

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 559 409**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.09.2004 E 04816845 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.10.2015 EP 1675607**

54 Título: **Moléculas de MHC recombinantes monoméricas útiles para la manipulación de células T específicas de antígenos**

30 Prioridad:

**05.09.2003 US 500660 P**

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

**12.02.2016**

73 Titular/es:

**OREGON HEALTH & SCIENCE UNIVERSITY  
(100.0%)  
690 SW Bancroft Street, Mail Code L 106TT  
Portland, OR 97239, US**

72 Inventor/es:

**BURROWS, GREGORY G. y  
VANDENBARK, ARTHUR A.**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 559 409 T3**

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

**DESCRIPCIÓN**

Moléculas de MHC recombinantes monoméricas útiles para la manipulación de células T específicas de antígenos

Referencias cruzadas a solicitudes relacionadas

5 La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud de patente provisional estadounidense número 60/500.660, presentada por Burrows *et al.* el 5 de septiembre de 2003, que se incorpora al presente documento como referencia.

Declaración respecto a la investigación con patrocinio federal

10 Se respaldaron aspectos de este trabajo por subvenciones de los Institutos Nacionales de Salud (A143960, ESI0554 y NS41965), la Sociedad Nacional de Esclerosis Múltiple (RG3012A) y el Departamento de Asuntos de los Veteranos. El gobierno de los Estados Unidos tiene determinados derechos sobre el contenido.

Campo de la invención

15 La presente invención se refiere a polipéptidos recombinantes que comprenden dominios moleculares del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) que median la unión a antígeno y el reconocimiento del receptor de células T (TCR) y a composiciones y métodos relacionados que incorporan estos polipéptidos recombinantes. Las composiciones y los métodos de la invención son útiles para la detección, cuantificación y purificación de células T específicas de antígeno, para modular la actividad de las células T y para tratar enfermedades mediadas por células T tales como trastornos autoinmunitarios.

Antecedentes de la invención

20 El sistema inmunitario funciona normalmente para dirigir respuestas inmunitarias protectoras contra microorganismos y otros materiales extraños nocivos. En el contexto de las enfermedades autoinmunitarias y el rechazo de trasplantes, sin embargo, estas respuestas inmunitarias normalmente beneficiosas pueden mediar efectos perjudiciales y a menudo mortales. En el caso de la autoinmunidad, los antígenos presentes en los propios tejidos corporales se convierten en dianas para respuestas inmunitarias autorreactivas que producen destrucción tisular y otros síntomas de enfermedad.

25 Las respuestas inmunitarias en mamíferos están mediadas por una serie diversa de células sanguíneas periféricas denominadas leucocitos. Los leucocitos se producen a partir de células madre hematopoyéticas que experimentan autorrenovación y diferenciación para dar dos linajes de precursores (las líneas mieloide y linfoide). Se produce diferenciación adicional entre estos linajes para producir monocitos, eosinófilos, neutrófilos, basófilos, megacariocitos y células eritroides a partir de la línea mieloide, y linfocitos T, linfocitos B y células NK a partir de la línea linfoide.

30 Los linfocitos T incluyen células T CD8+ (células T citotóxicas/supresoras), y células T CD4+ que se distinguen en parte por su expresión de moléculas de la superficie celular, CD8, y CD4, respectivamente, que funcionan para potenciar la avidéz con la que las células T se unen a células portadoras de antígeno o diana, y también pueden promover la interacción del TCR con el antígeno relacionado. Bierer *et al.*, Ann. Rev. Immunol. 7:579-99, 1989.

35 Las células T CD4+ desempeñan un papel regulador clave con respecto a otros tipos de células del sistema inmunitario, actuando como células "T cooperadoras" o "T inductoras" cuando se activan. En virtud de este papel regulador principal, las células T CD4+ son agentes clave en la patogénesis de diversas enfermedades autoinmunitarias, incluyendo la esclerosis múltiple (EM), artritis reumatoide (AR), diabetes, sarcoidosis, uveítis autoinmunitaria, beriliosis crónica, y también se considera que desempeñan un papel causal en el rechazo de trasplantes y en la enfermedad de injerto contra huésped (EICH) (Swanborg, J. Immunol 130:1503-05, 1983; Cush, Arthritis Rheum. 31: 1230-38, 1988; Caspi, J. Immunol 140:1490-95, 1988; Cobbold *et al.* Nature 312:54851, 1988; Steinman, Sci. Am. 269:106-14, 1993).

40 Las células T CD4+ median su papel en la enfermedad autoinmunitaria respondiendo de una manera específica de antígeno a "autoantígenos" asociados con células o tejidos diana. Las células T CD4+ patógenas migran o "se dirigen" a tejidos diana que portan autoantígeno y producen selectivamente citocinas de células T cooperadoras de tipo 1 (Th1), que desencadenan reclutamiento y activación de otros linfocitos y monocitos que pueden destruir tejidos diana y producir otras secuelas de enfermedad adversas (Weinberg, *et al.*, J. Immunol 148:2109-17, 1992; Weinberg *et al.*, J. Immunol 152:4712-5721,1994).

50 La activación normal de los linfocitos T se produce cuando las células T interactúan con células presentadoras de antígeno (APC) que portan el antígeno relacionado (Ag) en el contexto de una proteína del complejo mayor de

histocompatibilidad (MHC). La especificidad de las respuestas de células T la confiere un receptor de células T (TCR) específico de antígeno, polimórfico. La activación de células T está mediada por el reconocimiento del TCR del Ag presentado sobre la superficie de la APC como un péptido procesado unido a la molécula de MHC.

5 En seres humanos y otros mamíferos se producen dos clases distintas de moléculas de MHC, denominadas MHC de clase I y MHC de clase II. Ambas clases de moléculas de MHC comprenden complejos formados por la asociación de múltiples cadenas de polipéptido, y cada una incluye una parte transmembrana que ancla el complejo a la membrana de la APC. Las moléculas de MHC de clase I están compuestas por una cadena de polipéptido  $\alpha$  asociada no covalentemente con una cadena de  $\beta$ 2-microglobulina. La cadena  $\alpha$  del MHC de clase I incluye tres dominios distintos, denominados dominios  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$ . La estructura tridimensional de los dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  de las moléculas de MHC I forma una acanaladura de unión a péptido (denominada alternativamente en el presente documento hendidura o cavidad de unión a péptido) que se une al Ag relacionado para su presentación a las células T. El dominio  $\alpha 3$  es un dominio de tipo plegamiento de Ig que incluye una secuencia transmembrana para anclar la cadena  $\alpha$  en la membrana celular de la APC. Los complejos de MHC de clase I, cuando se asocian con el antígeno en presencia de señales coestimuladoras apropiadas, estimulan las células T citotóxicas CD8+ para destruir células diana de manera específica de Ag.

Se han estudiado los genes que codifican para las diversas cadenas de polipéptido que se asocian para formar los complejos de MHC en mamíferos y se han descrito con mucho detalle. En seres humanos, las moléculas de MHC (con excepción de la  $\beta$ 2-microglobulina de clase I) se codifican en la región de HLA del genoma, ubicada en el cromosoma 6. Hay tres loci que codifican para la cadena  $\alpha$  del MHC de clase I, denominados HLA-A, HLA-B y HLA-C. En el caso de las proteínas de MHC de clase II, hay tres pares de loci de cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ , denominados HLA-DR(A y B), HLA-DP(A y B) y HLA-DQ(A y B). En ratas, el gen  $\alpha$  de la clase I se designa RT1.A, mientras que los genes de la clase II se denominan RT1.B  $\alpha$  y RT1.B  $\beta$ . Puede encontrarse una descripción más detallada con respecto a la estructura, la función y la genética de los complejos de MHC, por ejemplo, en *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease* de Janeway y Travers, Current Biology Ltd./Garland Publishing, Inc. (1997), y en Bodmer *et al.* (1994) "Nomenclature for factors of the HLA system" *Tissue Antigens* vol. 44, páginas 1-18.

La especificidad de las respuestas de células T la confiere un receptor de células T (TCR) específico de antígeno, polimórfico. Los TCR comprenden receptores heterodiméricos  $\alpha\beta$ , de múltiples cadenas, que se activan de una manera específica de Ag por el Ag procesado y presentado sobre la superficie de la APC como un péptido unido al complejo de MHC. Los datos cristalográficos de rayos X demuestran que los péptidos del antígeno procesado se unen a las proteínas de MHC II en una cavidad distal a la membrana formada por los dominios  $\beta 1$  y  $\alpha 1$  (Matsui *et al.* *Science* 254:1788-91, 1991; Nag *et al.*, *J. Biol. Chem.* 267:22624-29, 1992).

