que, comenzando en el extremo amino de la proteína, corresponden a los aminoácidos consecutivos presentes en (i) un péptido restringido por CMH humano de citomegalovirus, (ii) un primer enlazador peptídico, (iii) una  $\beta$ -2 microglobulina humana, (iv) un segundo enlazador peptídico, (v) una cadena HLA-A2 de una molécula CMH de clase I humana, (vi) un tercer enlazador peptídico, (vii) una región variable de una cadena pesada de un fragmento scFv de un anticuerpo, y (viii) una región variable de una cadena ligera de tal fragmento scFv, en la que los aminoácidos consecutivos que corresponden a (vii) y (viii) se unen juntos directamente por un enlace peptídico o por aminoácidos consecutivos que corresponden a un cuarto enlazador peptídico, y el fragmento scFv se obtiene a partir de un anticuerpo que se une específicamente a mesotelina.

Esta divulgación aún proporciona adicionalmente una preparación aislada de cuerpos de inclusión expresados por bacterias que comprenden más del 30 por ciento en peso de una proteína de fusión de acuerdo con la invención.

- 5 Esta divulgación también proporciona un proceso para producir una proteína de fusión que comprende cultivar una célula transformada que comprende la proteína de fusión, de manera que la proteína de fusión se exprese, y recuperar la proteína de fusión expresada de este modo.

Como una molécula ejemplar de la presente invención, una molécula CMH de cadena sencilla compuesta por  $\beta_2$  microglobulina fusionada a los dominios  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  de HLA-A2 a través de un enlazador peptídico corto (15 aminoácidos) se fusionó al scFv SS1 que se dirige a mesotelina. Para construir una proteína de fusión con péptido unido covalentemente, un péptido de 9 aminoácidos obtenido de la proteína CMV pp65 NLVPMVATV (SEC ID NO: 4) se fusionó al extremo N de la proteína de fusión scHLA-A2/SS1 (scFv) a través de un enlazador de 20 aminoácidos GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEC ID NO: 6). La proteína de fusión se expresó en *E. coli* y las moléculas funcionales se produjeron por repliegue *in vitro* en presencia de CMV/scHLA-A2/SS1 (scFv). Los estudios de citometría de flujo revelaron la capacidad de decorar células tumorales humanas negativas a HLA-A2, positivas a antígeno con complejos HLA-A2-péptido de una manera que era completamente dependiente de la especificidad del fragmento de anticuerpo dirigido. De manera más importante, el revestimiento mediado por CMV/scHLA-A2/SS1 (scFv) de las células tumorales diana las hace susceptibles para lisis mediada por CTL específica de péptido CMV, restringida por HLA-A2 específica y eficiente. Estos resultados demuestran que la dirección específica de antígeno tumoral guiada por anticuerpo de complejos CMH-péptido en tumorales pueden hacerlas susceptibles a, y potenciar, la eliminación de CTL. Este nuevo enfoque abre ahora el camino para el desarrollo de nuevas estrategias inmunoterapéuticas basadas en la dirección de anticuerpos de ligandos CMH consanguíneos naturales y mecanismos citotóxicos basados en CTL.

25 Junto con la presente invención, se desarrolló una nueva estrategia para re-dirigir complejos CMH de clase I-péptido sobre la superficie de células tumorales de una forma que es independiente del grado de expresión de CMH de clase I por las células tumorales diana. Para este fin, en una realización de la presente invención, se empleó una molécula con dos grupos. Un grupo, el resto dirigido, comprende fragmentos recombinantes específicos de tumor de anticuerpos dirigidos al tumor o antígenos de diferenciación que se han usado durante muchos años para dirigir radioisótopos, toxinas o fármacos a células cancerosas. El segundo grupo efector es una molécula CMH de cadena sencilla (scMHC) compuesta por  $\beta_2$ -microglobulina humana enlazada a los tres dominios extracelulares de la cadena pesada HLA-A2 (24, 25, documento WO 01/72768). Conectando los genes que codifican dos grupos en un único gen recombinante y que expresan el gen, la nueva molécula se expresa eficazmente en *E. coli* y se produce, por ejemplo, por repliegue *in vitro* en presencia de péptidos HLA-A2-CMV. Este enfoque, como se describe en el presente documento, hace a las células tumorales diana susceptibles a lisis por linfocitos T citotóxicos sin considerar su nivel de expresión de CMH y, por lo tanto, se puede emplear como un nuevo enfoque para potenciar la inmunidad anti-tumoral mediada por CTL. Este nuevo enfoque conducirá al desarrollo de una nueva clase de agentes terapéuticos recombinantes capaces de aniquilar y eliminar de forma selectiva células tumorales utilizando ligandos de CMH consanguíneos naturales y mecanismos citotóxicos basados en CTL.

### **Breve descripción de las figuras**

#### **Figuras 1A-B**

45 Representación esquemática de scHLA-A2/SS1 (scFv) y un pep(CMV)/scHLA-A2/SS1 (scFv) (Compuesto A). La figura 1A ilustra el extremo C de la scHLA-A2 fusionada al extremo N de SS1 (scFv) a través de un enlazador de 4 aminoácidos.

La figura 1B ilustra que el péptido CMV pp65, es decir NLVPMVATV (SEC ID NO: 4) se fusionó al extremo N de scHLA-A2/SS1 (scFv) a través de un enlazador de 20 aminoácidos GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEC ID NO: 6).

#### **Figura 2**

Secuencia de ácidos nucleicos que codifica el Compuesto A.

#### **Figura 3A-B**

Expresión y purificación del Compuesto A.

55 La figura 3A muestra el análisis SDS/PAGE de cuerpos de inclusión aislados.

La figura 3B muestra el análisis SDS/PAGE del Compuesto A después de la purificación por cromatografía de intercambio iónico.

#### **Figura 4**

Unión del Compuesto A a mesotelina recombinante.

La mesotelina se inmovilizó en inmuno-placas y la unión dependiente de la dosis del Compuesto A se controló por mAb W6 sensible a conformación (33, 34).

#### **Figuras 5A-D**

Unión del Compuesto A a células que expresan mesotelina.

Las figuras 5A-B demuestran el análisis de citometría de flujo de la unión del Compuesto A a células A431K5 negativas a HLA-A2, positivas a mesotelina y células A431 negativas a HLA-A2, negativas a mesotelina. La figura 5A muestra la unión de mAb K1 (31, 32) a células A431K5, y la figura 5B muestra la ausencia de unión de mAb K1 a células A431. La figura 5C muestra la unión del Compuesto A a células A431K5, y

la figura 5D muestra la ausencia de unión del Compuesto A a células A431. La unión se controló usando anticuerpos específico de anti-HLA-A2 BB7.2 (35) y un anticuerpo secundario marcado con FITC.

#### **Figuras 6A-B**

Potenciación de lisis mediada por CTL de células tumorales negativas a HLA-A2 por el Compuesto A. En la figura 6A, las células A431K5 transfectadas con mesotelina y las células A431 negativas a mesotelina parentales se incubaron con el Compuesto A (10 µg) y los CTL específicos de CMV en un ensayo de liberación de [<sup>35</sup>S]metionina. La figura 6B demuestra la actividad dependiente de la dosis del Compuesto A cuando las células A431K5 transfectadas con mesotelina y las células A431 negativas a mesotelina parentales se incubaron con diferentes concentraciones del Compuesto A y CTL específicos de CMV en un ensayo de liberación de [<sup>35</sup>S] metionina.

#### **Figura 12**

Potenciación de lisis mediada por CTL de células tumorales negativas a HLA-A2 por el Compuesto B y el Compuesto A. Las células A431K5 transfectadas con mesotelina y las células A431 negativas a mesotelina parentales se incubaron con diferentes concentraciones de Compuesto B o Compuesto A y con CTL específicos de CMV en un ensayo de liberación de [<sup>35</sup>S]metionina. La figura muestra los resultados de la incubación del Compuesto A con células A431K5, la incubación del Compuesto B con células A431K5, la incubación del Compuesto A con células A431, y la incubación del Compuesto B con células A431.

#### **Figuras 13A-B**

Representación esquemática de scHLA-A2/SS1 (scFv) y M1cov/scHLA-A2/SS1 (scFv).

La figura 13A muestra el extremo C de la scHLA-A2 fusionado al extremo N de scFv a través de un enlazador de 4 aminoácidos.

La figura 13B muestra el péptido M158-66 fusionado al extremo N de scHLA-A2/SS1 (scFv) a través de un enlazador de 15 aminoácidos GGGGSGGGGSGGGGS (SEC ID NO: 8).

#### **Figura 14**

Secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína de fusión M1cov/scHLA-A2/SSI (scFv) (SEQ ID NO: 23).

#### **Figuras 15A-B**

Expresión y purificación de la proteína de fusión M1-cov/scHLA-A2/SS1 (scFv).

La figura 15A muestra el análisis SDS/PAGE de cuerpos de inclusión aislados. La figura 15B muestra el análisis SDS/PAGE de la proteína de fusión M1-cov/scHLA-A2/SS1 (scFv) después de la purificación por cromatografía de intercambio iónico.

#### **Figura 16**

Unión de la proteína de fusión M1-cov/scHLA-A2/SS1 (scFv) a mesotelina recombinante. La mesotelina se inmovilizó sobre inmuno-placas y la unión dependiente de la dosis de M1-cov/scHLA-A2/SS1 (scFv) se controló por mAb (W6) sensible a conformación.

#### **Figuras 17A-D**

Unión de la proteína de fusión M1-cov/scHLA-A2/SS1 (scFv) a células que expresan mesotelina. Las figuras 17A-D muestran análisis de citometría de flujo de la unión de M1-cov/scHLA-A2/SS1 (scFv) a células A431K5 negativas a HLA-A2, positivas a mesotelina y células A431 negativas a HLA-A2, negativas a mesotelina. La figura 17A muestra la unión de mAb K1 a células A431K5, y la figura 17B muestra la ausencia de la unión de mAb K1 a células A431. La figura 17C muestra la unión de la proteína de fusión M1-cov/scHLA-A2/SS1 (scFv) a células A431K5, y la figura 17D muestra la ausencia de la unión de la proteína de fusión a células A431. La unión se controló usando anticuerpo específico de anti-HLA-A2 BB7.2 y un anticuerpo secundario marcado con FITC.

#### **Figura 18**

Potenciación de lisis mediada por CTL de células tumorales negativas a HLA-A2 por la proteína de fusión M1-cov/scHLA-A2/SS1 (scFv). Las células A431K5 transfectadas con mesotelina y las células A431 negativas a mesotelina parentales se incubaron con diferente concentración de M1-cov/scHLA-A2/SS1 (scFv) y con CTL restringidos por HLA-A2 específicos de M1 en un ensayo de liberación de [<sup>35</sup>S]metionina.

**Descripción detallada de la invención**

Esta divulgación proporciona una proteína de fusión que comprende aminoácidos consecutivos que, comenzando en el extremo amino de la proteína, corresponden a aminoácidos consecutivos presentes en (i) un péptido restringido por CMH humano de citomegalovirus, (ii) un primer enlazador peptídico, (iii) una  $\beta$ -2 microglobulina humana, (iv) un segundo enlazador peptídico, (v) una cadena HLA-A2 de una molécula CMH de clase I humana, (vi) un tercer enlazador peptídico, (vii) una región variable de una cadena pesada de un fragmento scFv de un anticuerpo, y (viii) una región variable de una cadena ligera de tal fragmento scFv, en la que los aminoácidos consecutivos que corresponden a (vii) y (viii) se unen juntos directamente por un enlace peptídico o por aminoácidos consecutivos que corresponden a un cuarto enlazador peptídico, y el fragmento scFv se obtiene a partir de un anticuerpo que se une específicamente a mesotelina. En una realización, el primer enlazador peptídico tiene la secuencia aminoacídica GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 6). En otra realización, el segundo enlazador peptídico tiene la secuencia aminoacídica GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 8). En otra realización, el tercer enlazador peptídico tiene la secuencia aminoacídica ASGG (SEQ ID NO: 10). En otra realización, el cuarto enlazador peptídico tiene la secuencia aminoacídica GVGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 19). En otra realización, el péptido restringido por CMH humano de citomegalovirus tiene la secuencia aminoacídica NLVPMVATV (SEQ ID NO: 4).

Como se usa en el presente documento, "primer enlazador peptídico", "segundo enlazador peptídico" y "cuarto enlazador peptídico" se refieren a péptidos compuestos de un péptido monomérico cuya secuencia aminoacídica es GXGGS (SEC ID NO: 20) o un multímero de los mismos, donde X puede ser cualquier aminoácido. Estos enlazadores peptídicos pueden ser un multímero de 2-10 de dichos péptidos monoméricos. En dicho multímero, cada péptido monomérico puede ser igual o diferente de otro péptido monomérico en el multímero dependiendo de la identidad del aminoácido X. En una realización, X en el péptido monomérico es el aminoácido valina (V). En otra realización, X en el péptido monomérico es el aminoácido glicina (G). En las realizaciones actualmente preferidas, el enlazador peptídico comprende un multímero de tres o cuatro péptidos monoméricos, particularmente un multímero de tres péptidos monoméricos en los que la mayoría de X del extremo N es el aminoácido V, y la segunda y tercera X son el aminoácido G.

En una realización, la secuencia de los aminoácidos consecutivos correspondientes a (vii), seguido del cuarto enlazador peptídico, seguido de (viii) se expone en la SEC ID NO: 12.

En otra realización, los aminoácidos consecutivos de la proteína de fusión, Compuesto A, tienen la secuencia aminoacídica expuesta en la SEC ID NO: 2.

Esta divulgación también proporciona una composición que comprende una proteína de fusión de acuerdo con la invención y un vehículo. En una realización, la proteína de fusión está presente en la composición en una cantidad terapéuticamente eficaz y el vehículo es un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Esta divulgación también proporciona una construcción de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende aminoácidos consecutivos que, comenzando en el extremo amino de la proteína, corresponden a aminoácidos consecutivos presentes en (i) un péptido restringido por CMH humano de citomegalovirus, (ii) un primer enlazador peptídico, (iii) una  $\beta$ -2 microglobulina humana, (iv) un segundo enlazador peptídico, (v) una cadena HLA-A2 de una molécula CMH de clase I humana, (vi) un tercer enlazador peptídico, (vii) una región variable de una cadena pesada de un fragmento scFv de un anticuerpo, y (viii) una región variable de una cadena ligera de tal fragmento scFv, en la que los aminoácidos consecutivos que corresponden a (vii) y (viii) se unen juntos directamente por un enlace peptídico o por aminoácidos consecutivos que corresponden a un cuarto enlazador peptídico, y el fragmento scFv se obtiene a partir de un anticuerpo que se une específicamente a mesotelina. En una realización, la construcción de ácido nucleico tiene la secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEC ID NO: 1.

Esta divulgación también proporciona un vector que comprende la construcción de ácido nucleico de la invención. Los ejemplos de dichos vectores son plásmidos, virus, fagos y similares.

Esta divulgación proporciona adicionalmente un vector de expresión que comprende la construcción de ácido nucleico de la invención y un promotor enlazado operativamente al mismo.

Esta divulgación también proporciona una célula transformada que comprende un vector de acuerdo con la invención. La célula transformada puede ser una célula eucariota, por ejemplo, una seleccionada entre el grupo que consiste de una célula de mamífero, una célula de insecto, una célula de planta, una célula de levadura y una célula de protozoo. Como alternativa, la célula transformada puede ser una célula bacteriana.

Esta divulgación proporciona una preparación aislada de cuerpos de inclusión expresados por bacterias que comprende más del 30 por ciento en peso de una proteína de fusión de acuerdo con la invención.

- 5 Esta divulgación también proporciona un proceso para producir una proteína de fusión que comprende cultivar la célula transformada de la invención de manera que la proteína de fusión se exprese, y recuperar la proteína de fusión expresada de este modo. En una realización, la recuperación de la proteína de fusión comprende someter la proteína de fusión expresada a cromatografía por exclusión de tamaño. En otra realización, la proteína de fusión se expresa en cuerpos de inclusión. En una realización, el proceso comprende adicionalmente tratar los cuerpos de inclusión para separar y replegar la proteína de fusión y producir la proteína de fusión en forma activa. En otra  
10 realización, el tratamiento de los cuerpos de inclusión para separar la proteína de fusión de los mismos comprende poner en contacto los cuerpos de inclusión con un agente de desnaturalización.

- Como se usa en el presente documento, una "forma activa" de la proteína de fusión se refiere a una conformación tridimensional de la proteína de fusión que permite que la proteína de fusión se una específicamente a mesotelina cuando la mesotelina está presente sobre la superficie de una célula tumoral.  
15

- La presente divulgación proporciona (i) nuevas proteínas de fusión; (ii) procesos para preparar las mismas; (iii) construcciones de ácido nucleico que codifican las mismas; y (iv) métodos para usar las mismas para la eliminación selectiva de células, células cancerosas en particular.  
20

Los principios y operación de la presente invención se pueden entender mejor con referencia a las figuras y la descripción expuesta en el presente documento.

- 25 Se entenderá que la invención no se limita en su aplicación a los detalles expuestos en la descripción o como se ilustran. La invención incluye otras realizaciones y es capaz de ponerse en práctica o realizarse de diversas formas. Además, se entenderá que la fraseología y terminología empleadas en el presente documento es con fines de descripción y no se deberán interpretar como limitantes.

- 30 La progresión de tumor se asocia con frecuencia a la secreción de factores inmuno-supresores y/o la regulación descendente de funciones de presentación de antígeno de CMH de clase I (2). Incluso cuando se demuestra una respuesta de CTL específica en los pacientes, esta respuesta es baja porque la población de CTL antitumor es rara, muy infrecuente, y en algunos casos los CTL no son funcionales o son anérgicos (26). Además, está bien establecido que el número de complejos CMH-péptido en la superficie de células tumorales que presentan un péptido asociado a tumor particular es bajo (27). El progreso significativo hacia el desarrollo de vacunas que pueden  
35 estimular una respuesta inmune contra tumores ha involucrado la identificación de los antígenos de proteína asociados con un tipo de tumor dado y el mapeo de epítipo de antígenos tumorales para motivos de unión restringidos por CMH de clase I y clase II se identificaron y actualmente están siendo usados en diversos programas de vacunación (14, 11, 8). Las moléculas CMH de clase I que presentan los péptidos apropiados son necesarias  
40 para proporcionar las señales específicas para el reconocimiento y eliminación por CTL. Sin embargo, el mecanismo principal del escape de tumor es la pérdida, regulación descendente o alteración de perfiles HLA que pueden hacer a la célula objetivo no respondedora a lisis de CTL, incluso si la célula expresa al antígeno tumoral apropiado.

- La presente invención proporciona un nuevo enfoque para evitar este problema. Mientras se reduce la presente invención a la práctica, la dirección específica de tumor de complejos CMH de clase I-péptido en células tumorales  
45 mostró ser una estrategia eficaz y eficientes para convertir a las células negativas a HLA-A2 susceptibles a lisis por CTL restringidos por HLA-A2 relevantes. Esta nueva estrategia de redirigir los CTL contra células tumorales aprovecha el uso de un fragmento de anticuerpo anti-mesotelina recombinante y un ligando de CMV que puede localizarse en células malignas que expresan un tumor con un grado relativamente alto de especificidad.  
50

El fragmento dirigido a anticuerpo anti-mesotelina y el ligando CMV se fusionan a una molécula HLA-A2 de cadena sencilla que se puede plegar eficientemente y funcionalmente.

- Los resultados presentados en el presente documento proporcionan una clara demostración de la utilidad del enfoque de la presente invención para reclutar CTL activos para la eliminación de células tumorales a través de un  
55 direccionamiento guiado por anticuerpo o ligando específico de cáncer de complejos scMHC-péptido. Estos resultados allanan el camino para el desarrollo de un nuevo enfoque inmunoterapéutico basado en las respuestas inmunes celulares de origen natural que se redirigen contra las células tumorales.

Se apreciará que la proteína de fusión de la presente invención o porciones de la misma se puede preparar por varias formas, incluyendo síntesis de proteína en fase sólida. Sin embargo, en la realización preferida de la invención, al menos porciones mayores de las moléculas, por ejemplo, el dominio sCHLA-A2 (con o sin el péptido CMV) y el dominio scFV se generan por traducción de una construcción o construcciones de ácido nucleico respectivos que codifican la molécula.

Por consiguiente, se requieren de uno a tres marcos de lectura abiertos para sintetizar las moléculas de la figura 1B a través de traducción. Estos marcos de lectura abiertos pueden residir en una única, dos o tres moléculas de ácido nucleico. Por lo tanto, por ejemplo, una construcción de ácido nucleico único puede llevar uno, dos o los tres marcos de lectura abiertos. Puede usarse de una a tres secuencias reguladoras de la acción cis para controlar la expresión del uno a tres marcos de lectura abiertos. Por ejemplo, una única secuencia reguladora de la acción cis puede controlar la expresión de uno, dos o tres marcos de lectura abiertos, de manera tipo cistrona. En la alternativa, pueden usarse tres secuencias reguladoras de la acción cis independientes para controlar la expresión de los tres marcos de lectura abiertos. También se contemplan otras combinaciones.

Los marcos de lectura abiertos y las secuencias reguladoras de la acción cis se pueden realizar por una a tres moléculas de ácido nucleico. Por ejemplo, cada marco de lectura abierto y su secuencia reguladora de la acción cis se llevan por una molécula diferente de ácido nucleico, o todos los marcos de lectura abiertos y sus secuencias reguladoras de la acción cis asociadas se llevan por una única molécula de ácido nucleico. También se contemplan otras combinaciones.

La expresión de la proteína de fusión se puede realizar por transformación/transfección y/o co-transformación/co-transfección de una única célula o una pluralidad de células con cualquiera de las moléculas de ácido nucleico, sirviendo como vectores de transformación/transfección (por ejemplo, plásmidos, fagos, fagémidos o virus).

Se apreciará que la proteína de fusión cuya secuencia aminoacídica se describe en la SEC ID NO: 2 e incluye la metionina del aminoácido N-terminal, probablemente representa la proteína de fusión como se expresa en una célula bacteriana. Dependiendo de la célula bacteriana específica empleada para expresar la proteína de fusión, la metionina N-terminal se puede escindir y eliminar. Por consiguiente, se contempla que las proteínas de fusión de acuerdo con esta invención incluyen tanto aquellas con, y aquellas sin, una metionina N-terminal. En general, cuando una proteína de fusión de acuerdo con la invención se expresa en una célula eucariota, podría carecer de la metionina N-terminal. Por lo tanto, se apreciará que la secuencia aminoacídica de las proteínas de fusión expresadas de acuerdo con la invención puede incluir o no tal metionina N-terminal dependiendo del tipo de células en las que se expresan las proteínas.

Cada vez y donde quiera que se use, el péptido enlazador se selecciona de una secuencia aminoacídica que es inherentemente flexible, de tal forma que los polipéptidos conectados así se pliegan independiente y nativamente después de la expresión de los mismos, facilitando así la formación de un complejo  $\beta_2$ M/HLA humano (sc) de cadena sencilla funcional o activo, complejo de antígeno restringido por  $\beta_2$ M/HLA CMV humano o dirigido a anticuerpo.

Cualquiera de las construcciones de ácido nucleico descritas en el presente documento comprende al menos una secuencia reguladora de la acción cis enlazada operativamente a los polinucleótidos de codificación en la misma. Preferiblemente, la secuencia reguladora de la acción cis es funcional en bacterias. Como alternativa, la secuencia reguladora de la acción cis es funcional en levadura. Aún como alternativa, la secuencia reguladora de la acción cis es funcional en células animales. Todavía como alternativa, la secuencia reguladora de la acción cis es funcional en células vegetales.

La secuencia reguladora de la acción cis puede incluir una secuencia promotora y secuencias mejoradoras transcripcionales o traducionales adicionales cada una de las cuales sirven para facilitar la expresión de los polinucleótidos cuando se introducen en una célula huésped. Los ejemplos específicos de promotores se describen a continuación en el presente documento en el contexto de diversos sistemas de expresión eucariota o procariota y en la sección de ejemplos que se indica más adelante.

Se apreciará que se puede utilizar una secuencia reguladora de la acción cis única en una construcción de ácido nucleico para dirigir la transcripción de un único transcrito que incluye uno o más marcos de lectura abiertos. En el último caso, se puede utilizar un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES) para permitir la traducción de la secuencia de ácido nucleico situada internamente.



Cada vez que la co-expresión de polipéptidos independientes en una única célula es de elección, la construcción o construcciones empleadas se deben configurar de tal forma que los niveles de expresión de los polipéptidos independientes se optimicen, para obtener proporciones más altas del producto final.

- 5 Preferiblemente un promotor (que es un ejemplo de una secuencia reguladora de la acción cis) utilizado por las construcciones de ácido nucleico de la presente invención es un fuerte promotor constitutivo de tal forma que se logren altos niveles de expresión para los polinucleótidos después de la transformación de célula huésped.

- Se apreciará que también pueden realizarse altos niveles de expresión transformando la célula huésped con un alto  
10 número de copias de la construcción o construcciones de ácido nucleico, o utilizando secuencias de acción cis que estabilizan el transcrito resultante y como tal disminuyen la degradación o "vuelco" de tal transcrito.

- Como se usa en el presente documento, la frase "célula transformada" describe una célula en la que se introduce una secuencia de ácido nucleico exógeno para alterar genéticamente de manera estable o temporalmente la célula  
15 huésped. Puede ocurrir en condiciones naturales o artificiales usando diversos métodos bien conocidos en la técnica, algunos de los cuales se describen en detalle a continuación en el presente documento en contexto con los ejemplos específicos de células huésped.

- La célula huésped transformada puede ser una célula eucariota, tal como, por ejemplo, una célula de mamífero, una  
20 célula de insecto, una célula vegetal, una célula de levadura y una célula de protozoo o, como alternativa, la célula puede ser una célula bacteriana.

- Cuando se utilizan para la expresión de células huésped eucariotas, las construcciones de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención pueden ser un vector lanzadera, que puede propagarse tanto en *E. coli* (donde la  
25 construcción comprende un marcador y origen de replicación seleccionable apropiado) y es compatible para la expresión en células huésped eucariotas. Las construcciones de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención pueden ser, por ejemplo, un plásmido, un bácmido, un fagémido, un cósmido, un fago, un virus o un cromosoma artificial.

- 30 Los sistemas de expresión de mamíferos adecuados incluyen, pero sin limitación, pcDNA3, pcDNA3.1(+/-), pZeoSV2(+/-), pSecTag2, pDisplay, pEF/myc/cyto, pCMV/myc/cyto, pCR3.1, que están disponibles en Invitrogen™ Corporation (Carlsbad, CA, Estados Unidos), pCI que está disponible en Promega™ Corporation (Madison WI, Estados Unidos), pBK-RSV y pBK-CMV que están disponibles en Stratagene (La Jolla, CA, Estados Unidos), pTRES que está disponible en Clontech Laboratories, Inc. (Mountain View, CA, Estados Unidos), y sus derivados.

- 35 También se pueden utilizar cultivos de células de insecto para expresar las secuencias de ácido nucleico de la presente invención. Los sistemas de expresión de insecto adecuados incluyen, pero sin limitación, el sistema de expresión de baculovirus y sus derivados que están disponibles en el mercado a partir de numerosos proveedores, tales como maxBac™ (Invitrogen™ Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos), BacPak™ (Clontech®  
40 Laboratories, Inc. Mountain View, CA, Estados Unidos), o Bac-to-Bac™ (Invitrogen™/Gibco®, Carlsbad, CA, Estados Unidos).

- La expresión de las secuencias de ácido nucleico de la presente invención también se puede realizar en células vegetales. Como se usa en el presente documento, la frase "célula vegetal" puede referirse a protoplastos de  
45 plantas, células de un cultivo de tejido vegetal, células de tejidos derivados de plantas o células de plantas completas.

- Existen diversos métodos para introducir construcciones de ácido nucleico en células vegetales. Dichos métodos se basan en la integración estable de la construcción de ácido nucleico o una porción de la misma en el genoma de la  
50 célula vegetal, o en la expresión transitoria de la construcción de ácido nucleico, en cuyo caso estas secuencias no se integran de forma estable en el genoma de la célula vegetal.

- Existen dos métodos principales para realizar la integración genómica estable de secuencias de ácido nucleico exógeno, tales como las incluidas dentro de la construcción de ácido nucleico de la presente invención en genomas  
55 de células vegetales:

(i) Transferencia génica mediada por *Agrobacterium*: Klee y col. (1987) Annu. Rev. Plant Physiol. 38: 467-486; Klee y Rogers en Cell. Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, vol. 6, Molecular Biology of Plant Nuclear Genes, eds. Schell, J., y Vasil, L. K., Academic Publishers, San Diego, Calif. (1989) pág. 2-25;

Gatenby, en *Plant Biotechnology*, eds. Kung, S. y Arntzen, C. J., Butterworth Publishers, Boston, Mass. (1989) pág. 93-112.

(ii) captación de ADN directa: Paszkowski y col., en *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Vol. 6, Molecular Biology of Plant Nuclear Genes eds. Schell, J., y Vasil, L. K., Academic Publishers, San Diego, Calif. (1989) pág. 52-68; incluyendo métodos para la captación directa de ADN en protoplastos, Toriyama, K. y col. (1988) *Bio/Technology* 6: 1072-1074. Captación de ADN inducida por choque eléctrico breve de células vegetales: Zhang y col. *Plant Cell Rep.* (1988) 7: 379-384. Fromm y col. *Nature* (1986) 319: 791-793. Inyección de ADN en células o tejidos vegetales por bombardeo de partículas, Klein y col. *Bio/Technology* (1988) 6: 559-563; McCabe y col. *Bio/Technology* (1988) 6: 923-926; Sanford, *Physiol. Plant.* (1990) 79:206-209; por el uso de sistemas de micropipeta: Neuhaus y col., *Theor. Appl. Genet.* (1987) 75: 30-36; Neuhaus y Spangenberg, *Physiol. Plant.* (1990) 79:213-217; o por la incubación directa de ADN con polen de germinación, DeWet y col. en *Experimental Manipulation of Ovule Tissue*, eds. Chapman, G. P. y Mantell, S. H. y Daniels, W. Longman, London, (1985) pág. 197-209; y Ohta, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1986) 83: 715-719.

El sistema *Agrobacterium* incluye el uso de vectores plasmídicos que contienen segmentos de ADN definidos que se integran en el ADN genómico de plantas. Los métodos de inoculación del tejido vegetal varían dependiendo de las especies de plantas y el sistema de administración de *Agrobacterium*. Un enfoque ampliamente usado es el procedimiento de disco de hoja, véase por ejemplo, Horsch y col. en *Plant Molecular Biology Manual A5*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (1988) pág. 1-9. Un enfoque complementario emplea el sistema de administración de *Agrobacterium* junto con infiltración en vacío. El sistema *Agrobacterium* es especialmente viable en la creación de plantas dicotiledóneas transformadas de forma estable.

Existen diversos métodos de transferencia de ADN directa en células vegetales. En la electroporación, los protoplastos se exponen brevemente a un fuerte campo eléctrico. En la microinyección, el ADN se inyecta mecánicamente directamente en las células usando micropipetas muy pequeñas.

En el bombardeo de micropartículas, el ADN se adsorbe en microproyectiles tales como cristales de sulfato de magnesio, partículas de tungsteno o partículas de oro, y los microproyectiles se aceleran físicamente en las células o los tejidos vegetales. También se puede utilizar transferencia directa de ADN para transformar temporalmente células vegetales.

En cualquier caso, los promotores vegetales adecuados que pueden utilizarse para la expresión de células vegetales de las primera y segunda secuencias de ácido nucleico, incluyen, pero sin limitación, un promotor CaMV 35S, promotor ubiquitina, y otros promotores fuertes que pueden expresar las secuencias de ácido nucleico de una manera constitutiva o específica de tejido.

Los virus de plantas también se pueden usar como vectores de transformación. Los virus que han mostrado ser útiles para la transformación de los huéspedes de células vegetales incluyen Cav, TMV y BV. La transformación de plantas usando virus vegetales se describe en la Patente de Estados Unidos N° 4.855.237 (BGV), el documento EP-A 67.553 (TMV), la Solicitud Publicada Japonesa N° 63-14693 (TMV), el documento EPA 194.809 (BV), el documento EPA 278.667 (BV); y Gluzman, Y. y col., *Communications in Molecular Biology: Viral Vectors*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, págs. 172-189 (1988). Las partículas de pseudovirus para su uso en la expresión de ADN extraño en muchos huéspedes, incluyendo plantas, se describe en el documento WO 87/06261.

La construcción de virus de ARN de plantas para la introducción y expresión de secuencias de ácido nucleico exógeno no vírico en plantas se demuestra por las referencias anteriores, así como por Dawson, W. O. y col., *Virology* (1989) 172: 285-292; Takamatsu y col. *EMBO J.* (1987) 6: 307-311; French y col. *Science* (1986) 231: 1294-1297; y Takamatsu y col. *FEBS Letters* (1990) 269: 73-76.