A la activación de las células T CD4+ generalmente le sigue un ciclo de múltiples etapas que incluye la ligación conjunta del TCR y CD4 por el complejo MHC de clase II/péptido presentado por la APC. Un acontecimiento de activación separado denominado "coestimulación" está mediado por otras moléculas de la superficie de las células T, tales como CD28. En ausencia de la segunda señal coestimuladora, la estimulación de las células T a través del TCR por el complejo MHC de clase II/péptido, induce supuestamente un estado de falta de respuesta a la presentación de antígenos óptima posterior, denominado comúnmente "anergia". (Quill, *J. Immunol* 138:3704-12, 1987; Schwartz, *J. Exp. Med.* 184:1-8, 1996). En otros estudios, se ha notificado que la ligación del TCR en ausencia de una señal coestimuladora altera la activación normal de células T, induciendo una variedad de respuestas desde anergia hasta apoptosis (Schwartz, *J. Exp. Med.* 184:1-8, 1996; Janeway, *Cell* 76:275-85, 1994; Burrows *et al.*, *J. Immunol* 167:4386-95, 2001; Wang *et al.*, *The Journal of Immunology*, 2003).

Se han investigado amplia y extensamente las interacciones de linfocitos T restringidas por el MHC. Las células del subconjunto de células T cooperadoras/inductoras generalmente reconocen el antígeno sobre la superficie de la APC únicamente en asociación con productos génicos del MHC de clase II, lo que da como resultado la restricción genética del reconocimiento de antígenos. Aunque se han descrito las reglas que gobiernan la activación de las células T restringidas por el MHC, y particularmente de las células T restringidas por el MHC de clase II, todavía están definiéndose los mecanismos subyacentes.

Pese al gran número de posibles especificidades de TCR de las células T, varios estudios han mostrado que la mayor parte de la respuesta de células T a antígenos proteicos puede estar dirigida por algunos epítopos "inmunodominantes" dentro de la proteína antigénica. En el contexto de las enfermedades autoinmunitarias, se ha demostrado que las respuestas de células T restringidas por el MHC de clase II, y en algunos casos las señales clínicas de enfermedad autoinmunitaria, están asociadas con proteínas específicas y/o epítopos inmunodominantes de estas proteínas incluyendo, por ejemplo, colágeno de tipo II (Rosloneic *et al.*, *J. Immunol.* 160:2573-78, 1998; Andersson *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:7574-79, 1998; y Fugger *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 26:928-33, 1996), y Ag gp39 de cartílago humano (Cope *et al.*, *Arthritis Rheum.* 42:1497, 1999) asociado con artritis reumatoide (AR), ácido glutámico decarboxilasa 65 (Patel *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:8082-87, 1997; Wicker *et al.*, *J. Clin. Invest.* 98:2597, 1996) e insulina (Congia *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:3833-38, 1998) asociada con diabetes tipo 1 (diabetes mellitus insulino dependiente o DMID), y glicoproteína oligodendrocítica de mielina (MOG)

(Forsthuber *et al.*, J. Immunol. 167:7119, 2001) asociada con EM y un modelo de enfermedad animal para EM, encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE). Se han notificado hallazgos similares para respuestas de células T restringidas por el MHC de clase II asociadas con la proteína básica de mielina (MBP) (Madsen *et al.*, Nat. Genet. 23:343, 1999), proteína proteolipídica (PLP) (Kawamura *et al.*, J. Clin. Invest. 105:977, 2000), y MOG (Vandenberg *et al.*, J. Immunol. 171:127-33, 2003).

Un enfoque para gestionar y tratar las enfermedades autoinmunitarias y otros trastornos inmunitarios mediados por células T es regular la actividad de las células T usando ligandos de TCR naturales o sintéticos, o fármacos moduladores de células T u otros compuestos, que son agonistas o antagonistas de TCR. Se han producido diversos análogos de ligandos de TCR naturales que comprenden dominios extracelulares de moléculas de MHC de clase II unidas a un Ag de péptido específico. Se ha purificado varios de tales constructos como extractos con detergente de membranas de linfocitos o se han producido como proteínas recombinantes (Sharma *et al.*, PNAS. 88:11465-69, 1991), Kozono *et al.*, Nature 369:151-54, 1994; Arimilli *et al.*, J. Biol. Chem. 270:971-77, 1995; Nag, PNAS 90:1604-08, 1993; Nag *et al.*, J. Biol. Chem. 271:10413-18, 1996; Rhode *et al.*, J. Immunol. 157:4885-91, 1996; Fremont *et al.*, Science 272:1001, 1996; Sharma *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:11405, 1991; Nicolle *et al.*, J. Clin. Invest. 93:1361, 1994; Spack *et al.*, CNS Drug Rev. 4: 225, 1998).

Se ha notificado que estos complejos moleculares bicatenarios de cuatro dominios cargados con, o unidos covalentemente a, el Ag de péptido, interaccionan con las células T y modulan la actividad de las células T de una manera específica de Ag (Matsui *et al.*, Science 254:1788-91, 1991; Nag *et al.*, J. Biol. Chem. 267:22624-29, 1992; Nag, J. Biol. Chem. 268:14360-14366, 1993; Nag, PNAS 90:1604-08, 1993; Nicolle *et al.*, J. Clin. Invest. 93:1361-1369, 1994; Spack *et al.* J. Autoimmun. 8:787-807, 1995). Se han presentado diversos modelos sobre cómo pueden ser útiles estos complejos para modular respuestas inmunitarias en el contexto de la enfermedad autoinmunitaria. Por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 5.194.425 (Sharma *et al.*) y 5.284.935 (Clark *et al.*) notifican el uso de complejos MHC de clase II/péptido aislados conjugados con una toxina para eliminar las células T autorreactivas. Otros han notificado el uso de complejos MHC II/antígeno, en ausencia de factores coestimuladores, para inducir un estado de falta de respuesta en células T específicas de Ag conocido como "anergia" (Quill *et al.*, J. Immunol., 138:3704-3712 (1987). Tras esta observación, Sharma *et al.* (patentes estadounidenses n.ºs 5.468.481 y 5.130.297) y Clarke *et al.* (patente estadounidense n.º 5.260.422) sugieren que pueden administrarse terapéuticamente complejos MHC II/antígeno solubles para anergizar líneas de células T que responden específicamente a péptidos autoantigénicos. Estudios adicionales notifican que los complejos MHC II/antígeno solubles pueden inhibir la activación de células T, inducir anergia de células T y/o aliviar síntomas mediados por células T de enfermedad autoinmunitaria (Sharma *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:11405, 1991; Spack *et al.*, CNS Drug Rev. 4: 225, 1998; Steward *et al.*, J. Allerg. Clin. Immun. 2:S117, 1997). En algunos casos, en ausencia de coestimulación, se ha notificado que los complejos MHC de clase II/péptido intactos modulan la actividad de las células T induciendo apoptosis específica de antígeno en lugar de anergia (Nag *et al.* J. Biol. Chem. 271:10413-18, 1996).

Aunque el concepto de usar complejos MHC/antígeno aislados en aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico resulta muy prometedor, un inconveniente principal a los diversos métodos notificados hasta la fecha es que los complejos son grandes y por consiguiente difíciles de producir y trabajar con ellos. Aunque estos complejos de cuatro dominios pueden aislarse de linfocitos mediante extracción con detergente, tales procedimientos son ineficaces y producen sólo pequeñas cantidades de proteína. Aunque la clonación de genes que codifican para subunidades del complejo de MHC ha facilitado la producción de grandes cantidades de subunidades individuales a través de la expresión en células procariontas, la unión de subunidades individuales para dar complejos de MHC que tienen estructura conformacional apropiada ha resultado ser difícil. Otra característica importante de estos complejos MHC II/antígeno descritos anteriormente que no sólo se unen al TCR, sino también a la molécula de CD4 en la superficie de las células T a través del dominio  $\beta 2$  del MHC (Brogdon *et al.*, J. Immunol. 161:5472, 1998). Esta interacción adicional durante la presentación de péptidos y el acoplamiento del TCR complica la utilidad de los complejos MHC II/antígeno anteriores para determinadas aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas. Además, debido a su tamaño y estructura compleja, los complejos de MHC de clase II anteriores presentan un reto de plegamiento *in vitro* intrínsecamente difícil.