Cuando el virus es un virus de ADN, las construcciones se pueden hacer al propio virus. Como alternativa, el virus se puede clonar en primer lugar en un plásmido bacteriano para la fácil construcción del vector vírico deseado con las secuencias de ácido nucleico que se han descrito anteriormente. Después, el virus se puede cortar del plásmido. Si el virus es un virus de ADN, puede unirse un origen de replicación bacteriano al ADN vírico, que después se replica por las bacterias. La transcripción y traducción de este ADN producirá la proteína de capa que encapsidará el ADN vírico. Si el virus es un virus de ARN, el virus se clona generalmente como un ADNc y se inserta en un plásmido. Después, el plásmido se usa para hacer todas las construcciones. Después, el virus de ARN se produce transcribiendo la secuencia vírica del plásmido y traduciendo los genes víricos para producir las proteínas de capa que encapsidan el ARN vírico.

La construcción de virus de ARN de plantas para la introducción y expresión en plantas de secuencias de ácido nucleico exógeno no víricas, tales como las incluidas en la construcción de la presente invención se demuestra por las referencias anteriores, así como en la Patente de Estados Unidos N° 5.316.931.

5

También pueden utilizarse células de levadura como células huésped por la presente invención. Se conocen en la técnica numerosos ejemplos de vectores de expresión de levadura adecuados para la expresión de secuencias de ácido nucleico de la presente invención en levadura y están disponibles en el mercado. Dichos vectores se introducen normalmente en una célula huésped de levadura a través de métodos de transformación de electroporación o química bien conocidos en la técnica. Los sistemas disponibles en el mercado incluyen, por ejemplo, los sistemas de expresión pYES™ (Invitrogen™ Corporation, Carlsbad CA, Estados Unidos) o YEX™ (Clontech® Laboratories, Mountain View, CA, Estados Unidos).

Se apreciará que cuando se expresa en sistemas de expresión eucariotas, tales como los que se han descrito anteriormente, la construcción de ácido nucleico incluye preferiblemente una secuencia codificadora de péptido señal de tal forma que los polipéptidos producidos a partir de las primera y segunda secuencias de ácido nucleico se dirigen a través del péptido señal unido en rutas de secreción. Por ejemplo, en células huésped de mamíferos, insectos y levadura, los polipéptidos expresados se pueden secretar al medio de crecimiento, mientras que en los sistemas de expresión de plantas, los polipéptidos se pueden secretar en el apoplasto, o dirigirse a un organelo subcelular.

Un huésped bacteriano se puede transformar con la secuencia de ácido nucleico a través de métodos de transformación bien conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, transformación química (por ejemplo,  $\text{CaCl}_2$ ) o electroporación.

25

Se conocen en la técnica numerosos ejemplos de sistemas de expresión bacterianos que pueden utilizarse para expresar las secuencias de ácido nucleico de la presente invención. Los sistemas de expresión bacterianos disponibles en el mercado incluyen, pero sin limitación, el sistema de expresión pET™ (Novagen®, EMB Biosciences, San Diego, CA, Estados Unidos), sistema de expresión pSE™ (Invitrogen™ Corporation, Carlsbad CA, Estados Unidos) o el sistema de expresión pGEX™ (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, Estados Unidos).

Como se describe adicionalmente en la sección de Detalles Experimentales que se indica a continuación, la expresión bacteriana es particularmente ventajosa puesto que los polipéptidos expresados forman cuerpos de inclusión sustancialmente puros fácilmente susceptibles a la recuperación y purificación del polipéptido expresado.

35

Por lo tanto, esta divulgación proporciona una preparación de cuerpos de inclusión expresados por bacterias que están compuestos por más del 30 %, preferiblemente más del 50 %, más preferiblemente más del 75 %, más preferiblemente más del 90 % en peso de la proteína de fusión o una mezcla de proteínas de fusión de la presente invención. El aislamiento de tales cuerpos de inclusión y la purificación de las proteínas de fusión de los mismos se describen en detalle en la sección de Detalles Experimentales que se indica a continuación. La expresión bacteriana de las proteínas de fusión puede proporcionar altas cantidades de formas puras y activas de proteínas de fusión.

Como se describe adicionalmente en la sección de Detalles Experimentales que se indica a continuación, las proteínas de fusión expresadas forman cuerpos de inclusión sustancialmente puros que se aíslan fácilmente a través de técnicas de fraccionamiento bien conocidas en la técnica y se purifican a través de, por ejemplo, etapas de desnaturalización-renaturalización.

45

Las proteínas de fusión de la divulgación se pueden renaturalizar y replegar en presencia de un péptido restringido por CMH que se enlaza a, se co-expresa con o se mezcla con otros polipéptidos de la invención y que es capaz de unir el polipéptido de CMH de clase I de cadena sencilla. Como se describe adicionalmente en la sección de ejemplos, esto permite generar un complejo CMH de clase I-péptido antigénico sustancialmente puro que puede purificarse adicionalmente a través de cromatografía de exclusión por tamaño.

Se apreciará que el péptido CMV usado para el repliegue se puede co-expresar junto con (como un péptido independiente) o se puede fusionar a la cadena scHLA-A2 de la molécula CMH clase I en la bacteria. En tal caso, la proteína de fusión y el péptido expresados forman conjuntamente cuerpos de inclusión que pueden aislarse y utilizarse para la formación de complejo CMH de clase I-péptido antigénico.

La siguiente sección proporciona ejemplos específicos para cada uno de los diversos aspectos de la invención

descritos en el presente documento. Estos ejemplos no se deberán considerar como limitantes en ningún modo, ya que la invención se pone en práctica en formas similares, aún un poco diferentes. Sin embargo, estos ejemplos muestran a un experto en la técnica cómo poner en práctica diversas alternativas y realizaciones de la invención.

- 5 Generalmente, la nomenclatura usada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook y col., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel y col., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson y col., "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren y col. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías como se expone en las Pat. de Estados Unidos N° 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volúmenes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" de Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Tercera Edición; "Current Protocols in Immunology" Volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites y col. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8ª Edición), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman y Co., Nueva York (1980); los inmunoensayos disponibles se describen extensamente en la bibliografía de patentes y científica, véase, por ejemplo, las Pat. de Estados Unidos N° 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.1901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak y col., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); a lo largo de este documento se proporcionan otras referencias generales. Se cree que los procedimientos en el presente documento se conocen bien en la técnica y se proporcionan para la comodidad del lector.

### 30 **Detalles Experimentales**

#### **Materiales y Métodos:**

#### **Clonación del Compuesto A**

- 35 El scHLA-A2/SS1 (scFv) se construyó como se ha descrito previamente enlazando el extremo C de scHLA-A2 al extremo N del SS1 scFv a través de un enlazador corto ASGG (SEC ID NO: 4) (15). Para construir el scHLA-A2/SS1 (scFv) con un péptido restringido por CMH unido covalentemente, el péptido restringido por CMH se fusionó con el péptido enlazador GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEC ID NO: 6) al extremo N de la molécula de scHLA-A2/SS1 (scFv) por una reacción de extensión de solapamiento de PCR con los cebadores: 5'M1-5'GGAAGCGTTGGCGCATATGGGCATTCTGGGCTTCGTGTTTACC CTGGGCGGAGGAGGATCCGGTGGCGGAGGTTTCAGGAGGCGGTGGATCGA TCCAGCGTACTCCAAAG3' (SEQ ID NO: 13) y 3'VLscSS1-5'GCAGTAAGGAATTCTCATTATTTTATTTCCAACCTTTGT3' (SEC ID NO: 14). En el cebador 5'M1 se insertó una mutación silenciosa en la secuencia enlazadora, este cambio en la secuencia crea un sitio de restricción BamH1.

Los productos de PCR se subclonaron a un vector de clonación TA (pGEM-T Easy Vector, Promega™ Corporation, Madison, WI, Estados Unidos) y posteriormente a un vector de expresión basado en el promotor T7 (PRB) usando los sitios de restricción NdeI y EcoRI.

- 50 Para generar el Compuesto A, se usó M1/scHLA-A2/SS1 (scFv) como un modelo para la ligación con el cebador dsADN. El M1/scHLA-A2/SS1 (scFv) (en plásmido PRB) se digirió con NdeI y BamH1, y la fracción plasmídica se ligó al cebador dsADN que contenía la secuencia peptídica CMV y la extensión de la secuencia enlazadora 5'CMVcovLL (casete) : 5'TATGAACCTGGTGCCGATGGTTCGCGACCGT TGGAGGTGGCGGTTCTGGCGGAGGAG-3' (SEQ ID NO: 15) y 3'CMVcovLL (casete): 5'GATC CTCCTCCGCCAGAACCGCCACCTCCAACGGTTCGCGACCATCGGCACCGGTTCA3'(SEQ ID NO-16). El apareamiento de los cebadores (5'CMVcovLL (casete) y 3'CMVcovLL (casete)) se realizó incubando los cebadores a 95 °C durante 2 min seguido de 1 h de incubación a temperatura ambiente. El producto de ligación se transformó a E-coli DH5α para amplificación plasmídica. El plásmido se purificó por el kit QIAGEN® miniprep (Qiagen®, Inc.,

Valencia, CA, Estados Unidos) y las muestras de ajustaron para el análisis de secuencia.

### Repliegue de expresión y purificación del Compuesto A

- 5 El compuesto A se expresó en células E-coli LB21 ( $\lambda$ DE3) (Novagen®, Madison, WI, Estados Unidos) como cuerpos de inclusión. La construcción del compuesto A se transformó a células E-coli por choque de calor, las células se colocaron en placas LBAMP y se incubaron durante una noche a 37 °C. Las colonias se transfirieron a un medio rico (súper caldo) complementado con glucosa, MgSO<sub>4</sub>, AMP y sales. Las células crecieron a DO = 2 (600 nm) a 37 °C, se indujeron con IPTG (concentración final 1 mM) y se incubaron durante 3 h más a 37 °C.
- 10 Los cuerpos de inclusión se purificaron a partir de gránulos de células por interrupción celular con 0,2 mg/ml de lisozima seguido de la adición de Triton® X-100 al 2,5 % (Octilfenolpoli[etilenglicoléter]<sub>x</sub>, Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Mannheim, Alemania) y NaCl 0,5 M. Los gránulos de los cuerpos de inclusión se recolectaron por centrifugación (13.000 rpm, 60 min a 4 °C) y se lavaron tres veces con tampón Tris 50, pH 7,4 que
- 15 contenía EDTA 20 mM. Los cuerpos de inclusión aislados y purificados se solubilizaron en Guanidina HCl 6 M, pH 7,4 seguido de reducción con DTE 65 mM. Los cuerpos de inclusión solubilizados y reducidos se replegaron mediante una dilución 1:100 en un sistema tampón de intercambio redox que contenía Tris 0,1 M, EDTA 0,001 M, Arginina 0,5 M y Glutatión oxidado 0,09 mM, pH 9, e incubación a 10 °C durante 24 h. Después del repliegue, la proteína se dializó frente a Urea 150 mM, Tris 20 mM, pH 8, seguido de la purificación del Compuesto A soluble por
- 20 cromatografía de intercambio iónico en una columna Q-Sepharose® (7,5 mm D.I. 60 cm) (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, Estados Unidos), aplicando un gradiente de sal (NaCl). Después, las fracciones pico que contenían el compuesto A se sometieron a intercambio de tampón con PBS. Los protocolos de expresión y purificación de la proteína de fusión M1-cov/scHLA-A2/SS1 (scFv) fueron idénticos a los protocolos de expresión y purificación del Compuesto A. Todos los métodos usados para analizar las propiedades bioquímicas y biológicas de la proteína de
- 25 fusión M1-cov/scHLA-A2/SS1 (scFv) fueron idénticos a los métodos usados para analizar la actividad del Compuesto A.

### Citometría de Flujo

- 30 Las células se incubaron con el Compuesto A (60 min a 4 °C en 100  $\mu$ l, 10  $\mu$ g/ml), se lavaron y se incubaron con MAb anti-HLA-A2 BB7.2 (60 min a 4 °C, 10  $\mu$ l/min). Las células se lavaron y se incubaron con FITC anti-ratón (60 min a 4 °C, 10  $\mu$ l/ml) que sirvió como un anticuerpo secundario. Las células se lavaron y se analizaron posteriormente por un citómetro de flujo de calibre FACS (Becton-Dickinson, San José, CA, Estados Unidos).

### 35 Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas

- Las inmunoplasmas (Falcon®, Becton-Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos) se cubrieron con 10  $\mu$ g/ml de mesotelina recombinante purificada producida por bacterias (durante una noche a 4 °C). Las placas se bloquearon con PBS que contenía leche desnatada al 2 %, después se incubaron con diversas concentraciones del
- 40 Compuesto A (60 min a TA) y se lavaron tres veces con PBS. La unión se detectó usando el anticuerpo anti-HLA conformacional dependiente W6/32 (60 min, TA, 1  $\mu$ g/ml), las placas se lavaron tres veces con PBS y se incubaron con IgG-peroxidasa anti-ratón (60 min, TA, 1  $\mu$ g/ml). La reacción se desarrolló usando TMB (DAKO) y se terminó por la adición de 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N. Se usó anticuerpo anti-mesotelina (K1) como control positivo. Las inmunoplasmas se analizaron por un lector de ELISA usando un filtro de 450 nm (Anthos 2001™, Anthos Labtech, Salzburg, Austria).

45

### Ensayos de citotoxicidad

- La citotoxicidad se determinó por ensayos de liberación de S<sup>35</sup>-metionina. Las células diana se cultivaron en placas de cultivo en RPMI FCS al 10% Metionina libre durante 2 h seguido de incubación durante una noche con 15  $\mu$ Ci/ml
- 50 de S<sup>35</sup>-metionina (NEN). Las células diana se cosecharon por tripsinización y se lavaron dos veces con 40 ml de RPMI FCS al 10%. Las células diana se colocaron en placas en placas de 96 pocillos (5 x 10<sup>3</sup> células por pocillo) en RPMI+FCS al 10% y se incubaron durante una noche a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %. Las células diana se incubaron con diferentes concentraciones de las proteínas de fusión del Compuesto A durante 2 h, se añadieron células CTL efectoras en diferentes relaciones de diana:efector y las placas se incubaron durante 8-12 h a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %.
- 55 Después de la incubación, la liberación de S<sup>35</sup>-metionina de las células diana se midió en una muestra de 25  $\mu$ l del sobrenadante de cultivo. Todos los ensayos se realizaron por triplicado, la lisis se calculó directamente: ([liberación experimental liberación espontánea]/[liberación máxima - liberación espontánea]) x 100. La liberación espontánea se midió como la S<sup>35</sup>-metionina liberada de las células diana en ausencia de células efectoras, y la liberación máxima

se midió como la S<sup>35</sup>-metionina liberada de las células diana lisadas por NaOH 0,05 M.

### Líneas Celulares

- 5 Las células A431 y A431K5 (carcinoma epidermoide) se mantuvieron en medio RPMI que contenía PCS al 10%, L-glutamina y penicilina/estreptomicina. La línea celular A431K5 es una línea celular A431 de carcinoma epidermoide humana transfectada de forma estable con Mesotelina, las células transfectadas se mantuvieron con 700 µg/ml de G418 (Gibco-BRL®, Invitrogen™ Inc., Carlsbad, CA, Estados Unidos).
- 10 Las CTL con especificidad para epítipo CMV pp65 (NLVPMVATV) se proporcionaron amablemente por el Dr. Ditmar Zehn (Charitee, Berlín). Los CTL se expandieron por incubación con PBMC radiadas (4000 rad), pulsadas con péptido de un donante positivo a HLA-A2 sano y se mantuvieron y se mantuvieron en medio AIMV + FCS al 8,9 % + 2-mercaptoetanol 50 µM + penicilina/estreptomicina 1 x 10<sup>5</sup> U/L.