Para superar estos obstáculos y proporcionar ventajas adicionales, los inventores en la solicitud actual desarrollaron anteriormente ligandos de TCR o "RTL" recombinantes, novedosos para su uso en la modulación de la actividad de las células T. Estos RTL incorporan componentes estructurales seleccionados de una proteína de MHC de clase II nativa, que comprende normalmente los dominios  $\alpha 1$  y  $\beta 1$  del MHC de clase II (o partes de los dominios  $\alpha 1$  y  $\beta 1$  necesarias para formar una superficie de contacto de cavidad de unión a Ag/TCR mínima). Estos RTL pueden excluir todo o parte del dominio  $\beta 2$  de la proteína de MHC de clase II, normalmente al menos la parte de unión a CD4 del dominio  $\beta 2$ . Asimismo, los RTL para su uso dentro de la invención pueden excluir el dominio  $\alpha 2$  de la proteína de MHC de clase II (véase, por ejemplo, Burrows *et al.*, Prot Eng. 12:771, 1999). Se han producido diversos RTL que tienen estas características estructurales generales en *E. coli*, con y sin extensiones amino terminales que comprenden Ag de péptido unido covalentemente.

Se ha demostrado que estos tipos de constructos de RTL son agentes eficaces para aliviar síntomas de enfermedad autoinmunitaria mediada por células T CD4+ de una manera específica de MHC, específica de Ag (Burrows *et al.*, J.

5 Immunol 167:4386-95, 2001; Vandembark *et al.*, Journal of Immunology, 2003). Por ejemplo, se han sometido a prueba constructos de RTL y se ha mostrado que previenen y/o tratan EAE inducida por MBP en ratas Lewis (Burrows *et al.*, J. Immunol. 161:5987, 1998; Burrows *et al.*, J. Immunol. 164:6366, 2000) y que inhiben la activación e inducen la secreción de IL-10 en clones de células T restringidos por DR2 humanos específicos para el péptido MBP-85-95 o BCR-ABL b3a2 (CABL) (Burrows *et al.*, J. Immunol. 167:4386, 2001; Chang *et al.*, J. Biol. Chem. 276:24170, 2001). Otro constructo de RTL diseñado por los inventores en la solicitud actual es un constructo MOG-35-55/DR2 (VG312) que inhibe potencialmente respuestas autoinmunitarias y provoca tolerancia inmunológica al péptido MOG-35-55 encefalitogénico, y alivia o invierte signos clínicos e histológicos de EAE (Vandembark *et al.*, J. Immunol. 171:127-33, 2003). Los actuales inventores han desarrollado numerosos constructos de RTL adicionales  
10 útiles para modular respuestas inmunitarias de células T, que pueden emplearse eficazmente dentro de las composiciones y los métodos de la presente invención (véase, por ejemplo, Huan *et al.*, J. Immunol. 172:4556-4566, 2004).

15 En estudios de RTL de modificación por ingeniería genética de proteínas descritos recientemente, los solicitantes descubrieron que las moléculas de RTL derivadas del MHC de clase II pueden formar agregados indeseables en disolución. En el caso de un constructo de RTL derivado de HLA-DR2 (DRB1\*1501/DRA\*0101), el RTL purificado produjo aproximadamente el 10% de las moléculas en forma de dímeros estables, encontrándose el porcentaje restante de las moléculas en forma de estructuras de orden superior por encima de 300.000 Daltons (Chang *et al.*, J. Biol. Chem. 276:24170-76, 2001).

20 Aunque los agregados de RTL conservan la actividad biológica (Burrows *et al.*, J. Immunol 167:4386-95, 2001; Vandembark *et al.*, Journal of Immunology 171:127-133, 2003), la conversión de RTL multiméricos en reactivos monodispersos en disolución sigue siendo un objetivo importante no cumplido para facilitar el uso de RTL como agentes terapéuticos humanos, por ejemplo para tratar la esclerosis múltiple y otros estados autoinmunitarios.

25 Por consiguiente, sigue habiendo una necesidad no satisfecha en la técnica de proporcionar ligados de TCR (RTL) recombinantes que conserven la capacidad para unirse a péptidos Ag e interconectar funcionalmente con un TCR para modular la actividad de las células T de una manera específica de Ag, que tengan utilidad de diagnóstico y/o terapéutica, y que muestren un potencial reducido para agregarse en disolución o tras la administración a un sujeto mamífero. El documento WO2003/007978 se refiere al tratamiento y la prevención de cáncer de mama, y otros cánceres, proporcionando un péptido de ocho a veinte aminoácidos de longitud que comprende un análogo hidrófilo de un péptido de alfa-fetoproteína.

### 30 Sumario de la invención

La presente invención satisface esta necesidad y cumple objetos y ventajas adicionales proporcionando ligandos de receptores de células T (RTL) recombinantes, modificados, que se han modificado estructuralmente para mostrar una propensión disminuida a la autoagregación. Los RTL modificados de la invención normalmente tienen una o más características estructurales de superficie rediseñadas introducidas en una secuencia de polipéptido de MHC por lo demás nativa. Por ejemplo, los RTL modificados pueden diseñarse o modificarse por ingeniería genética de manera racional para introducir uno o más cambios de aminoácido en un sitio diana expuesto a disolvente para la modificación ubicada dentro de, o que define, una superficie de contacto de autounión (o autoasociación) encontrada en el polipéptido de MHC nativo.

40 Dentro de realizaciones a modo de ejemplo de la invención, el RTL modificado incluye una estructura de múltiples dominios que comprende múltiples dominios de MHC de clase I o MHC de clase II, o partes de los mismos necesarias para formar una superficie de contacto de TCR mínima necesaria para mediar la unión a Ag y el reconocimiento del TCR.

45 En el caso de RTL modificados derivados de moléculas de MHC de clase II humanas, los RTL normalmente comprenden dominios de polipéptido de MHC  $\alpha 1$  y  $\beta 1$  (o partes de los mismos suficientes para proporcionar una superficie de contacto de TCR mínima) de una proteína de MHC de clase II. Estos dominios o subpartes de los mismos pueden unirse covalentemente para formar un polipéptido monocatenario (sc) de MHC de clase II. El componente de MHC resultante puede ser útil como RTL "vacío", o puede asociarse con un Ag de péptido.

50 Las moléculas de RTL modificado de la invención muestran características mejoradas de monodispersión en disoluciones acuosas, mientras que conservan su capacidad para unirse a Ag de péptido, para seleccionar como diana y para modular la actividad de las células T específicas de antígeno, y para tratar, entre otras, enfermedades autoinmunitarias y otros estados mediados por células T específicas de antígeno *in vivo*.

55 Los RTL modificados de la invención carecen de determinadas características estructurales encontradas en moléculas de MHC nativas, intactas (por ejemplo, dominios de plegamiento de Ig transmembrana), pero no obstante pueden replegarse de una manera que es estructuralmente análoga a la de las moléculas de MHC completas nativas. Los RTL modificados pueden asimismo unirse a Ag de péptido para formar complejos MHC:antígeno

estables. Además, estos RTL modificados, cuando se asocian con un Ag de péptido relacionado, se unen a células T de una manera específica de epítipo y regulan la actividad de las células T (por ejemplo, proliferación) de una manera específica de Ag, tanto *in vitro* e *in vivo*. Como resultado, las moléculas de MHC dadas a conocer son útiles en una amplia variedad de aplicaciones tanto *in vivo* como *in vitro*.

5 La invención proporciona diversas formulaciones de RTL modificados, monodispersos. En realizaciones a modo de ejemplo, un RTL modificado comprende una componente de MHC de clase II de dos dominios que comprende los dominios  $\alpha 1$  y  $\beta 1$  de una molécula de MHC de clase II de mamífero. En realizaciones más detalladas, estos RTL modificados se caracterizan adicionalmente por tener el extremo amino terminal del dominio  $\alpha 1$  unido covalentemente al extremo carboxilo terminal del dominio  $\beta 1$ . En otras realizaciones detalladas, el componente de MHC del RTL no incluye los dominios  $\alpha 2$  o  $\beta 2$  encontrados en una molécula de MHC de clase II intacta. Normalmente, el componente de MHC del RTL está asociado, mediante interacción covalente o no covalente, con un determinante antigénico, tal como un epítipo de células T de una proteína autoantigénica. Por ejemplo, un antígeno de péptido puede unirse covalentemente al extremo amino terminal del dominio  $\beta 1$  de un componente de MHC de clase II. Las moléculas de dos dominios también pueden comprender un marcador detectable, tal como un marcador fluorescente, o un resto tóxico (por ejemplo, ricina A).

La descripción también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican para los RTL no agregantes, inventivos, así como vectores de expresión que pueden usarse para expresar estas moléculas en células de mamífero. En particular, las moléculas de ácido nucleico incluyen secuencias que codifican para el componente de MHC así como un péptido antigénico. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico de este tipo puede representarse por la fórmula Pr-P-B-A, en la que Pr es una secuencia promotora unida operativamente a P (una secuencia que codifica para el antígeno de péptido), B es el dominio  $\beta 1$  de clase II, y A es el dominio  $\alpha 1$  de clase II. En estas moléculas de ácido nucleico, P, B y A comprenden un único marco de lectura abierto, de manera que el péptido y los dos dominios de MHC se expresen como una única cadena de polipéptido.

Los RTL modificados de la invención pueden usarse *in vivo* para detectar y cuantificar células T, y/o para regular la función de las células T. Específicamente, tales moléculas cargadas con un antígeno seleccionado pueden usarse para detectar, monitorizar y cuantificar la población de células T específicas de antígeno, proporcionando utilidad, entre otras cosas, en varios entornos clínicos, tales como monitorización del número de células T específicas de antígeno tumoral en sangre extraída de un paciente con cáncer, o el número de células T específicas de autoantígeno en sangre extraída de un paciente que padece una enfermedad autoinmunitaria. En estos contextos, las moléculas dadas a conocer son herramientas poderosas para monitorizar el progreso de una terapia particular.

Además de monitorizar y cuantificar las células T específicas de antígeno, las moléculas de RTL modificado de la invención tienen utilidad para purificar células T para inmunoterapia adoptiva. Por ejemplo, los RTL modificados cargados con un antígeno tumoral pueden usarse para purificar células T específicas de antígeno tumoral de un paciente con cáncer. Estas células pueden expandirse entonces *in vitro* antes de devolverse al paciente como parte de un tratamiento contra el cáncer inmunoterápico adoptivo.

Las moléculas de RTL modificado de la invención pueden usarse para alterar la actividad, el fenotipo, el estado de diferenciación y/o el potencial patógeno de las células T de una manera específica de Ag. Dentro de aspectos alternativos de la invención, estos reactivos novedosos pueden usarse para inducir una variedad de procesos de traducción de células T, para modular funciones efectoras de células T (incluyendo citocina y respuestas de proliferación), para inducir anergia, o en cualquier caso para alterar el potencial patógeno de las células T de una manera específica de Ag. A este respecto, los RTL modificados de la invención muestran efectos poderosos y específicos de epítipo sobre la activación de las células T resultante, tal como se ejemplifica por su capacidad para estimular la secreción de citocinas antiinflamatorias (por ejemplo, IL-10). Cuando se conjugan con un resto tóxico, los RTL modificados de la invención también pueden usarse para destruir células T que tienen una especificidad de Ag particular. Por consiguiente, las moléculas de RTL dadas a conocer son útiles en una amplia variedad de aplicaciones tanto *in vivo* como *in vitro*.

Las moléculas de RTL modificado de la invención pueden producirse fácilmente mediante expresión recombinante en células procariotas y eucariotas, y pueden purificarse en grandes cantidades. Además, estas moléculas pueden cargarse fácilmente con cualquier antígeno de péptido deseado, haciendo que la producción de un repertorio de moléculas de MHC con diferentes especificidades de células T sea una tarea sencilla. Estos y otros aspectos de la invención se describen en más detalle a continuación en el presente documento.

#### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra HLA-DR2, RTL302, y la superficie accesible a disolvente de la plataforma de lámina  $\beta$  del RTL. El panel izquierdo (A) muestra un modelo a escala de una molécula de MHC de clase II sobre la superficie de una APC. El panel derecho (B) muestra RTL302, una molécula monocatenaria soluble derivada del dominio de unión a antígeno/reconocimiento de células T. El panel inferior derecho (C) muestra los residuos hidrófobos de la plataforma

de lámina beta de RTL302.

La figura 2 muestra cromatografía de exclusión molecular de RTL modificados. Se analizaron mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC) RTL purificados y replegados. El panel superior (A) muestra SEC de RTL302 (triángulo), RTL302(5S) (círculo) y RTL302(5D) (cuadrado). Estos RTL no contienen péptidos Ag fijados covalentemente. El panel inferior (B) muestra SEC de RTL derivados del HLA-DR2 de tipo natural que contienen el péptido Ag MBP-85-99 (RTL303, triángulo) o MOG-35-55 (RTL312, círculo) fijado covalentemente.

La figura 3 muestra espectros de dicroísmo circular (DC) de RTL derivados de DR2 modificados. El panel superior (A) muestra espectros de DC de RTL302 (triángulo), RTL302(5S) (círculo) y RTL302(5D) (cuadrado) "vacíos". El panel central (B) muestra espectros de DC de RTL que contienen el péptido Ag MBP-85-99 fijado covalentemente. RTL303, (triángulo), RTL320 (cuadrado) y RTL340 (rombo). El panel inferior (C) muestra curvas de desnaturalización térmica para RTL303, RTL320 y RTL340 que revelan un alto grado de cooperatividad y estabilidad.

La figura 4 muestra la medición directa de la unión de péptido a RTL derivados de HLA-DR2. Unión de MOG biotinilada a RTL302 (círculos abiertos), RTL302(5S) (rombos abiertos) y RTL302(5D) (cuadrados abiertos). El panel izquierdo (A) muestra saturación como función de la concentración de MOG biotinilada (la parte insertada muestra el análisis de Scatchard de la unión a péptido). El panel derecho (B) muestra la unión del péptido MOG biotinilado (0,15  $\mu$ M) a RTL como función del tiempo para comparar la tasa de unión inicial.

La figura 5 muestra que RTL342 monomérico, disperso fue tan eficaz como RTL312 en el tratamiento de EAE en animales transgénicos DR\*1501. Puntuaciones clínicas medias de ratones transgénicos para HLA-DR2 (DRB1\*1501/DRA\*0101) tratados con 33  $\mu$ g de RTL312 ( $\nabla$ ), RTL342 ( $\Delta$ ) o vehículo solo (Tris, pH 8,5) ( $\bullet$ ). Se inmunizó a todos los ratones por vía s.c. con 200  $\mu$ g de MOG-35-55 y 400  $\mu$ g de CFA conjuntamente con 100 ng de Ptx por vía i.v. en el día 0 y 266 ng de Ptx 2 días después de la inmunización. En el día 14 se distribuyó a todos los ratones en 6 grupos según su similitud en la enfermedad y el sexo. Se inyectó diariamente a los ratones por vía i.v. RTL312, RTL342 o vehículo. (n = 4 por grupo, excepto para el grupo con vehículo donde n = 3; las flechas indican tratamiento).

La figura 6 muestra la superficie de interacción entre el dominio  $\alpha 1\beta 1$  de unión a péptido/reconocimiento de células T y los dominios de plegamiento de Ig  $\alpha 2\beta 2$  de HLA-DR2. Se modeló y refinó la superficie de interacción entre el dominio  $\alpha 1\beta 1$  de unión a péptido/reconocimiento de células T y los dominios de plegamiento de Ig  $\alpha 2\beta 2$  usando la estructura 1BX2 de DR2 de clase II humana de alta resolución (Smith *et al.*, J. Exp. Med. 188:1511-20, 1998). Los dominios transmembrana se muestran esquemáticamente como cilindros de 0,5 nm. Los extremos amino y carboxilo terminales del MHC de clase II se marcan en N, C, respectivamente. Las cisteínas se interpretan como bola y varilla, al igual que los cinco residuos V102, I104, A106, F108, L110 (numeración 1BX2). La superficie de interacción (superficie de contacto de 4  $\text{\AA}$ ) entre los dominios de plegamiento de Ig y el dominio de unión a péptido/reconocimiento de células T se colorea por el potencial lipófilo (LP). Las moléculas de agua dentro de esta superficie de contacto en la estructura cristalina 1BX2 se muestran como esferas.

#### Definiciones

El término "MHC" se refiere al complejo mayor de histocompatibilidad.

El término "RTL", en singular o plural, se refiere ligandos de receptores de células T recombinantes humanos.

"Ag" se refiere a antígeno.

40 "APC" se refiere a célula presentadora de antígeno.

" $\beta$ -ME" se refiere a  $\beta$ -mercaptoetanol.

"DC" se refiere a dicroísmo circular.

"CFA" se refiere a adyuvante completo de Freund.