### 15 Resultados:

#### Construcción del Compuesto A

- Una construcción que codifica una molécula CMH de cadena sencilla compuesta del gen β2 microglobulina fusionado al α1, α2 y α3 del gen HLA-A2 a través de un enlazador peptídico corto (15 aminoácidos) se fusionó a la scFv SS1 que se dirige a la mesotelina (figura 1A). Esta construcción se analizó en detalle para evaluar su actividad bioquímica y biológica y se descubrió que era funcional *in vitro* e *in vivo* (15). Para construir una proteína de fusión con un péptido unido covalentemente, un péptido de 9 aminoácidos obtenido a partir de la proteína CMV pp65 (NLVPMVATV) (SEC ID NO: 4) se fusionó al extremo N de la proteína de fusión scHLA-A2/SS1 (scFv) a través de un enlazador de 20 aminoácidos GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEC ID NO: 6) (figura 1B). El compuesto A se construyó en dos etapas: En primer lugar, una proteína de fusión covalente denominada MI/scHLA-A2/SS1 (scFv) se construyó por PCR de extensión de solapamiento. En esta construcción el péptido de influenza M158-66 GILGFVFTL (SEC ID NO: 21) y un enlazador de 15 aminoácidos se fusionaron al extremo N de la proteína de fusión scHLA-A2/SS1 (scFv). En esta construcción, un nuevo sitio de restricción único (BamH1) se insertó a la secuencia enlazadora por una mutación silenciosa. En la segunda etapa, el plásmido PRB que contenía la secuencia completa de MI/scHLA-A2/SS1 (scFv) se digirió con enzimas de restricción NdeI y BamHI. Esta digestión produjo dos fragmentos. Un fragmento contiene el péptido y parte de la secuencia enlazadora, y el segundo fragmento contiene el plásmido, parte del enlazador y la secuencia de scHLA-A2/SS1 (scFv). Después, el fragmento que contiene el plásmido, parte del enlazador y la secuencia de scHLA-A2/SS1 (scFv) se ligó al cebador dsADN que codifica la secuencia peptídica CMV pp65 y una extensión de la secuencia enlazadora (figura 1B). El nuevo plásmido se transformó en células E-coli DH5α y las colonias positivas se enviaron a la secuenciación de ADN (figura 2).

#### Expresión y purificación del Compuesto A

- 40 El compuesto A se expresó en células E. coli BL21 y, tras la inducción con isopropil β-D-tiogalactósido, se acumularon grandes cantidades de proteína recombinante en los cuerpos de inclusión intracelulares. El análisis SDS/PAGE de los cuerpos de inclusión aislados y purificados reveló que el Compuesto A con el tamaño correcto constituyó el 80-90% de la masa de los cuerpos de inclusión total (figura 3A). Los cuerpos de inclusión solubilizados aislados se redujeron y replegaron *in vitro* en un tampón de intercambio redox. Las proteínas de fusión solubles monoméricas (Compuesto A) se purificaron por cromatografía de intercambio iónico en Q-sepharose®. El análisis SDS/PAGE del Compuesto A reveló una molécula monomérica altamente purificada con el tamaño esperado de 72 KDa (figura 3B).

#### Actividad biológica del Compuesto A

### 50 ELISA

- Para ensayar la capacidad de enlace del Compuesto A purificado a su antígeno diana, la mesotelina recombinante se inmovilizó en inmunoplaacas. El enlace del Compuesto A se controló usando mAb W6/32 sensible a conformación, este anticuerpo reconoce las moléculas CMH que se pliegan correctamente con un péptido en su surco. Como se muestra en la figura 4, la unión del Compuesto A a mesotelina recombinante dependía de la dosis. Esto sugiere que los dos dominios funcionales del Compuesto A, el dominio scFv (SS1) y el dominio péptido/scHLA-A2 se pliegan correctamente. Además, el dominio scFv (SS1) de la proteína de fusión está en forma activa y puede unir específicamente mesotelina.

### Análisis de citometría de flujo (FACS)

Para ensayar la capacidad de unión del Compuesto A, a líneas celulares que expresan mesotelina, se hizo el análisis FACS. Como modelo, se usaron células diana que son negativas a HLA-A2, por lo tanto, la reactividad de un mAB anti-HLA-A2 se puede usar para medir la unión del compuesto A a células que expresan mesotelina en su superficie. Este modelo de células negativas a HLA-A2-positivas a mesotelina representa el caso extremo en el que las células tumorales pierden su expresión de HLA. Por lo tanto, para el análisis FACS, se usaron células A431K5 negativas a HLA-A2, que son células A431 de carcinoma epidermoide humano que se transfectaron de forma estable con mesotelina. Las células de carcinoma epidermoide humana A431 parentales que son negativas a mesotelina y negativas a HLA-A2 se usan como control negativo. La unión del Compuesto A a las células diana se controló con mAB BB7.2 anti-HLA-A2 como anticuerpo primario seguido de un anticuerpo secundario marcado con FITC. Se usó mesotelina anti-mAb K1 para ensayar los niveles de expresión de mesotelina. Como se muestra en la figura 5A, las células A431K5 expresan altos niveles de mesotelina, mientras que las células A431 parentales no expresan el antígeno diana. Las líneas celulares A431 y A431K5 también se ensayaron para obtener la expresión de HLA-A2 usando anticuerpo específico de HLA-A2 (BB7.2), ambas líneas celulares fueron negativas a HLA-A2. Sin embargo, cuando las células A431K5 se incubaron previamente con el Compuesto A, se tiñeron positivamente con el anticuerpo BB7.2 específico de HLA-A2 (figura 5B). Las células A431 negativas a antígeno no se afectaron. La unión específica del Compuesto A a A431K5, pero no a las células A431, indica adicionalmente que la unión depende exclusivamente de la interacción del dominio scFv diana de la fusión con mesotelina y que la proteína de fusión puede unir su antígeno diana como se expresó de forma nativa en la superficie de células.

### Ensayo de Citotoxicidad

Para ensayar la capacidad del Compuesto A para mediar la eliminación de las células positivas a mesotelina, negativas a HLA-A2 por CTL específicos de CMV pp65 NLVPMVATV (SEC ID NO: 4) restringidas por HLA-A2, se realizó el ensayo de liberación de S<sup>35</sup>-metionina usando células A431K5 transfectadas con mesotelina negativas a HLA-A2, y las células parentales A431 negativas a mesotelina, negativas a HLA-A2. Para determinar la eliminación potencial de los CTL específicos de CMV, el ensayo de citotoxicidad se realizó usando células JY positivas a HLA-A2 que se radiomarcaron con MetS<sup>35</sup> y se cargaron con el péptido de CMV NLVPMVATV. La eliminación específica media de las células JY por los CTL específicos de CMV fue del 47 % con una relación E:T de 10:1 (datos no mostrados). Como se muestra en la figura 6a, el Compuesto A medió de forma eficaz la eliminación de las células A431K5 (negativas a HLA-A2, positivas a mesotelina). La eliminación específica podrá alcanzar el 66 % en comparación con las células JY cargadas con péptido. Por lo tanto, la eliminación con la proteína de fusión fue incluso más eficaz en comparación con las células que presentan antígeno pulsado con péptido, que representan dianas óptimas. Sin embargo, cuando las células A431K5 diana se incubaron con los CTL específicos de CMV en solitario sin incubación previa con el Compuesto A, o cuando las células diana eran células A431 negativas a mesotelina con o sin incubación previa con el Compuesto A, no se observó actividad citotóxica. A continuación, se realizó un experimento de titulación para determinar la potencia del Compuesto A, como se muestra en la figura 6b, la eliminación de las células A431K5 positivas a mesotelina fue dependiente de la dosis con un CI50 de 0,5-1 µg/ml.

Estos resultados indican que la eliminación de las células A431K5 negativas a HLA-A2, positivas a mesotelina fue específica y se controló por el reconocimiento de mesotelina por el dominio de diana del Compuesto A (scFv/SS1) y la especificidad de los CTL de CMV para el dominio de péptido/scHLA-A2.

Este estudio demuestra que la capacidad de dirigir la proteína de fusión péptido unido covalentemente/scMHC/scFv a células tumorales puede convertir a las células negativas a HLA-A2 susceptibles a lisis por los CTL restringidos por HLA-A2 relevantes. Como se ha mostrado previamente por Lev y col., y Oved y col. (15, 21), esta estrategia tiene dos ventajas principales. En primer lugar, aprovecha el uso de fragmentos Ab recombinantes que pueden localizarse en estas células malignas que expresan un marcador tumoral, que se asocian normalmente con el fenotipo transformado (tal como receptores del factor de crecimiento y/o antígenos de diferenciación), con un grado relativamente alto de especificidad. En segundo lugar, esta estrategia tiene la capacidad de reclutar una población particular de linfocitos T citotóxicos altamente reactivos específicos para un epítipo de péptido altamente antigénico preseleccionado presente en el complejo CMH-péptido dirigido, tal como epítopes de linfocitos T específicos virales. Este enfoque de plataforma genera múltiples moléculas con muchos fragmentos scFv específicos de tumor que dirigen diversos antígenos específicos de tumor, combinados con la capacidad de dirigir muchos tipos de complejos CMH-péptido que llevan péptidos únicos, preseleccionados, y altamente antigénicos obtenidos a partir de epítopes de linfocitos T tumores, víricos o bacterianos. Estos ejemplos presentan una estrategia de un paso más allá fusionando el péptido de 9 aminoácidos enlazado a un enlazador corto (20AA) a la proteína de fusión scHLA-

A2/scFv (15AA) que se ha indicado previamente, y consiguiendo así, la estabilización del péptido en el surco de CMH prolongando la estabilidad general de las proteínas de fusión. Como modelo para esta nueva generación de proteínas de fusión, la presente invención se refiere a la construcción de una proteína de fusión en la que CMV pp65 derivada (NLVPMVATV) se fusiona al extremo N de la molécula scHLA-A2/SS1 (scFv) y sus características bioquímicas y biológicas. Se muestra que los dos dominios de la nueva proteína de fusión pueden replegarse *in vitro* para formar moléculas correctamente plegadas con el péptido dentro del surco de HLA-A2 y un dominio de dirección activo (scFv) que puede unirse específicamente a su antígeno diana. Además, esta proteína de fusión ha mediado exitosamente la lisis de células tumorales negativas a HLA-A2, positivas a mesotelina por CTL restringidos por HLA-A2.

La progresión tumoral se asocia con frecuencia a la secreción de factores inmunosupresores y/o la regulación descendente de las funciones de presentación de antígeno de CMH de clase I (2). Incluso cuando se demuestra una respuesta de CTL específica en los pacientes, esta respuesta es baja porque la población de CTL antitumor es rara, muy infrecuente, y en algunos casos los CTL no son funcionales o son anérgicos (26). Además, está bien establecido que el número de complejos CMH-péptido en la superficie de células tumorales que presentan un péptido asociado a tumor particular es bajo (27). Como se muestra en el presente documento, la nueva estrategia supera estos problemas. En primer lugar, las células tumorales están cubiertas con complejos CMH-péptido independientes de su expresión CMH endógena. En segundo lugar, el uso de antígenos específicos de tumor que normalmente son parte del fenotipo de tumor (tal como receptores del factor de crecimiento y antígenos de diferenciación) impide la regulación descendente de los antígenos y prolongan la eficiencia del tratamiento. En tercer lugar, y más importante, el dominio del efector de la proteína de fusión del complejo CMH-péptido puede reclutar poblaciones específicas de CTL que dependen del péptido que alberga el surco de CMH.

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

#### Referencias citadas

1. Gilboa, E. How tumors escape immune destruction and what we can do about it. *Cancer Immunol. Immunother.* 48, 382-385 (1999).
2. Seliger, B., Maeurer, M.J., & Ferrone, S. Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth. *Immunol. Today* 21, 455-464 (2000).
3. García-Lora, A., Algarra, I., & Garrido, F. MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. *J. Cell Physiol* 195, 346-355 (2003).
4. Garrido, F. & Algarra, I. MHC antigens and tumor escape from immune surveillance. *Adv. Cancer Res.* 83, 117-158 (2001).
5. McLaughlin, P. y col. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J. Clin. Oncol.* 16, 2825-2833 (1998).
6. Cobleigh, M.A. y col. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J. Clin. Oncol.* 17, 2639-2648 (1999).
7. Pastan, I. & Kreitman, R.J. Immunotoxins in cancer therapy. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3, 1089-1091 (2002).
8. Boon, T. & van der, B.P. Human tumor antigens recognized by T-lymphocytes. *J. Exp. Med.* 183, 725-729 (1996).
9. Esche, C., Shurin, M.R., & Lotze, M.T. The use of dendritic cells for cancer vaccination. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 1, 72-81 (1999).
10. Offringa, R., van der Burg, S.H., Ossendorp, F., Toes, R.E., & Melief, C.J. Design and evaluation of antigen-specific vaccination strategies against cancer. *Curr. Opin. Immunol.* 12, 576-582 (2000).
11. Wang, E., Phan, G.Q., & Marincola, F.M. T-cell-directed cancer vaccines: the melanoma model. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 1, 277-290 (2001).
12. Dudley, M.E. y col. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 298, 850-854 (2002).
13. Dudley, M.E. & Rosenberg, S.A. Adoptive-cell-transfer therapy for the treatment of patients with cancer. *Nat. Rev. Cancer* 3, 666-675 (2003).
14. Rosenberg, S.A. Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature* 411, 380-384 (2001).



15. Lev, A. y col. Tumor-specific Ab-mediated targeting of MHC-peptide complexes induces regression of human tumor xenografts in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 9051-9056 (2004).
16. Donda, A. y col. In vivo targeting of an anti-tumor antibody coupled to antigenic MHC class I complexes induces specific growth inhibition and regression of established syngeneic tumor grafts. *Cancer Immun.* 3, 11 (2003).
17. Ogg, G.S. y col. Sensitization of tumour cells to lysis by virus-specific CTL using antibody-targeted MHC class I/peptide complexes. *Br. J. Cancer* 82, 1058-1062 (2000).
18. Robert, B., Guillaume, P., Luescher, I., Romero, P., & Mach, J.P. Antibody-conjugated MHC class I tetramers can target tumor cells for specific lysis by T-lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 30, 3165-3170 (2000).
19. Robert, B. y col. Redirecting anti-viral CTL against cancer cells by surface targeting of monomeric MHC class I-viral peptide conjugated to antibody fragments. *Cancer Immun.* 1, 2 (2001).
20. Savage, P. y col. Anti-viral cytotoxic T-cells inhibit the growth of cancer cells with antibody targeted HLA class I/peptide complexes in SCID mice. *Int. J. Cancer* 98, 561-566 (2002).
21. Oved, K., Lev, A., Noy, R., Segal, D., & Reiter, Y. Antibody-mediated targeting of human single-chain class I MHC with covalently linked peptides induces efficient killing of tumor cells by tumor or viral-specific cytotoxic T-lymphocytes. *Cancer Immunol. Immunother.* 54, 867-879 (2005).
22. Chang, K. & Pastan, I. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding a protein detected by the K1 antibody from an ovarian carcinoma (OVCAR-3) cell line. *Int. J. Cancer* 57, 90-97 (1994).
23. Chang, K. & Pastan, I. Molecular cloning of mesothelin, a differentiation antigen present on mesothelium, mesotheliomas, and ovarian cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 136-140 (1996).
24. Chang, K. & Pastan, I. Molecular cloning of mesothelin, a differentiation antigen present on mesothelium, mesotheliomas, and ovarian cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 136-140 (1996).
25. Hassan, R., Bera, T., & Pastan, I. Mesothelin: a new target for immunotherapy. *Clin. Cancer Res.* 10, 3937-3942 (2004).
26. Lee, P.P. y col. Characterization of circulating T-cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients. *Nat. Med.* 5, 677-685 (1999).
27. Christinck, E.R., Luscher, M.A., Barber, B.H., & Williams, D.B. Peptide binding to class I MHC on living cells and quantitation of complexes required for CTL lysis. *Nature* 352, 67-70 (1997).
28. Jain, R.K. Transport of molecules, particles, and cells in solid tumors. *Annu. Rev. Biomed. Eng* 1, 241-263 (1999).
29. Bromley, S.K. y col. The immunological synapse. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 375-396 (2001).
30. Lanzavecchia, A., Lezzi, G., & Viola, A. From TCR engagement to T-cell activation: a kinetic view of T-cell behavior. *Cell* 96, 1-4 (1999).
31. Chang, K., Pastan, I. & Willingham, M. C. Isolation and characterization of a monoclonal antibody, K1, reactive with ovarian cancers and normal mesothelium. *Int. J. Cancer* 50, 373-381 (1992).
32. Chang, K., Pai, L. H., Batra, J. K., Pastan, I. & Willingham, M. C. Characterization of the antigen (CAK1) recognized by monoclonal antibody K1 present on ovarian cancers and normal mesothelium. *Cancer Res.* 52, 181-186 (1992).
33. Parham, P., Barnstable, C. J. & Bodmer, W. F. Use of a monoclonal antibody (W6/32) in structural studies of HLA-A,B,C, antigens. *J. Immunol.* 123, 342-349 (1979).
34. Shields, M. J. & Ribaldo, R. K. Mapping of the monoclonal antibody W6/32: sensitivity to the extreme amino of beta2-microglobulin. *Tissue Antigens* 51, 567-570 (1998).
35. Parham, P. & Brodsky, F. M. Partial purification and some properties of BB7.2. A cytotoxic monoclonal antibody with specificity for HLA-A2 and a variant of HLA-A28. *Hum. Immunol.* 3, 277-299 (1981).

#### LISTA DE SECUENCIAS

<110> Teva Pharmaceutical Industries, Ltd. Teva Pharmaceuticals USA, Inc. Technion Research and Development Foundation Ltd.

<120> Proteínas de fusión, usos de las mismas y procesos para producir las mismas

<130> 76322-PCT/JPW/YC

<150> us 60/801.798

<151> 19/05/2006

<160> 23

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 1995

5 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de fusión del Compuesto A

10

<400> 1

```

atgaacctgg tgccgatggt cgcgaccgtt ggaggtggcg gttctggcgg aggaggatcc      60
ggtggcggag gttcaggagg cgttgatcg atccagcgta ctccaaagat tcagggtttac      120
tcacgtcatc cagcagagaa tggaaagtca aatttcctga attgctatgt gtctgggttt      180
catccatccg acattgaagt tgacttactg aagaatggag agagaattga aaaagtggag      240
cattcagact tgtctttttc gaaggactgg tctttctatc tcttgacta cactgaattc      300
acccccactg aaaaagatga gtatgcctgc cgtgtgaacc atgtgacttt gtcacagccc      360
aagatagtta agtgggatcg cgacatgggt ggcggtggaa gcggcggtgg aggctctggt      420
ggaggtggca gcggtctca ctccatgagg tatctcttca catccgtgtc ccggcccggc      480
cgcggggagc cccgcttcat cgcagtgggc tacgtggacg acacgcagtt cgtgcggttc      540
gacagcgacg ccgcgagcca gaggatggag ccgcgggcgc cgtggataga gcaggagggt      600
ccggagtatt gggacgggga gacacggaaa gtgaaggccc actcacagac tcaccgagtg      660
gacctgggga ccctgcgcgg ctactacaac cagagcgagg ccggttctca caccgtccag      720
aggatgtatg gctgcgacgt ggggtcggac tggcgcttcc tccgcgggta ccaccagtac      780
gcgtacgacg gcaaggatta catcgccctg aaagaggacc tgcgctcttg gaccgcggcg      840
gacatggcag ctacagaccac caagcacaag tgggaggcgg cccatgtagc ggagcagttg      900
agagcctacc tggagggcac gtgcgtggag tggctccgca gatacctgga gaacgggaag      960
gagacgtgc agcgcacgga cgcctccaaa acgcacatga ctaccacgc tgtctctgac     1020
catgaagcca ccctgagggtg ctgggccctg agcttctacc ctgcggagat cactgacc     1080
tggcagcggg atggggagga ccagaccag gacacggagc tcgtggagac aaggcctgca     1140
ggggatggaa ccttcagaa gtgggcggct gtggtggtgc cttctggaca ggagcagaga     1200
tacacctgcc atgtgcagca tgagggtttg cccaagcccc tcacctgag atgggaggct     1260
tccggaggtc aggtacaact gcagcagttc gggcctgagc tggagaagcc tggcgcttca     1320

```

gtgaagatat cctgcaaggc ttctggttac tcattcactg gctacacccat gaactgggtg 1380  
aagcagagcc atggaaagag ccttgagtgg attggactta ttactcctta caatggtgct 1440  
tctagctaca accagaagtt caggggcaag gccacattaa ctgtagacaa gtcacccagc 1500  
acagcctaca tggacctcct cagtctgaca tctgaagact ctgcagtcta tttctgtgca 1560  
aggggggggtt acgacgggag ggggttttgac tactggggcc aaggggaccac ggtcacccgtc 1620  
tcctcaggtg taggcggttc aggcggcggt ggctctggcg gtggcggatc ggacatcgag 1680  
ctcactcagt ctccagcaat catgtctgca tctccagggg agaaggtcac catgacctgc 1740  
agtgccagct caagtgtgag ttacatgcac tgggtaccagc agaagtcagg cacctcccc 1800  
aaaagatgga tttatgacac atccaaactg gcttctggag tcccaggctc cttcagtggc 1860  
agtgggtctg gaaactctta ctctctcaca atcagcagcg tggaggctga agatgatgca 1920  
acttattact gccagcagtg gagtaagcac cctctcacgt tcggtgctgg gacaaagttg 1980  
gaaataaaat aatga 1995

<210> 2

<211> 663

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de fusión del Compuesto A

10

<400> 2

Met Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
1 5 10 15  
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ile Gln  
20 25 30  
Arg Thr Pro Lys Ile Gln Val Tyr Ser Arg His Pro Ala Glu Asn Gly  
35 40 45  
Lys Ser Asn Phe Leu Asn Cys Tyr Val Ser Gly Phe His Pro Ser Asp  
50 55 60  
Ile Glu Val Asp Leu Leu Lys Asn Gly Glu Arg Ile Glu Lys Val Glu  
65 70 75 80  
His Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys Asp Trp Ser Phe Tyr Leu Leu Tyr  
85 90 95  
Tyr Thr Glu Phe Thr Pro Thr Glu Lys Asp Glu Tyr Ala Cys Arg Val  
100 105 110  
Asn His Val Thr Leu Ser Gln Pro Lys Ile Val Lys Trp Asp Arg Asp  
115 120 125  
Met Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

| 130                                                                             | 135 | 140 |
|---------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|
| Gly 145 Ser His Ser Met Arg 150 Tyr Phe Phe Thr Ser 155 Val Ser Arg Pro Gly 160 |     |     |
| Arg Gly Glu Pro Arg 165 Phe Ile Ala Val Gly 170 Tyr Val Asp Asp Thr 175 Gln     |     |     |
| Phe Val Arg Phe 180 Asp Ser Asp Ala 185 Ser Gln Arg Met Glu 190 Pro Arg         |     |     |
| Ala Pro Trp 195 Ile Glu Gln Glu Gly 200 Pro Glu Tyr Trp Asp 205 Gly Glu Thr     |     |     |
| Arg Lys 210 Val Lys Ala His Ser 215 Gln Thr His Arg Val 220 Asp Leu Gly Thr     |     |     |
| Leu 225 Arg Gly Tyr Tyr Asn 230 Gln Ser Glu Ala Gly 235 Ser His Thr Val Gln 240 |     |     |
| Arg Met Tyr Gly Cys 245 Asp Val Gly Ser Asp 250 Trp Arg Phe Leu Arg Gly 255     |     |     |
| Tyr His Gln Tyr 260 Ala Tyr Asp Gly Lys 265 Asp Tyr Ile Ala Leu 270 Lys Glu     |     |     |
| Asp Leu Arg 275 Ser Trp Thr Ala 280 Asp Met Ala Ala Gln 285 Thr Thr Lys         |     |     |
| His Lys 290 Trp Glu Ala Ala His 295 Val Ala Glu Gln Leu 300 Arg Ala Tyr Leu     |     |     |
| Glu 305 Gly Thr Cys Val Glu 310 Trp Leu Arg Arg Tyr 315 Leu Glu Asn Gly Lys 320 |     |     |
| Glu Thr Leu Gln Arg 325 Thr Asp Ala Pro Lys 330 Thr His Met Thr His 335 His     |     |     |
| Ala Val Ser Asp 340 His Glu Ala Thr Leu 345 Arg Cys Trp Ala Leu 350 Ser Phe     |     |     |
| Tyr Pro Ala 355 Glu Ile Thr Leu Thr 360 Trp Gln Arg Asp Gly 365 Glu Asp Gln     |     |     |
| Thr Gln 370 Asp Thr Glu Leu Val 375 Glu Thr Arg Pro Ala 380 Gly Asp Gly Thr     |     |     |
| Phe 385 Gln Lys Trp Ala Ala 390 Val Val Val Pro Ser 395 Gly Gln Glu Gln Arg 400 |     |     |
| Tyr Thr Cys His Val 405 Gln His Glu Gly Leu 410 Pro Lys Pro Leu Thr 415 Leu     |     |     |

Arg Trp Glu Ala Ser Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro  
420 425 430

Glu Leu Glu Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser  
435 440 445

Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His  
450 455 460

Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Leu Ile Thr Pro Tyr Asn Gly Ala  
465 470 475 480

Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp  
485 490 495

Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Asp Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu  
500 505 510

Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Gly Arg Gly  
515 520 525

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Val  
530 535 540

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu  
545 550 555 560

Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val  
565 570 575

Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr  
580 585 590

Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser  
595 600 605

Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Gly Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly  
610 615 620

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

Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Lys His Pro Leu Thr Phe Gly Ala  
645 650 655

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
660

<210> 3

<211> 27

5 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> péptido CMV

10

<400> 3

aacctggtgc cgatggtcgc gaccgtt 27

<210> 4  
<211> 9  
5 <212> PRT  
<213> secuencia artificial

<220>  
<223> péptido CMV

10 <400> 4

Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val  
1 5

<210> 5  
15 <211> 60  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial

<220>  
20 <223> enlazador peptídico 20-aa

<400> 5  
60 ggaggtggcg gttctggcgg aggaggatcc ggtggcggag gtcaggagg cgttggatcg

25 <210> 6  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> secuencia artificial

30 <220>  
<223> enlazador peptídico 20-aa

<400> 6

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser  
20

35 <210> 7  
<211> 45  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial

40 <220>  
<223> enlazador peptídico 15-aa

<400> 7  
45 45 ggtggcgggtg gaagcggcgg tggaggctct ggtggaggtg gcagc

<210> 8  
<211> 15  
<212> PRT  
50 <213> secuencia artificial

<220>  
<223> enlazador peptídico 15-aa

<400> 8

Gly Gly Gly Gly ser Gly Gly Gly Gly ser Gly Gly Gly Gly ser  
1 5 10 15

<210> 9

5 <211> 12

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

10 <223> enlazador peptídico 4-aa

<400> 9

12 gcttccggag gt

15 <210> 10

<211> 4

<212> PRT

<213> secuencia artificial

20 <220>

<223> enlazador peptídico 4-aa

<400> 10

Ala ser Gly Gly  
1

25

<210> 11

<211> 726

<212> ADN

<213> secuencia artificial

30

<220>

<223> SS1

<400> 11

|                                                                     |     |
|---------------------------------------------------------------------|-----|
| cagggtacaac tgcagcagtc tgggcctgag ctggagaagc ctggcgcttc agtgaagata  | 60  |
| tcctgcaagg cttctggtta ctcattcact ggctacacca tgaactgggt gaagcagagc   | 120 |
| catggaaaga gccttgagtg gattggactt attactcctt acaatgggtgc ttctagctac  | 180 |
| aaccagaagt tcagggggcaa ggccacatta actgtagaca agtcattccag cacagcctac | 240 |
| atggacctcc tcagtctgac atctgaagac tctgcagtct atttctgtgc aagggggggt   | 300 |
| tacgacggga ggggttttga ctactggggc caagggacca cggtcaccgt ctcttcaggt   | 360 |
| gtaggcggtt caggcggcgg tggctctggc ggtggcggat cggacatcga gctcactcag   | 420 |
| tctccagcaa tcatgtctgc atctccaggg gagaagggtca ccatgacctg cagtgccagc  | 480 |
| tcaagtgtaa gttacatgca ctggtaccag cagaagtcag gcacctcccc caaaagatgg   | 540 |
| atttatgaca catccaaact ggcttctgga gtcccagggtc gcttcagtgg cagtgggtct  | 600 |
| ggaaactctt actctctcac aatcagcagc gtggaggctg aagatgatgc aacttattac   | 660 |
| tgccagcagt ggagtaagca cctctctacg ttcggtgctg ggacaaagt ggaaataaaa    | 720 |
| taatga                                                              | 726 |

35

<210> 12

<211> 240

<212> PRT  
<213> secuencia artificial

<220>

5 <223> SS1

<400> 12

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

10

<210> 13  
<211> 109  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial

15

<220>  
<223> Cebador PCR



<400> 13  
**ggaagcggtg gcgcatatgg gcattctggg cttcgtgttt accctgggcg gaggaggatc 60**  
**cggtagcgga ggttcaggag gcggtggatc gatccagcgt actccaaag 109**

5 <210> 14  
 <211> 38  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Cebador PCR

<400> 14  
 38 gcagtaagga attctatta tttatttcc aactttgt

15 <210> 15  
 <211> 56  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Cebador PCR

<400> 15  
 25 56 tatgaacctg gtgccgatgg tcgcgaccgt tggagggtgc ggttctggcg gaggag

<210> 16  
 <211> 58  
 <212> ADN

30 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador PCR

35 <400> 16  
 58 gatcctctc cgccagaacc gccacctcca acggtcgga ccatcggcac caggttca

<210> 17  
 <211> 108  
 40 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador PCR

45 <400> 17  
**ggaagcggtg gcgcatatga tcatggacca ggttcggtc tctgttggcg aggagggtcc 60**  
**ggtggcggag gttcaggagg cggtaggatc atccagcgt ctccaaag 108**

<210> 18  
 50 <211> 38  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 55 <223> Cebador PCR

<400> 18  
38 gcagtaagga attctcatta tttatttcc aactttgt

<210> 19  
5 <211> 15  
<212> PRT  
<213> secuencia artificial

<220>  
10 <223> enlazador peptídico

<400> 19  
1 gly val gly gly ser gly gly gly gly ser gly gly gly gly ser 15  
5 10

15 <210> 20  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> secuencia artificial

20 <220>  
<223> Monómero de enlazador peptídico

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
25 <223> x = cualquier aminoácido

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (2)..(2)  
30 <223> xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 20  
1 gly xaa gly gly ser 5

35 <210> 21  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> secuencia artificial

40 <220>  
<223> enlazador peptídico

<400> 21  
1 gly ile leu gly phe val phe thr leu 5

45  
<210> 22  
<211> 1980  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial

50  
<220>  
<223> Proteína de fusión del Compuesto B

<400> 22

```

atgaacctgg tgcgatggt cgcgaccgtt ggcggaggag gatccggtgg cggagggttca 60
ggaggcggtg gatcgatcca gcgtactcca aagattcagg ttactcacg tcatccagca 120
gagaatggaa agtcaaattt cctgaattgc tatgtgtctg ggtttcatcc atccgacatt 180
gaagttgact tactgaagaa tggagagaga attgaaaaag tggagcattc agacttgtct 240
ttttcgaagg actggtcttt ctatctcttg tactacactg aattcacccc cactgaaaaa 300
gatgagtatg cctgccgtgt gaaccatgtg actttgtcac agcccaagat agttaagtgg 360
gatcgcgaca tgggtggcgg tggaaagcgg ggtggaggct ctggtggagg tggcagcggc 420
tctcactcca tgaggtattt cttcacatcc gtgtcccggc ccggccgcgg ggagccccgc 480
ttcatcgag tgggtctagt ggacgacacg cagttcgtgc ggttcgacag cgacgccgcg 540
agccagagga tggagccgcg ggcgccgtgg atagagcagg aggggtccga gtattgggac 600
ggggagacac ggaaagtga ggccactca cagactcacc gagtggacct ggggacctg 660
cgcggctact acaaccagag cgaggccggt tctcacaccg tccagaggat gtatggctgc 720
gacgtggggt cggactggcg ctctctccgc ggggtaccacc agtacgcgta cgacggcaag 780
gattacatcg ccctgaaaga ggacctgcgc tcttggaccg cggcggacat ggcagctcag 840
accaccaagc acaagtggga ggcggcccat gtagcggagc agttgagagc ctacctggag 900
ggcacgtgcg tggagtggct ccgcagatac ctggagaacg ggaaggagac gctgcagcgc 960
acggagcccc ccaaaacgca catgactcac cacgctgtct ctgacctga agccacctg 1020
aggtgctggg ccctgagctt ctacctgcg gagatcacac tgacctggca gcgggatggg 1080
gaggaccaga cccaggacac ggagctcgtg gagaccaggc ctgcagggga tggaaacctt 1140
cagaagtggg cggctgtggt ggtgccttct ggacaggagc agagatacac ctgccatgtg 1200
cagcatgagg gtttgcctaa gcccctcacc ctgagatggg aggtctccgg aggtcaggta 1260
caactgcagc agtctgggcc tgagctggag aagcctggcg cttcagtga gatattctgc 1320
aaggcttctg gttactcatt cactggctac accatgaact ggggtgaagca gagccatgga 1380
aagagccttg agtggattgg acttattact ccttacaatg gtgcttctag ctacaaccag 1440
aagttcaggg gcaaggccac attaactgta gacaagtcac ccagcacagc ctacatggac 1500
ctcctcagtc tgacatctga agactctgca gtctatttct gtgcaagggg gggttacgac 1560
gggagggggt ttgactactg gggccaaggg accacgggtc ccgtctctc aggtgtaggc 1620
ggttcaggcg gcggtggctc tggcgggtggc ggatcggaca tcgagctcac tcagtctcca 1680
gcaatcatgt ctgcatctcc aggggagaag gtcaccatga cctgcagtgc cagctcaagt 1740
gtaagttaca tgactggta ccagcagaag tcaggcacct ccccaaaaag atggatttat 1800
gacacatcca aactggcttc tggagtccca ggtcgcttca gtggcagtgg gtctggaaac 1860
tcttactctc tcacaatcag cagcgtggag gctgaagatg atgcaactta ttactgccag 1920
cagtggagta agcaccctct cacgttcggt gctgggacaa agttggaaat aaaataatga 1980