"DLS" se refiere a dispersión de luz dinámica.

45 "EAE" se refiere a encefalomiелitis autoinmunitaria experimental.

"ELISA" se refiere a ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas.

“HLA” se refiere a antígeno leucocitario humano.

“hu-” se refiere a ser humano.

“MBP” se refiere a proteína básica de mielina.

“MHC” se refiere a complejo mayor de histocompatibilidad.

5 “MOG” se refiere a glicoproteína oligodendrocítica de mielina, (secuencia murina).

“EM” se refiere a esclerosis múltiple.

“LDP” se refiere a leche desnatada en polvo.

“PBMC” se refiere a células mononucleares en sangre periférica.

“PBS” se refiere a solución salina tamponada con fosfato.

10 “PCR” se refiere a reacción en cadena de la polimerasa.

“Ptx” se refiere a una toxina pertúsica.

“RPMI” se refiere a medios de crecimiento para células desarrolladas en el Roswell Park Memorial Institute.

“TA” se refiere a temperatura ambiente.

15 “RTL” se refiere a ligando de receptor de células T recombinante (por ejemplo, RTL de G. G. Burrows, patente estadounidense n.º 6.270.772).

“S.C.” se refiere a por vía subcutánea.

“SEC” se refiere a cromatografía de exclusión molecular.

“STR-HRP” se refiere a conjugado de estreptavidina-peroxidasa de rábano.

“TCR” se refiere a receptor de células T.

20 “Tg” se refiere a transgénico.

“Identidad de secuencia” se refiere a la similitud entre secuencias de aminoácidos. La identidad de secuencia se mide frecuentemente en términos de la identidad (o similitud u homología) en porcentaje; cuanto mayor es el porcentaje, más similares son las dos secuencias. Las variantes de los polipéptidos de dominio de MHC inventivos poseerán un alto grado de identidad de secuencia cuando se alineen usando métodos convencionales.

25 “Polipéptido de dominio de MHC” se refiere a un dominio molecular de MHC diferenciado, por ejemplo un dominio  $\alpha 1$  o  $\beta 1$  de una molécula de MHC de clase II.

Descripción detallada de realizaciones a modo de ejemplo de la invención

30 Los RTL modificados de la invención comprenden un componente de complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) que incorpora una o más características estructurales de superficie rediseñadas que se han introducido de manera recombinante en una secuencia de polipéptido de MHC por lo demás nativa. Normalmente, los RTL modificados de la invención se diseñan o se construyen de manera racional para introducir uno o más cambios de aminoácido en un sitio diana expuesto a disolvente ubicado dentro de, o que define, una superficie de contacto de autounión encontrada en el polipéptido de MHC nativo.

35 La superficie de contacto de autounión que se altera en el RTL modificado normalmente comprende uno o más residuo(s) de aminoácido que media(n) la autoagregación de un polipéptido de MHC nativo, o de un RTL “no modificado” que incorpora el polipéptido de MHC nativo. Aunque la superficie de contacto de autounión está correlacionada con la estructura primaria del polipéptido de MHC nativo, esta superficie de contacto sólo puede aparecer como una característica de superficie que promueve la agregación cuando el polipéptido nativo se aísla del complejo de MHC intacto y se incorpora en el contexto de un RTL “no modificado”.

Por tanto, en determinadas realizaciones, la superficie de contacto de autounión sólo pueden funcionar como un residuo o motivo expuesto a disolvente de un RTL no modificado una vez que el polipéptido nativo se aísla de uno o más elemento(s) estructural(es) encontrados en una proteína de MHC intacta. En el caso de los RTL de MHC de clase II a modo de ejemplo descritos en el presente documento (por ejemplo, que comprende los dominios  $\beta 1$  y  $\alpha 1$  unidos), la estructura de  $\beta 1 \alpha 1$  nativa sólo muestra determinados residuos o motivos de autounión expuestos a disolvente tras la eliminación de los dominios de tipo plegamiento de Ig,  $\beta 2$  y  $\alpha 2$  encontrados en el complejo de MHC II intacto. Estos mismos residuos o motivos que median la agregación de RTL  $\beta 1 \alpha 1$  no modificados están “enterrados” presumiblemente en una conformación inaccesible a disolvente o “enmascarados” de otro modo (es decir, se evita que medien en la autoasociación) en el complejo de MHC II nativo o progenitor (probablemente a través de la asociación con los dominios de tipo plegamiento de Ig,  $\beta 2$  y  $\alpha 2$ ).

Determinados RTL modificados de la invención incluyen una estructura de múltiples dominios que comprende dominios de MHC de clase I o MHC de clase II seleccionados, o partes de múltiples dominios de MHC que son necesarios para formar una superficie de contacto de TCR/reconocimiento de Ag mínima (es decir, que pueda mediar unión a Ag y reconocimiento de TCR). En determinadas realizaciones, el RTL modificado comprende una “superficie de contacto de TCR mínima”, lo que significa un subconjunto mínimo de residuos de dominio de MHC de clase I o MHC de clase II necesarios y suficientes para mediar la unión a péptido funcional y el reconocimiento de TCR. El reconocimiento de TCR requiere que el RTL modificado pueda interactuar con el TCR de una manera específica de Ag para provocar una o más respuestas de células T mediadas por TCR, tal como se describe en el presente documento.

En el caso de los RTL modificados derivados de moléculas de MHC de clase II humanas, los RTL comprenderán habitualmente dominios de polipéptido de MHC  $\alpha 1$  y  $\beta 1$  de una proteína de MHC de clase II, o partes de los mismos suficientes para proporcionar una superficie de contacto de TCR mínima. Estos dominios o subpartes de los mismos pueden unirse covalentemente para formar un polipéptido monocatenario (sc) de MHC de clase II. Tales polipéptidos de RTL se denominan a continuación en el presente documento polipéptidos de MHC de clase II sc “ $\alpha 1 \beta 1$ ”. Pueden modelarse constructos de MHC sc equivalente a partir de proteínas de MHC de clase I humanas, por ejemplo para formar RTL que comprenden dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  (o partes de los mismos suficientes para proporcionar una superficie de contacto de TCR mínima) de una proteína de MHC de clase I, en los que el RTL está opcionalmente “vacío” o asociado con un Ag que comprende un epítipo de células T CD8+.

Se ha mostrado que los constructos de RTL que comprenden componentes de MHC sc son ampliamente útiles para aplicaciones tales como prevenir y tratar respuestas de enfermedad autoinmunitaria inducida por Ag en sujetos modelo de mamíferos predictivos de actividad terapéutica de enfermedad autoinmunitaria en seres humanos (Burrows *et al.*, J. Immunol. 161:5987, 1998; Burrows *et al.*, J. Immunol. 164:6366, 2000). En otros aspectos, se ha demostrado que estos tipos de RTL inhiben la activación de células T e inducen la secreción de citocina antiinflamatoria (por ejemplo, IL-10) en clones de células T restringidos por DR2 humanos específicos para el péptido MBP- 85-95 o BCR-ABL b3a2 (CABL) (Burrows *et al.*, J. Immunol. 167:4386, 2001; Chang *et al.*, J. Biol. Chem. 276:24170, 2001).

Los inventores de la presente solicitud han diseñado y han sometido a prueba constructos de RTL adicionales, que incluyen un constructo MOG-35-55/DR2 (VG312) que se ha mostrado que inhibe de manera potente las respuestas autoinmunitarias y conduce a tolerancia inmunológica al péptido MOG-35-55 encefalitogénico y signos de clínicos e histológicos de inversión de EAE (Vandenbark *et al.*, J. Immunol. 171:127-33, 2003). Numerosos constructos de RTL adicionales que son útiles para modular respuestas inmunitarias de células T y que pueden emplearse dentro de la invención, están disponibles para su uso dentro de los métodos y composiciones de la invención (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.270.772, expedida el 7 de agosto de 2001; la solicitud de patente provisional estadounidense n.º 60/064.552, presentada el 16 de septiembre de 1997; la solicitud de patente provisional estadounidense n.º 60/064.555, presentada el 16 de septiembre de 1997; la solicitud de patente provisional estadounidense n.º 60/200.942, presentada el 1 de mayo de 2000; la solicitud de patente provisional estadounidense titulada MONOMERIC RECOMBINANT MHC MOLECULES USEFUL FOR MANIPULATION OF ANTIGEN-SPECIFIC T-CELLS, presentada por Burrows *et al.* el 5 de septiembre de 2003 e identificada por el expediente del apoderado n.º 49321-98; la solicitud de patente estadounidense n.º 09/153.586; presentada el 1 de mayo de 2001; la solicitud de patente estadounidense n.º 09/847.172; presentada el 1 de mayo de 2001; y la solicitud de patente estadounidense n.º 09/858.580; presentada el 15 de mayo de 2001, incorporadas cada una al presente documento como referencia).