```

<210> 23

<211> 1980

5 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de fusión M1COV/SCHLA-A2/SS1 (SCFV)

<400> 23

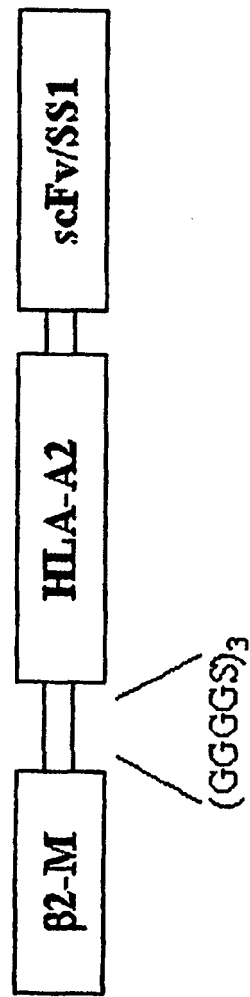
|             |            |            |             |            |             |      |
|-------------|------------|------------|-------------|------------|-------------|------|
| atgggcatc   | tgggcttcgt | gtttaccctg | ggcggaggag  | gatccggtgg | cggagggtca  | 60   |
| ggaggcggtg  | gatcgatcca | gcgtactcca | aagattcagg  | tttactcacg | tcattccagca | 120  |
| gagaatggaa  | agtcaaattt | cctgaattgc | tatgtgtctg  | ggtttcatcc | atccgacatt  | 180  |
| gaagttgact  | tactgaagaa | tggagagaga | attgaaaaag  | tggagcattc | agacttgtct  | 240  |
| ttttcgaagg  | actggtcttt | ctatctcttg | tactacactg  | aattcacccc | cactgaaaaa  | 300  |
| gatgagtatg  | cctgccgtgt | gaaccatgtg | actttgtcac  | agcccaagat | agttaagtgg  | 360  |
| gatcgcgaca  | tgggtggcgg | tggaaagcgg | ggtggaggct  | ctggtggagg | tggcagcggc  | 420  |
| tctcactcca  | tgaggtat   | cttcacatcc | gtgtcccggc  | ccggccgcgg | ggagccccgc  | 480  |
| ttcatcgcag  | tgggtactgt | ggacgacacg | cagttcgtgc  | ggttcgacag | cgacgccgcg  | 540  |
| agccagagga  | tggagccgcg | ggcgccgtgg | atagagcagg  | aggggtccga | gtattgggac  | 600  |
| ggggagacac  | ggaaagtga  | ggccactcca | cagactcacc  | gagtggacct | ggggaccctg  | 660  |
| cgcggctact  | acaaccagag | cgaggccggt | tctcacaccg  | tccagaggat | gtatggctgc  | 720  |
| gacgtggggg  | cggactggcg | cttcctccgc | gggtaccacc  | agtacgcgta | cgacggcaag  | 780  |
| gattacatcg  | ccctgaaaga | ggacctgcgc | tcttggaaccg | cggcggacat | ggcagctcag  | 840  |
| accaccaagc  | acaagtggga | ggcggcccat | gtagcggagc  | agttgagagc | ctacctggag  | 900  |
| ggcacgtgcg  | tggagtggct | ccgcagatac | ctggagaacg  | ggaaggagac | gctgcagcgc  | 960  |
| acggcagccc  | ccaaaacgca | catgactcac | cacgtgtctt  | ctgaccatga | agccaccctg  | 1020 |
| aggtgctggg  | ccctgagctt | ctaccctgcg | gaaatcacac  | tgacctggca | gcgggatggg  | 1080 |
| gaggaccaga  | cccaggacac | ggagctcgtg | gagaccaggc  | ctgcagggga | tggaaccttc  | 1140 |
| cagaagtggg  | cggctgtggg | ggtgccttct | ggacaggagc  | agagatacac | ctgccatgtg  | 1200 |
| cagcatgagg  | gtttgcccaa | gccccctacc | ctgagatggg  | aggcttccgg | aggtcaggta  | 1260 |
| caactgcagc  | agtctgggcc | tgagctggag | aagcctggcg  | cttcagtga  | gatatcctgc  | 1320 |
| aaggcttctg  | gttactcatt | cactggctac | accatgaact  | gggtgaagca | gagccatgga  | 1380 |
| aagagccttg  | agtggattgg | acttattact | ccttacaatg  | gtgcttctag | ctacaaccag  | 1440 |
| aagttcaggg  | gcaaggccac | attaactgta | gacaagtcac  | ccagcacagc | ctacatggac  | 1500 |
| ctcctcagtc  | tgacatctga | agactctgca | gtctatttct  | gtgcaagggg | gggttacgac  | 1560 |
| gggagggggt  | ttgactactg | gggccaaggg | accacgggtc  | ccgtctcctc | aggtgtaggc  | 1620 |
| gggttcaggcg | gcggtggctc | tggcggtggc | ggatcggaca  | tcgagctcac | tcagtctcca  | 1680 |
| gcaatcatgt  | ctgcatctcc | aggggagaag | gtcaccatga  | cctgcagtgc | cagctcaagt  | 1740 |
| gtaagttaca  | tgactgggta | ccagcagaag | tcaggcacct  | ccccaaaag  | atggatttat  | 1800 |
| gacacatcca  | aactggcttc | tggagtccca | ggtcgcttca  | gtggcagtgg | gtctggaaac  | 1860 |
| tcttactctc  | tcacaatcag | cagcgtggag | gctgaagatg  | atgcaactta | ttactgccag  | 1920 |
| cagtggagta  | agcaccctct | cacgttcggt | gctgggacaa  | agttggaaat | aaaataatga  | 1980 |

# REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión que comprende aminoácidos consecutivos que, comenzando en el extremo amino de la proteína, corresponden a aminoácidos consecutivos presentes en (i) un péptido restringido por CMH humano de citomegalovirus, (ii) un primer enlazador peptídico, (iii) una  $\beta$ -2 microglobulina humana, (iv) un segundo enlazador peptídico, (v) una cadena HLA-A2 de una molécula CMH de clase I humana, (vi) un tercer enlazador peptídico, (vii) una región variable de una cadena pesada de un fragmento scFv de un anticuerpo, y (viii) una región variable de una cadena ligera de tal fragmento scFv, en la que los aminoácidos consecutivos que corresponden a (vii) y (viii) se unen juntos directamente por un enlace peptídico o por aminoácidos consecutivos que corresponden a un cuarto enlazador peptídico, y el fragmento scFv se obtiene a partir de un anticuerpo que se une específicamente a mesotelina, en el que los aminoácidos consecutivos tienen la secuencia aminoacídica expuesta en la SEQ ID NO: 2.
2. Una composición que comprende la proteína de fusión de la reivindicación 1, en la que la proteína de fusión está presente en la composición en una cantidad terapéuticamente eficaz y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
3. Una construcción de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de la reivindicación 1.
4. Un vector que comprende la construcción de ácido nucleico de la reivindicación 3.
5. Una célula transformada que comprende el vector de la reivindicación 4.
6. Una preparación aislada de cuerpos de inclusión expresados por bacterias que comprende más del 30 por ciento en peso de la proteína de fusión de la reivindicación 1.
7. Un proceso para producir la proteína de fusión de la reivindicación 1 que comprende cultivar la célula transformada de la reivindicación 5, de manera que la proteína de fusión se exprese, y recuperar la proteína de fusión.
8. La proteína de fusión de la reivindicación 1, para su uso en inmunoterapia oncológica eliminando selectivamente una célula tumoral iniciando una respuesta inmune mediada por CTL contra la célula tumoral.
9. La proteína de fusión de la reivindicación 1, para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en la que dicha célula tumoral expresa mesotelina sobre su superficie.

Fig 1

A. scHLA-A2/SS1(scFv)



B. pep/scHLA-A2/SS1(scFv)

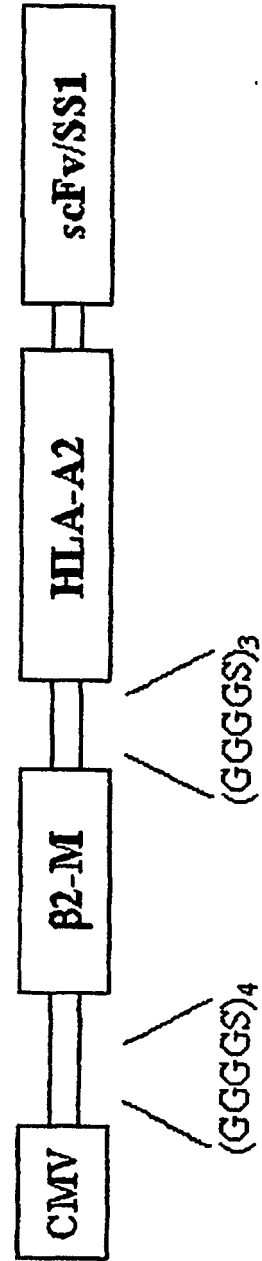


Fig 2

ATGAACCTGGTGCCGATGGTCGCCGACCGTGGAGGTGGCGGTTCTGGCGGAGGAGGATCCGGTGGCGGA  
 GGTTCAGGAGCGGTGGATCGATCCAGCGTACTCCAAGATTACAGTTTACTCACGTCAATCCAGCAGAGAA  
 TGGAAAGTCAAAATTTCTGAATTGCTATGTCTGGTTTCATCCATCCGACATTGAAGTTGACTTACTGAAG  
 AATGGAGAGAGAAATTGAAAAGTGGAGCATTCAGACTTGCTTTTTTCGAAGGACTGGTCTTTCTATCTCTTGT  
 ACTACACTGAATTCACCCCACTGAAAAAGATGAGTATGCCCTGCCGTGTGAACCATGTGACTTTGTACACAGC  
 CCAAGATAGTTAAGTGGATCCGACATGGTGGCGGTGAAGCGCGGTGAGGCTCTGGTGGAGGTG  
 GCAGCGCTCTCACTCCATGAGGTATTTCTTACATCCGTGTCCCGCCGCCGCGGAGCCCGCTT  
 CATCGCAGTGGGTACGTGGACGACACGAGTTCGTGCGTTTCGACAGCGACGCCGAGCCAGAGGAT  
 GGAGCCGGCGCGGTGGATAGAGCAGGAGGTCGCGAGTATTGGGACGGGAGACACGGAAAGTGA  
 AGGCCACTCACAGACTCACCGAGTGGACCTGGGACCCCTGCGCGCTACTACAACCAAGAGCGAGGCCG  
 GTTCTCACACCGTCCAGAGGATGTATGGCTCGACGTGGGTGGGACTGGCGTTCCTCCGCGGTACCA  
 CCAGTACGCGTACGACGGCAAGGATTACATCGCCCTGAAAGAGGACCTGCGCTCTTGGACCGCGCGGAC  
 ATGGCAGCTCAGACCACCAAGCACAAAGTGGAGGCGGCCATGTAGCGGAGCAGTTGAGAGCCTACCTGG  
 AGGGCACGTGCGTGGAGTGGCTCCGAGATACCTGGAGAACGGGAAGGAGACGCTGCAGCGCACGGACG  
 CCCCCAAACGCACATGACTCACACGCTGTCTTGACCATGAAGCCACCCCTGAGGTGCTGGCCCTGAG  
 CTTCTACCTGCGGAGATCACACTGACCTGGCAGCGGATGGGAGGAGCACGACCCAGACGAGCTC  
 GTGGAGACAAGGCTGCAGGGGATGGAACCTCCAGAAGTGGCGGCTGTGTGGTCCCTTCTGGACAG  
 GAGCAGAGATACACCTGCCATGTGCAGCATGAGGGTTGCCCAAGCCCTCACCCCTGAGATGGGAGGCTT  
 CCGGAGGTCAGGTACAACTGCAGCAGTCTGGGCTGAGCTGGAGAAGCCTGGCGTTCAGTGAAGATATC  
 CTGCAAGGCTTCTGGTTACTCTCACTGGCTACACCATGAACGTGGTGAAGCAGAGCCATGGAAGAGCC  
 TTGAGTGGATTGGACTTATTACTCCTTACAATGGTGCTTCTAGCTACAACCAAGATTCAGGGGCAAGGCCA  
 CATTAACTGTAGACAAGTCATCCAGCACAGCCTACATGGACCTCCTCAGTCTGACATCTGAAGACTCTGCAG  
 TCTATTTCTGTGCAAGGGGGTTACGACGGGAGGGTTTGACTACTGGGCGCAAGGACCAAGGTAC  
 CGTCTCCTCAGGTAGCGGTTACGGCGGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGGACATCGAGCTCAC  
 TCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCAACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTG  
 TAAGTTACATGCACCTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCCAAAAGATGGATTATGACACATCCAAAC  
 TGGCTTCTGGAGTCCCAGGTGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAACTCTTACTCTCACAAATCAGCAGC  
 GTGGAGGCTGAAGATGATGCAACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAAGCACCCCTCTCACGTTCCGTTGCTGG  
 GACAAAGTTGGAAATAAATAATGA

Fig 3

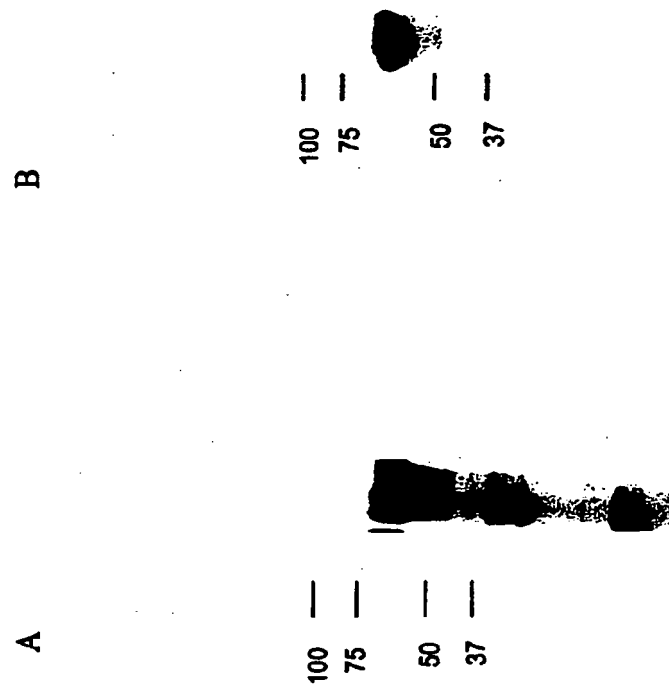




Fig 4

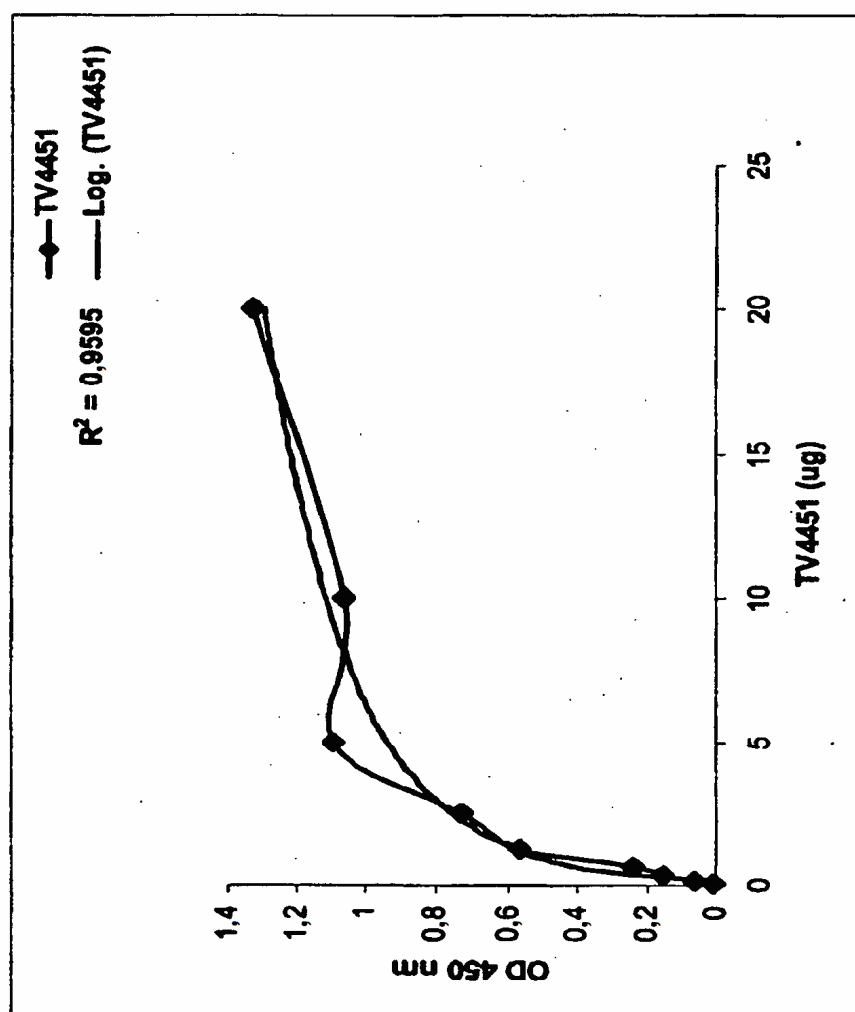


Fig 5

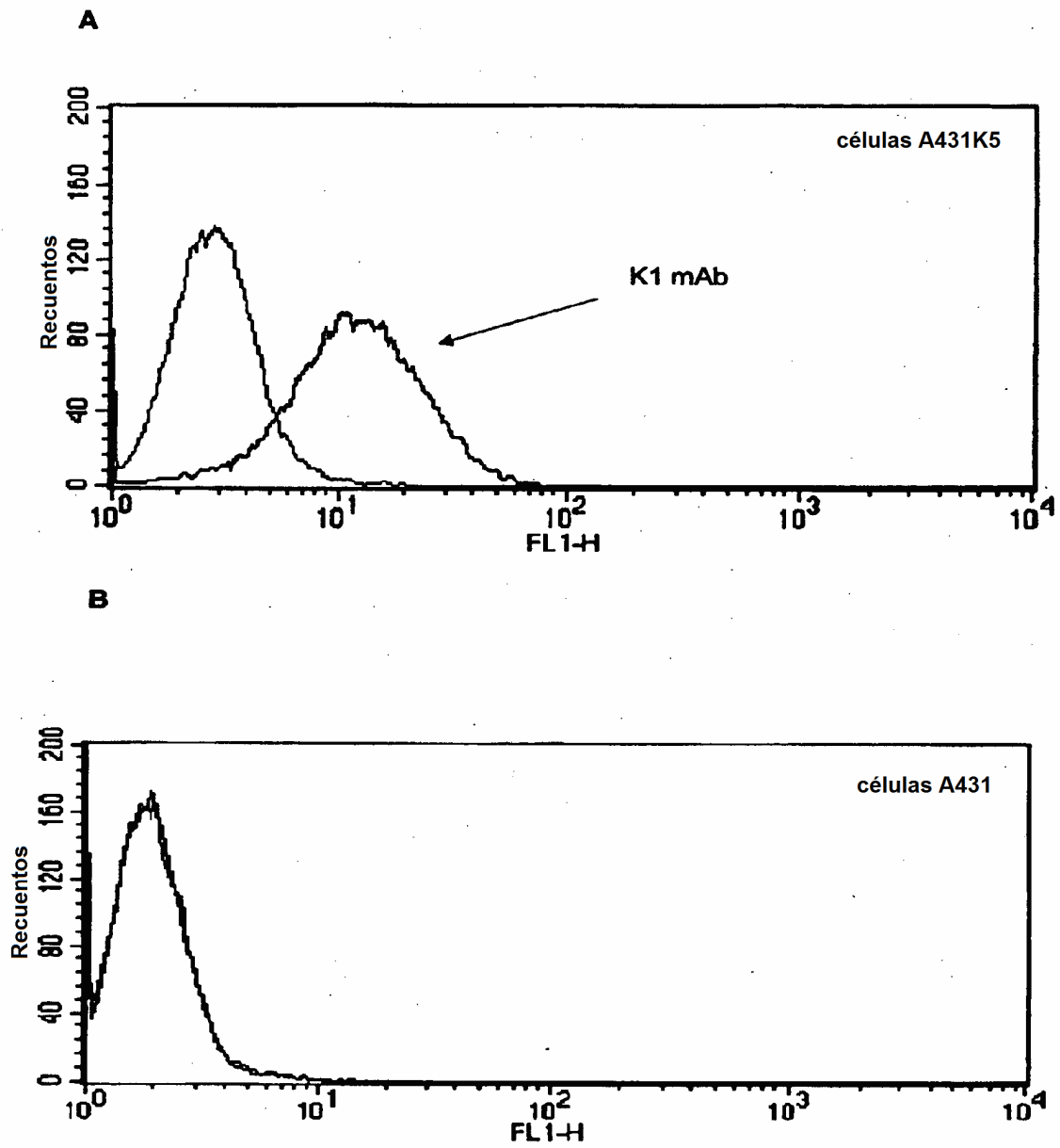


Fig 5 continuación

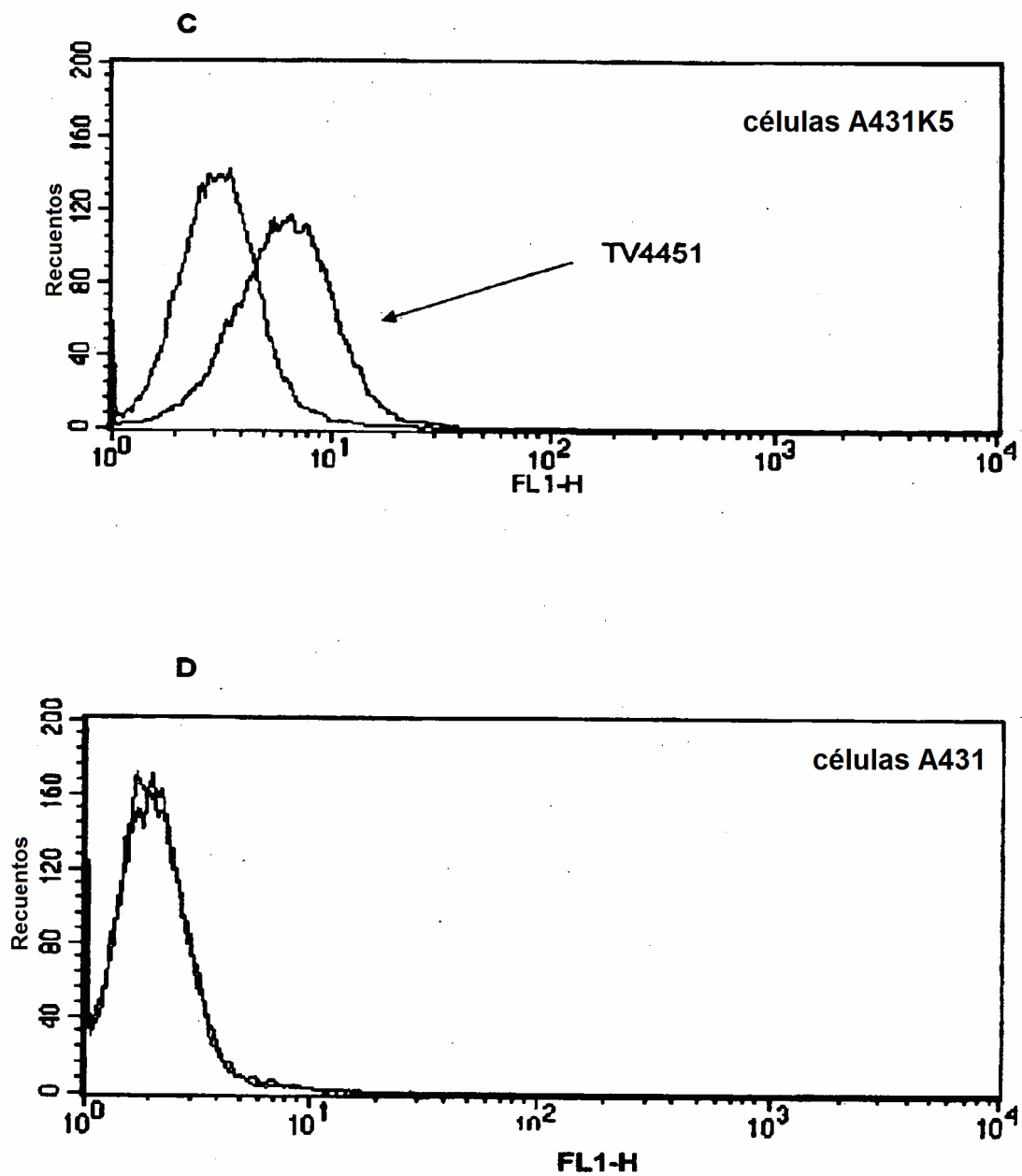


Fig 6

A

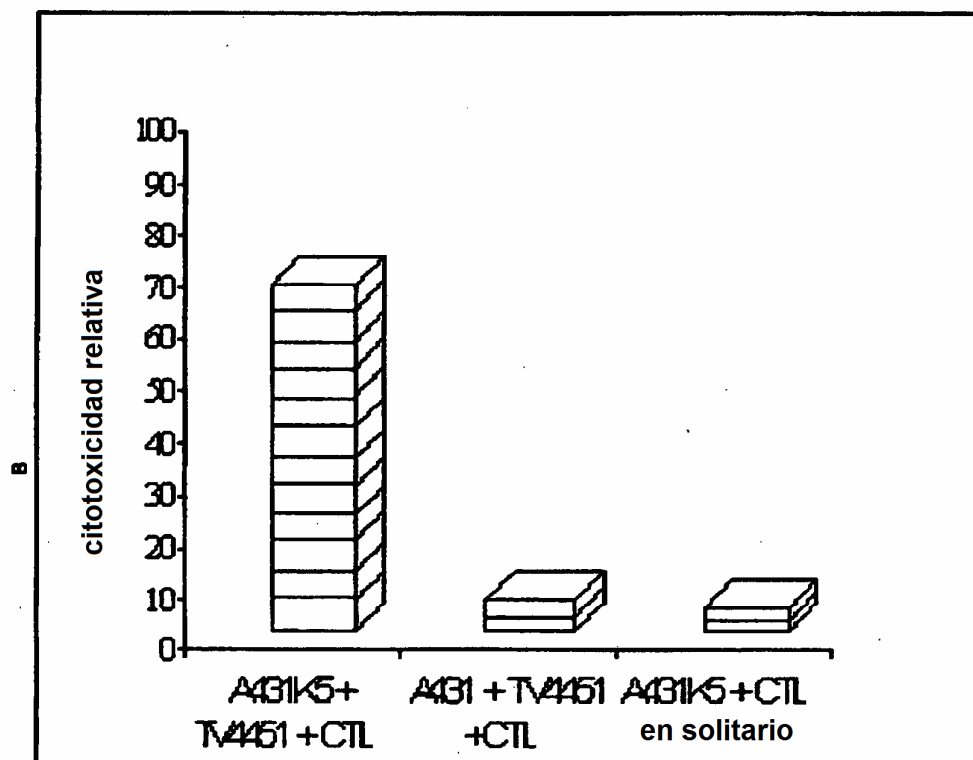


Fig 6 continuación

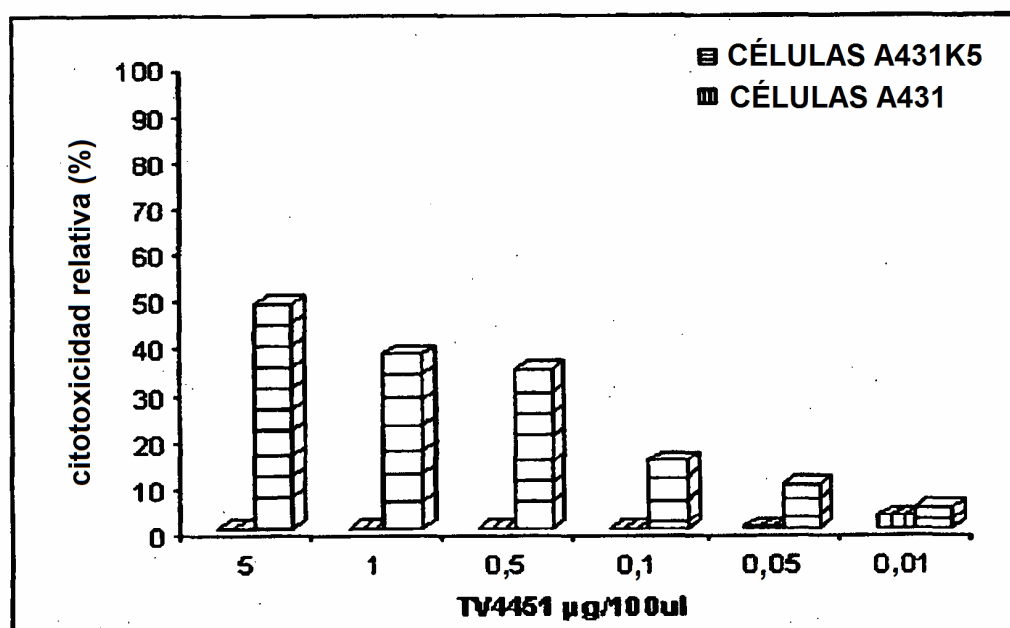
**B**

Fig 12

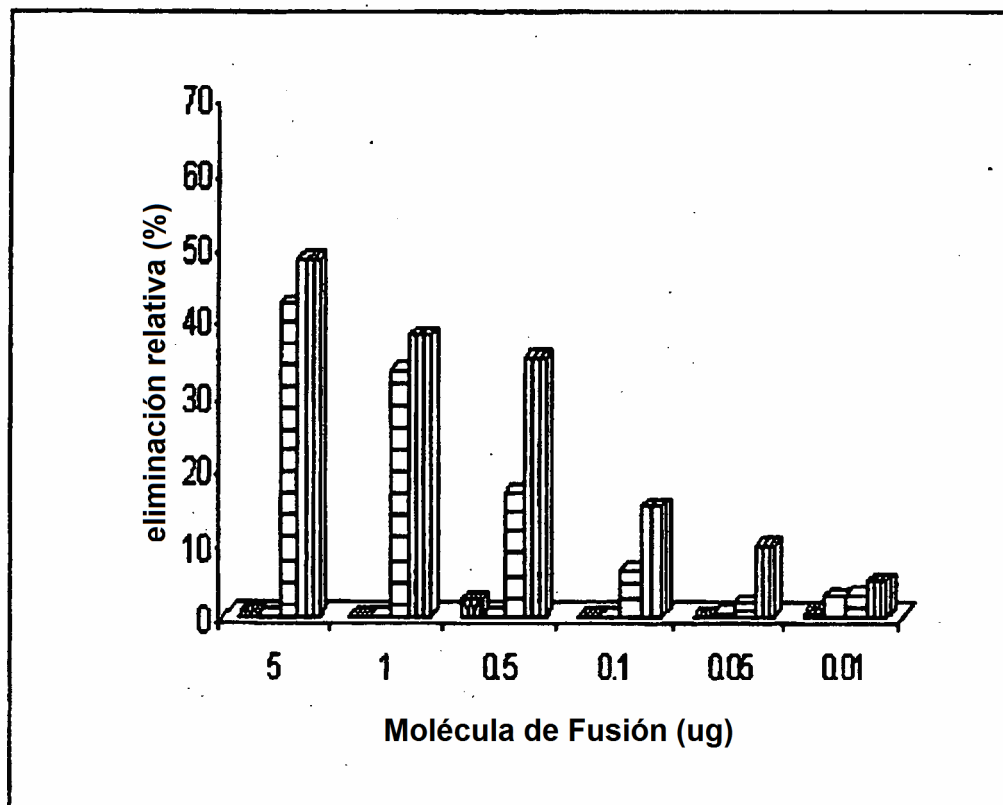
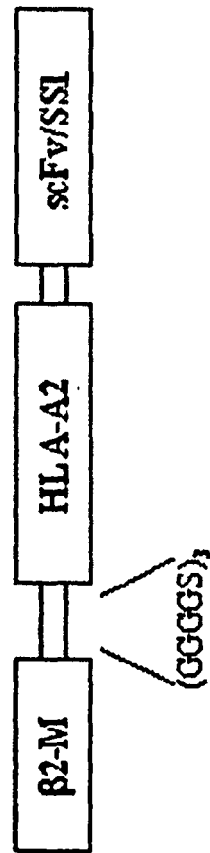