Para evaluar la función biológica y los mecanismos de acción de los RTL modificados de la invención, se han usado células T específicas de antígeno que portan TCR relacionados como células T diana para diversos ensayos (véase, por ejemplo, Burrows *et al.*, J. Immunol. 167:4386, 2001). Más recientemente, los inventores de la presente solicitud han proporcionado hibridomas de células T novedosos que están adaptados únicamente para su uso en exámenes y ensayos para identificar y caracterizar la estructura y la función de RTL (véase, por ejemplo, la solicitud de patente provisional estadounidense n.º 60/586.433, presentada el 7 de julio; y Chou *et al.*, J. Neurosci. Res. 77: 670-680, 2004). Para poner en práctica estos aspectos de la invención, se construyen y se seleccionan híbridos de células T

que muestran una respuesta proliferativa mediada por TCR específica de Ag tras el contacto del híbrido con una APC y Ag relacionados. Esta respuesta proliferativa de híbridos de T puede inhibirse o estimularse a su vez de manera detectable poniendo en contacto el híbrido de células T con un RTL modificado de interés, lo que produce una respuesta de proliferación mediada por TCR, específica de Ag, modificada del híbrido. La respuesta de proliferación modificada de la célula híbrida indica de manera exacta y reproducible una presencia, cantidad y/o nivel de actividad del RTL modificado en contacto con el híbrido de células T.

El componente de MHC del RTL puede proporcionarse como un RTL "vacío", o puede asociarse mediante unión no covalente o enlace covalente con un Ag de péptido seleccionado. Normalmente, el Ag de péptido comprende uno o más determinante(s) antigénico(s) de una proteína autoantigénica, por ejemplo uno o más epítipo(s) inmunodominante(s) de células T CD4+ asociado(s) con una enfermedad autoinmunitaria seleccionada (por ejemplo, un epítipo inmunodominante de proteína básica de mielina (MBP) o proteína oligodendrocítica de mielina (MOG) implicada en EM).

Dentro de determinadas realizaciones de la invención, un RTL recombinante modificado, aislado que tiene un potencial reducido para agregarse en disolución, comprende un "componente de MHC" en forma de un polipéptido monocatenario (sc) que incluye múltiples elementos de dominio de MHC unidos covalentemente. Estos elementos de dominio normalmente se seleccionan de a) dominios  $\alpha 1$  y  $\beta 1$  de un polipéptido de MHC de clase II, o partes de los mismos, que comprende una superficie de contacto de cavidad de unión a Ag/receptor de células T (TCR); o b) dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  de un polipéptido de MHC de clase I, o partes de los mismos, que comprenden una superficie de contacto de cavidad de unión a Ag/TCR. El componente de MHC del RTL está modificado por una o más sustituciones, adiciones, deleciones o transposiciones de aminoácido en un sitio diana correspondiente a una "superficie de contacto de autounión" identificada en un componente de polipéptido de MHC nativo de un RTL no modificado. El RTL modificado muestra una propensión marcadamente reducida para agregarse en disolución en comparación con la agregación mostrada por un RTL control, no modificado que tiene la misma estructura fundamental de componente de MHC, pero que incorpora el polipéptido de MHC nativo que define la superficie de contacto de autounión.

Tal como se usa en el presente documento, "polipéptido de MHC nativo" se refiere a polipéptidos de MHC que se producen de manera natural, intactos, así como a fragmentos, dominios, conjugados u otros derivados de polipéptidos de MHC modificados por ingeniería genética o sintéticos que tienen una secuencia de aminoácidos idéntica o altamente conservada en comparación con una secuencia alineada en el polipéptido de MHC que se produce de manera natural (por ejemplo, marcado por una identidad de aminoácidos del 85%, el 90%, el 95% o mayor a lo largo de un tramo alineado de residuos correspondientes). El "polipéptido de MHC nativo" que tiene la superficie de contacto de autoasociación será a menudo un dominio de polipéptido de MHC incorporado dentro de un RTL no modificado, y la superficie de contacto de autoasociación puede estar presente solo en tal contexto, en contraposición a cuando el polipéptido de MHC nativo está presente en una proteína de MHC nativa, completamente intacta (por ejemplo, en un complejo de proteína heterodimérica de MHC de clase II).

Por tanto, en el caso de RTL de MHC de clase II, la eliminación de los dominios  $\beta 2$  y  $\alpha 2$  para crear una estructura de dominio más pequeña, más útil (por ejemplo,  $\beta 1 \alpha 1$ ) para el RTL (que comprende una superficie de contacto de TCR mínima) da como resultado el "desenmascaramiento" (es decir, hacer que queden expuestos a disolvente) de determinados residuos o motivos de autounión que comprenden sitios diana para modificación de RTL según la invención. Estos residuos o motivos desenmascarados pueden alterarse fácilmente, por ejemplo mediante mutagénesis dirigida al sitio, para reducir o eliminar la agregación y hacer que el RTL sea un reactivo más altamente monodisperso en disolución acuosa.

Para evaluar el grado de monodispersión de estos RTL modificados, puede emplearse un RTL no modificado o "control" que tiene la misma construcción de polipéptido básica que el RTL modificado, pero características de la secuencia de polipéptido de MHC nativo (que tiene uno o más residuos de aminoácido o motivos que comprenden la superficie de contacto de autounión y que definen el sitio diana expuesto a disolvente para la modificación cuando el polipéptido nativo se incorpora en el RTL).

Los RTL modificados de la invención producen un porcentaje aumentado de moléculas monodispersas en disolución en comparación con un RTL no modificado correspondiente (es decir, que comprende el polipéptido de MHC nativo y que portan la superficie de contacto de autounión, no modificada). En determinadas realizaciones, el porcentaje de RTL no modificado presente como especie monodispersa en disolución acuosa puede ser de tan solo el 1%, más normalmente el 5-10% o menos de la proteína RTL total, encontrándose el equilibrio del RTL no modificado en forma de agregados de orden superior. En cambio, los RTL modificados de la presente invención producirán al menos el 10%-20% de especies monodispersas en disolución. En otras realizaciones, el porcentaje de especies monoméricas en disolución oscilará entre el 25%-40%, a menudo el 50%-75%, hasta el 85%, el 90%, el 95% o mayor del RTL total presente, con una reducción proporcional en el porcentaje de especies de RTL agregadas en comparación con las cantidades observadas para los RTL no modificados correspondientes en condiciones comparables.

La superficie de contacto de autounión que se altera en el polipéptido de MHC para formar el RTL modificado puede comprender residuos de aminoácido individuales o múltiples, o una región, dominio o motivo definido del polipéptido de MHC, que se caracteriza por una capacidad para mediar la autounión o autoasociación del polipéptido de MHC y/o RTL. Tal como se usa en el presente documento, "autounión" y "autoasociación" se refieren a cualquier unión o asociación intermolecular que promueve la del polipéptido de MHC o RTL en una disolución fisiológicamente compatible, tal como agua, solución salina o suero.

Tal como se observó anteriormente, las moléculas de MHC de clase II comprenden cadenas de polipéptido  $\alpha$  y  $\beta$  asociadas no covalentemente. La cadena  $\alpha$  comprende dos dominios distintos denominados  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ . La cadena  $\beta$  también comprende dos dominios,  $\beta 1$  y  $\beta 2$ . La cavidad de unión a péptido del MHC de clase II está formada por la interacción de los dominios  $\alpha 1$  y  $\beta 1$ . Los péptidos del antígeno procesado se unen a moléculas de MHC en la cavidad distal a la membrana formada por los dominios  $\beta 1$  y  $\alpha 1$  (Brown *et al.*, 1993; Stem *et al.*, 1994). El análisis estructural de los complejos MHC de clase II/péptido (Brown *et al.*, Nature 364:33-39, 1993; Stem *et al.*, Nature 368:215, 1994) demuestra que las cadenas laterales del péptido unido interaccionan con "cavidades" que están compuestas por residuos polimórficos dentro de la cavidad de unión de clase II. Los péptidos unidos tienen motivos específicos de alelo de clase II, caracterizados por fuertes preferencias por aminoácidos específicos en posiciones que anclan el péptido a la cavidad de unión y una amplia tolerancia para una variedad de diferentes aminoácidos en otras posiciones (Stem *et al.*, Nature 368:215, 1994; Rammensee *et al.*, Immunogenetics 41: 178, 1995). Basándose en estas propiedades, las poblaciones naturales de moléculas de MHC de clase II son altamente heterogéneas. Un alelo dado de moléculas de clase II sobre la superficie de una célula tiene capacidad para unirse a y presentar más de 2000 péptidos diferentes. Además, los péptidos unidos se disocian de las moléculas de clase II con constantes de velocidad muy lentas. Por tanto, ha sido difícil generar u obtener poblaciones homogéneas de moléculas de clase II unidas a péptidos antigénicos específicos.

Los dominios  $\alpha 2$  y  $\beta 2$  de moléculas de MHC de clase II comprenden distintos dominios de plegamiento de Ig transmembrana que anclan las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  en la membrana de la APC. Además, se notifica que el dominio  $\alpha 2$  contribuye a la oligomerización ordenada durante la activación de las células T (Konig *et al.*, J. Exp. Med. 182:778-787, 1995), mientras que se notifica que el dominio  $\beta 2$  contiene un sitio de unión de CD4 que se une conjuntamente a CD4 cuando el complejo MHC-antígeno interacciona con el heterodímero  $\alpha\beta$  de TCR (Fleury *et al.*, Cell 66:1037-1049, 1991; Cammarota *et al.*, Nature 356:799-801, 1992; König *et al.*, Nature 356:796-798, 1992; Huang *et al.*, J. Immunol. 158:216-225, 1997).

Los RTL modelados según moléculas de MHC de clase II para su uso dentro de la invención normalmente comprenden moléculas pequeñas (por ejemplo, de aproximadamente 200 residuos de aminoácido) que comprenden todos o parte de los dominios  $\alpha 1$  y  $\beta 1$  de moléculas humanas y no humanas de clase II, que normalmente se unen genéticamente a una única cadena de polipéptido (con y sin péptido antigénico acoplado covalentemente). A modo de ejemplo, las moléculas " $\beta 1\alpha 1$ " derivadas de MHC de clase II conservan las propiedades bioquímicas requeridas para la unión a péptido y el acoplamiento de TCR (incluyendo unión de TCR y/o activación de TCR parcial o completa). Esto proporciona la producción fácil de grandes cantidades de RTL modificados por ingeniería genética para la caracterización estructural y aplicaciones inmunoterápicas. El componente de MHC de RTL de MHC de clase II comprende una superficie de contacto de unión a Ag/reconocimiento de células T mínima, que puede comprender todos o parte de los dominios  $\alpha 1$  y  $\beta 1$  del MHC de clase II de una molécula de MHC de clase II seleccionada. Estos RTL se diseñan usando el esqueleto estructural de las moléculas de MHC de clase II como molde. La caracterización estructural de los RTL usando difracción circular indica que estas moléculas conservan una plataforma de lámina  $\beta$  antiparalela y hélices  $\alpha$  antiparalelas observadas en el heterodímero de MHC de clase II nativo (es decir, secuencia de tipo natural) correspondiente. Estos RTL también muestran una transición de plegamiento-desplegamiento térmica de dos estados cooperativos. Cuando el RTL se une covalentemente con el péptido Ag a menudo muestran estabilidad aumentada a desplegamiento térmico en relación con moléculas de RTL vacías.

En realizaciones a modo de ejemplo de la invención, el diseño de RTL se basa de manera racional en coordenadas cristalográficas de proteínas HLA-DR, HLA-DQ y/o HLA-DP humanas, o de una proteína de MHC de clase II no humana (por ejemplo, murina o de rata). En este contexto, se han diseñado RTL a modo de ejemplo basándose en datos cristalográficos para HLA DR1 (código de acceso de PDB, 1AQD), cuyos parámetros de diseño ya se han aclarado, por ejemplo, mediante alineación de secuencias con otras moléculas de MHC de clase II de especies de rata, ser humano y ratón. El programa Sybilo (Tripos Associates, St Louis, MO) es una herramienta de diseño a modo de ejemplo que puede usarse para generar imágenes gráficas usando, por ejemplo, una estación de trabajo O2 (Silicon Graphics, Mountain View, CA) y coordenadas obtenidas para moléculas de HLA-DR, HLA-DQ y/o HLA-DP. Se proporcionan amplias caracterizaciones cristalográficas para éstas y otras proteínas de MHC de clase II depositadas en el banco de datos de proteínas de Brookhaven (Brookhaven National Laboratories, Upton, NY).

Una descripción detallada de las estructuras cristalinas de HLA-DR para su uso en el diseño y la construcción de RTL modificados de la invención se proporciona, por ejemplo, en Ghosh *et al.*, Nature 378:457, 1995; Stem *et al.*, Nature 368:215, 1994; Murthy *et al.*, Structure 5:1385, 1997; Bolin *et al.*, J. Med. Chem. 43:2135, 2000; Li *et al.*, J.

Mol. Biol. 304:177, 2000; Hennecke *et al.*, Embo J. 19:5611, 2000; Li *et al.*, Immunity 14:93,2001; Lang *et al.*, Nat. Immunol. 3:940, 2002; Sundberg *et al.*, J. Mol. Biol. 319:449, 2002; Zavala-Ruiz *et al.*, J. Biol. Chem. 278:44904, 2003; Sundberg *et al.*, Structure 11:1151, 2003. Una descripción detallada de las estructuras cristalinas de HLA-DQ se proporciona, por ejemplo, en Sundberg *et al.*, Nat. Struct. Biol. 6:123, 1999; Li *et al.*, Nat. Immunol. 2:501, 2001; y Siebold *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 101:1999, 2004. Una descripción detallada de una molécula de MHC I-A<sup>U</sup> murina se proporciona, por ejemplo, en He *et al.*, Immunity 17:83,2002. Una descripción detallada de una molécula de MHC de clase II I-Ad murina se proporciona, por ejemplo, en Scott *et al.*, Immunity 8 :319, 1998. Una descripción detallada de una molécula de MHC de clase II I-Ak murina se proporciona, por ejemplo, en Reinherz *et al.*, Science 286:1913, 1999, y Miley *et al.*, J. Immunol. 166:3345, 2001. Una descripción detallada de un alelo I-A(G7) de MHC murino se proporciona, por ejemplo, en Corper *et al.*, Science 288:501, 2000. Una descripción detallada de una molécula de MHC de clase II H2-M murina se proporciona, por ejemplo, en Fremont *et al.*, Immunity 9:385, 1998. Una descripción detallada de una molécula de MHC de clase II H2-Ie $\beta$  murina se proporciona, por ejemplo, en Krosgaard *et al.*, Mol. Cell 12:1367, 2003. Una descripción detallada de una molécula de MHC de clase II I-Ab murina se proporciona, por ejemplo, en Zhu *et al.*, J. Mol. Biol. 326:1157,2003. HLA-DP Lawrance *et al.*, Nuclei Acids Res. 25 de octubre de 1985; 13(20): 7515-7528.

El modelado por homología basado en la estructura se basa en coordenadas cristalográficas refinadas de una o más moléculas de MHC de clase I o clase II, por ejemplo, una molécula de DR humana y una molécula de I-E<sup>k</sup> murina. En un estudio a modo de ejemplo realizado por Burrows y colegas (Protein Engineering 12:771-778, 1999), se alinearon las secuencias primarias de MHC de clase II de rata, ser humano y ratón, a partir de lo cual se determinó que 76 de los 256 aminoácidos de la cadena  $\alpha$  eran idénticos (el 30%), y que 93 de los 265 aminoácidos de la cadena  $\beta$  eran idénticos (el 35%). De particular interés, se conservó la ubicación en la secuencia primaria de cisteínas de unión de disulfuro en las tres especies y restos del esqueleto de las estructuras resueltas que mostraron fuerte homología cuando se superponían, lo que implicaba un motivo estructural conservado evolutivamente, con sustituciones de cadena lateral diseñadas para permitir la unión a péptido antigénico diferencial en la hendidura de unión a péptido.