Fig 13

A. scHLA-A2/SS1(scFv)



B. M1/scHLA-A2/SS1(scFv)

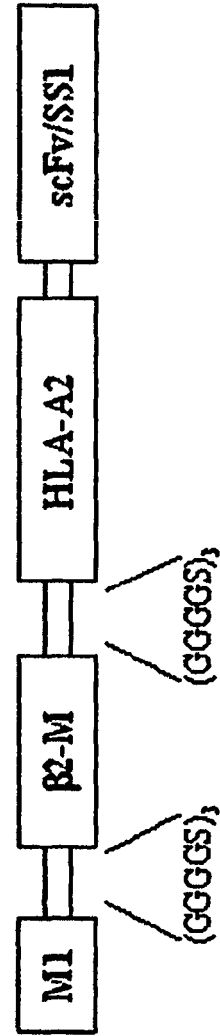


Fig 14

ATGGGCA TTCGGCTTCGTGTTTACCCCTGGGGGAGGAGGATCCGGTGGCGAGGTTTCAGGAGCGGGTG  
 GATCGATCCAGCGTACTCCAAAGATTACAGTTTACTCACGTATCCAGCAGAGAAATGGAAGTCAAATTTCTCT  
 GAATTGCTATGTGCTGGTTTCATCCATCCGACATTGAAGTTGACTTACTGAAGAAATGGAGAGAAATTTGAAA  
 AAGTGGAGCATTACAGACTTGCTTTTTCGAAGGACTGGTCTTTCTATCTCTTGTACTACACTGAATTCACCCCC  
 ACTGAAAAAGATGAGTATGCCTGCCGTGAACCATGTGACTTTGTACAGCCCCAAGATAGTTAAGTGGGATC  
 GCGACATGGGTGGCGGTGAAGCGGGTGGAGGCTCTGGTGGAGTGGCAGCGGCTCTCACTCCATGAG  
 GTATTTCTTACATCCGTGTCCCGCCCCGGCGGGAGCCCCGCTTTCATCGCAGTGGGTACGTGGACG  
 ACACGCAGTTCGTGCGGTTTCGACAGCGACGCCGCGAGCCAGAGGATGGAGCCGCGGGCGCGGTGATAGA  
 GCAGGAGGTCCGGAGTATTGGACGGGGAGACACGGAAAGTGAAGGCCCACTCACAGACTCACCGAGTGG  
 ACCTGGGACCCCTGCGGGCTACTACAACAGAGCGAGCGCGGTTCTCACACCGTCCAGAGGATGTATGGC  
 TCGACGTGGGTGGACTGGCGCTTCTCCGGGTACCAACAGTACCGTACGCGTACGACGGCAAGGATTACAT  
 CGCCTGAAAGAGACCTGCGCTCTTGACCGCGGGACATGGCAGCTCAGACCAACCAAGCACAAAGTGGG  
 AGCGGCCCATGTAGCGGAGCAGTTGAGAGCCTACCTGGAGGCGACGTGCGTGGAGTGGTCCGCAGATAC  
 CTGGAGAACGGGAAGGAGACGCTGCAGCGCACGGACGCCCAACCAACGCACATGACTCACCACTGCTCTC  
 TGACCATGAAGCCACCTGAGGTGCTGGGCCCTGAGCTTCTACCTGCGGAAATCACACTGACCTGGCAGCG  
 GGATGGGAGGACCAAGCCAGGACCGGAGCTCGTGGAGACCAAGCCCTGCAGGGGATGGAACCTTCCAG  
 AAGTGGCGGCTGTGGTGGTGCCTTCTGGACAGGAGCAGAGATACACCTGCCATGTGCAGCATGAGGGTTT  
 GCCAAGCCCCCTCACCTGAGATGGGAGGCTTCGGAGGTGAGTACAACCTGCAGCAGTCTGGGCTGAGC  
 TGGAGAAGCCTGGCGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTACTCATTCCTGCTACACCATGAA  
 CTGGGTGAAGCAGAGCCATGGAAGAGCCTTGAGTGGATTGGAATTACTCCTTACAATGGTGTCTTAGC  
 TACAACAGAAAGTTACGGGCAAGGCCACATTAACTGTAGACAAGTCAATCCAGCACAGCCTACATGGACCTCC  
 TCAGTCTGACATCTGAAGACTCTGCAGTCTATTTCTGTGCAAGGGGGTTACGACGGGAGGGGTTTTGACTA  
 CTGGGGCCAAGGACCAACGCTCACCGTCTCCTCAGGTGTAGCGGTTACGGCGGCTGCTGCTGGCGGT  
 GCGGATCGGACATCGAGCTCACTCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAGGTCAACCATG  
 ACCTGCAGTCCAGCTCAAGTGAAGTTACATGCAGTGTACCAGCAGAAAGTCAAGGCACCTCCCCCAAAAGAT  
 GGATTTATGACACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCAGGTCGCTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGAACTCTTA  
 CTCTCTCACAATCAGCAGCGTGGAGGCTGAAGATGATGCAACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAAGCACCCCT  
 CTCACGTTCCGTGCTGGGACAAAGTTGGAAATAAAATATGA



Fig 15

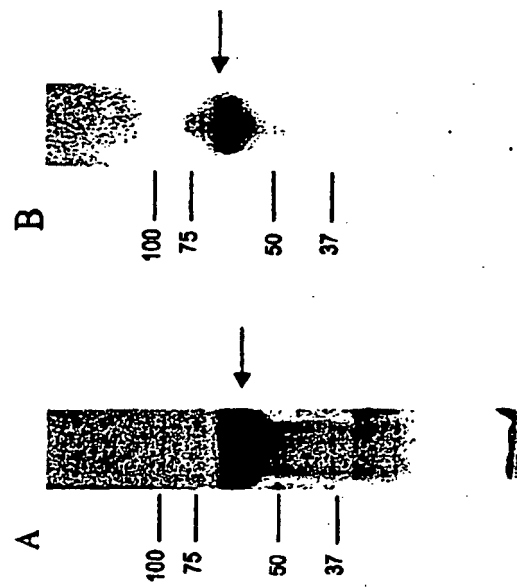


Fig 16

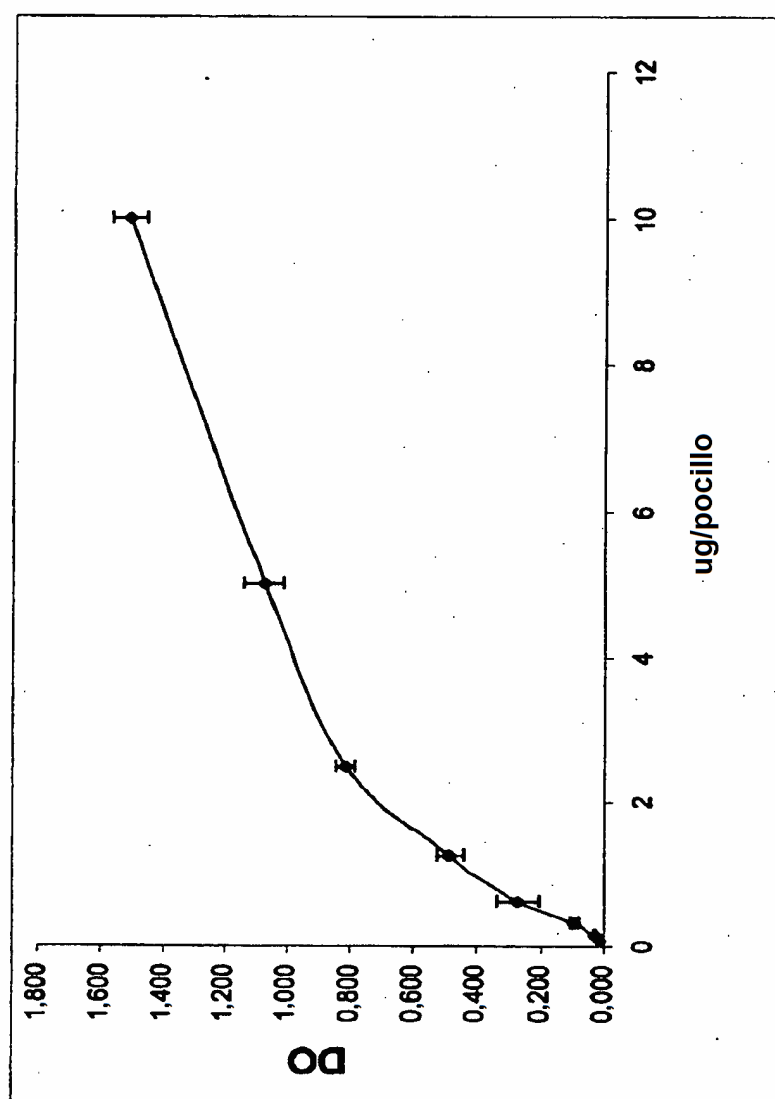


Fig 17

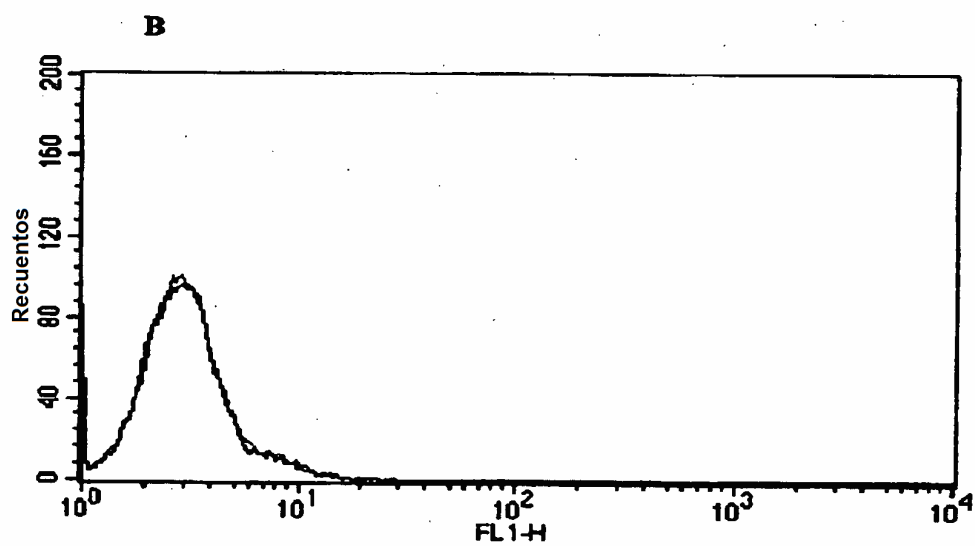
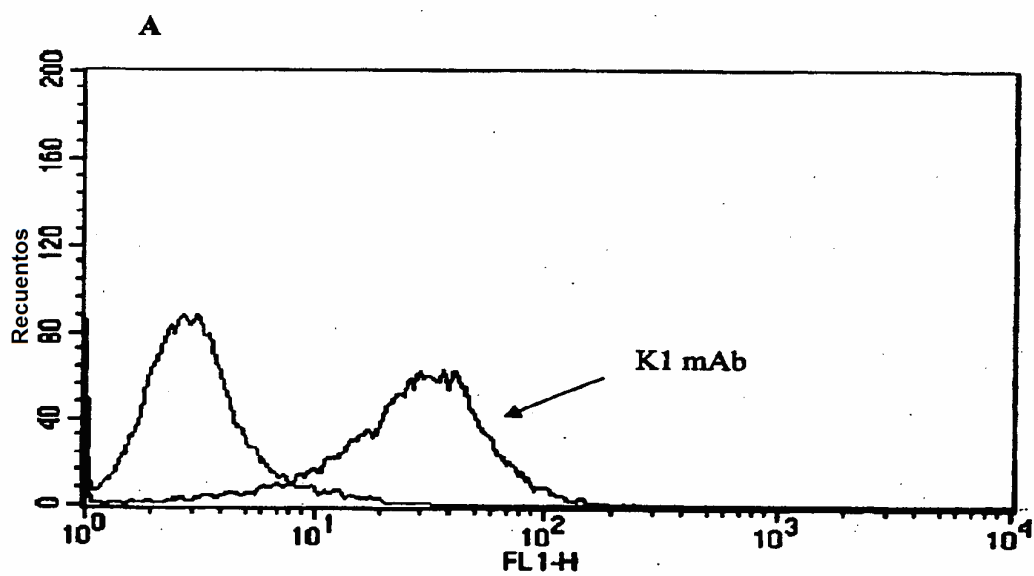


Fig 17 continuación

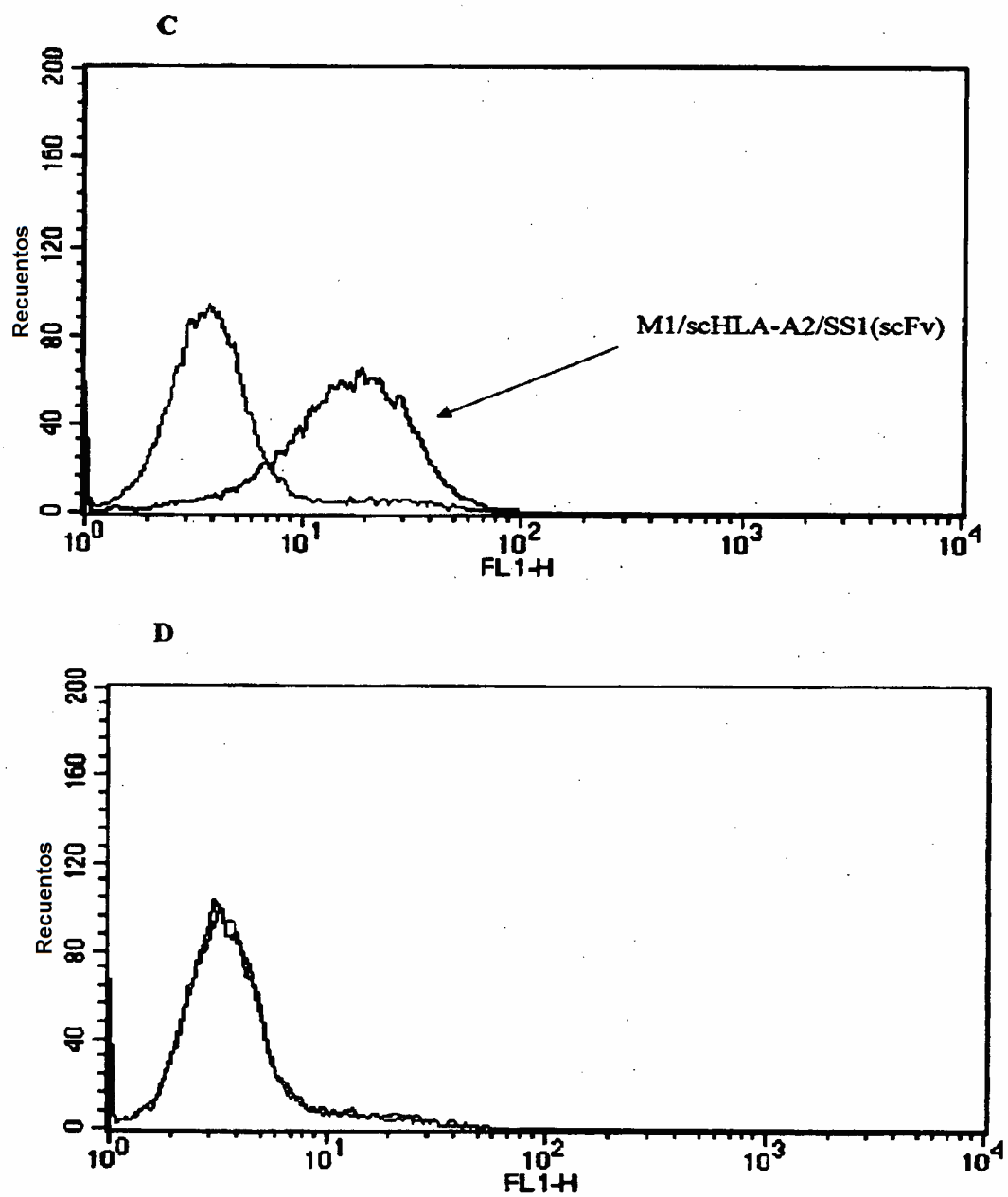


Fig 18