El análisis adicional de moléculas de MHC de clase I y clase II para construir los RTL modificados de la invención se centra en la superficie "expuesta" (es decir, accesible a disolvente) de la plataforma de lámina  $\beta$  hélice  $\alpha$  antiparalela que comprende el/los dominio(s) implicado(s) en la unión a péptido y el reconocimiento de células T. En el caso de las moléculas de MHC de clase II, los dominios  $\alpha 1$  y  $\beta 1$  muestran una amplia red de enlaces de hidrógeno y un núcleo hidrófobo estrechamente empaquetado y "enterrado" (es decir, inaccesible a disolvente). Esta estructura terciaria es similar a las características moleculares que confieren integridad estructural y estabilidad termodinámica a la característica de soporte de hélice  $\alpha$  lámina  $\beta$  de las toxinas de escorpión, que por tanto presentan indicios estructurales todavía adicionales para guiar el diseño racional de los RTL modificados en el presente documento (véase, por ejemplo, Zhao *et al.*, J. Mol. Biol. 227:239, 1992; Housset, J. Mol. Biol. 238:88-91, 1994; Zinn-Justin *et al.*, Biochemistry 35:8535-8543, 1996).

A partir de estas y otras fuentes de datos comparativos, se ha encontrado que los cristales de moléculas de MHC de clase II nativas contienen varias moléculas de agua entre una superficie proximal a la membrana de la plataforma de lámina  $\beta$  y una superficie distal a la membrana de los dominios de plegamiento de Ig  $\alpha 2$  y  $\beta 2$ . Los cálculos respecto al área superficial de interacción entre dominios pueden cuantificarse creando una superficie molecular, por ejemplo para los dominios de plegamiento de Ig  $\beta 1 \alpha 1$  y  $\alpha 2 \beta 2$  de una molécula de MHC II, usando un algoritmo tal como el descrito por Connolly (Biopolymers 25:1229-1247, 1986) y usando coordenadas cristalográficas (por ejemplo, tal como se proporciona para diversas moléculas de MHC de clase II en la base de datos de proteínas de Brookhaven.

Para una molécula de MHC de clase II DR1 humana a modo de ejemplo (números de acceso de PDB 1 SEB, 1AQD), se calcularon independientemente las áreas superficiales de los dominios de plegamiento de Ig  $\beta 1 \alpha 1$  y  $\alpha 2 \beta 2$ , definidas por la accesibilidad a una sonda de radio 0,14 nm, aproximadamente el tamaño de una molécula de agua (Burrows *et al.*, Protein Engineering 12:771-778, 1999). El área superficial del heterodímero de MHC de clase II  $\alpha \beta$  fue de 156 nm<sup>2</sup>, mientras que la del constructo  $\beta 1 \alpha 1$  fue de 81 mm<sup>2</sup> y la de los dominios de plegamiento de Ig  $\alpha 2 \beta 2$  fue de 90 nm<sup>2</sup>. Se encontró que aproximadamente 15 mm<sup>2</sup> (el 18,5%) de la superficie de  $\beta 1 \alpha 1$  estaban enterrados por la superficie de contacto con los dominios de plegamiento de Ig en el heterodímero de MHC de clase II  $\alpha \beta$ . Se analizaron las interacciones de cadenas laterales entre los dominios de unión a péptido  $\beta 1 \alpha 1$  y de plegamiento de Ig ( $\alpha 2$  y  $\beta 2$ ) y se mostró que estaban dominadas por interacciones polares, sirviendo las interacciones hidrófobas potencialmente como "lubricante" en una superficie de contacto de tipo "esfera y cavidad" altamente flexible.

Estos estudios de modelado y otros relacionados sugieren que el dominio de unión a antígeno de las moléculas de MHC de clase II permanece estable en ausencia de los dominios de plegamiento de Ig  $\alpha 2$  y  $\beta 2$ , y esta producción se ha confirmado por la producción de numerosos RTL, a modo de ejemplo, que comprenden una arquitectura de MHC de clase II " $\alpha 1 \beta 1$ ". Burrows *et al.* (J. Immunol. 161:5987-5996, 1998) describieron hallazgos relacionados para un RTL  $\beta 1 \alpha 1$  "vacío" y cuatro constructos de RTL  $\alpha 1 \beta 1$  con péptidos antigénicos de rata y cobaya acoplados covalentemente:  $\beta 1$  1-Rt-MBP-72-89,  $\beta 1$  1-Gp-MBP-72-89,  $\beta 1$  1-Gp-MBP-55-69 y  $\beta 1$  1-Rt-CM-2. Para cada uno de

5 estos constructos, se demostró la presencia de enlaces disulfuro nativos entre cisteínas (B 15 y  $\beta 79$ ) mediante ensayo de desplazamiento en gel con o sin el agente reductor  $\beta$ -mercaptoetanol ( $\beta$ -ME). En ausencia de  $\beta$ -ME, los enlaces disulfuro se conservan y las proteínas de RTL normalmente se mueven a través de geles de acrilamida más rápido debido a su estructura más compacta. Estos datos, junto con hallazgos inmunológicos usando anticuerpos monoclonales específicos frente a MHC de clase II para marcar epítomos conservados en los RTL, generalmente afirman la integridad conformacional de las moléculas de RTL en comparación con sus homólogos de MHC II nativos (Burrows *et al.*, 1998, citado anteriormente; Chang *et al.*, J. Biol. Chem. 276:24170-14176, 2001; Vandenberg *et al.*, J. Immunol. 171:127-133, 2003). De manera similar, estudios de difracción circular (DC) de RTL derivados de MHC de clase II revelan que las moléculas de  $\beta 1 \alpha 1$  tienen estructuras secundarias altamente ordenadas. Normalmente, los RTL de esta construcción general compartían la estructura secundaria de plataforma de lámina  $\beta$ /hélice  $\alpha$  antiparalela común a todos los dominios de unión a antígeno de clase II. En este contexto, se ha encontrado que las moléculas  $\beta 1 \alpha 1$  contienen, por ejemplo, aproximadamente el 30% de hélices  $\alpha$ , el 15% de cadenas  $\beta$ , el 26% de giros  $\beta$  y el 29% de estructuras helicoidales al azar. Los RTL unidos covalentemente al péptido Ag (por ejemplo, MBP-72-89, y CM-2) muestran características estructurales secundarias similares, aunque no idénticas. Estudios de desnaturalización térmica revelan un alto grado de cooperatividad y estabilidad de las moléculas de RTL, y se ha demostrado la integridad biológica de estas moléculas en numerosos contextos, incluyendo mediante la capacidad de RTL seleccionados para detectar e inhibir células T encefalitogénicas de rata y para tratar la encefalomiелitis autoinmunitaria experimental.

20 Según estos hallazgos y otros relacionados proporcionados en el presente documento (o descritos en la referencias citadas que se incorporan colectivamente en el presente documento para todos los fines de descripción), los constructos de RTL de la invención, con o sin un péptido antigénico asociado, conservan la integridad estructural y conformacional que concuerda con la de las moléculas de MHC nativas plegadas. Este hallazgo general se ejemplifica mediante los resultados para moléculas de RTL monocatenarias solubles derivadas de la superficie de contacto de unión a antígeno/TCR compuestas por todos o partes de los dominios de MHC de clase II  $\beta 1$  y  $\alpha 1$ . En realizaciones más detalladas, estos RTL de MHC de clase II, a modo de ejemplo, carecen del dominio  $\alpha 2$  y el dominio  $\beta 2$  de la proteína de MHC de clase II nativa correspondiente, y normalmente también excluyen las secuencias transmembrana e intracitoplasmáticas encontradas en la proteína de MHC II nativa. El tamaño reducido y la complejidad de estos constructos de RTL, ejemplificados por los constructos de RTL del MHC II " $\beta 1 \alpha 1$ ", proporcionan una expresión y purificación de las moléculas de RTL fácil y predecible a partir de cuerpos de inclusión bacterianos con alto rendimiento (por ejemplo, hasta 15-30 mg/l de cultivo celular o rendimiento mayor).

35 En las moléculas de MHC de clase II nativas, el dominio de unión a péptido/reconocimiento de células T está formado por partes bien definidas de los dominios  $\alpha 1$  y  $\beta 1$  de los polipéptidos  $\alpha$  y  $\beta$  que se pliegan juntos para formar una estructura terciaria, descrita de la manera más sencilla como una plataforma de lámina  $\beta$  sobre la que dos segmentos helicoidales antiparalelos interaccionan para formar una hendidura de unión a antígeno. Se forma una estructura similar mediante un único exón que codifica para los dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  de moléculas de MHC de clase I, con la excepción de que la hendidura de unión a péptido del MHC de clase II tiene los extremos abiertos, permitiendo la modificación por ingeniería genética de constructos de un único exón que codifican para el dominio de unión a péptido/reconocimiento de células T y un ligando de péptido antigénico.

40 Tal como se ejemplifica en el presente documento para las proteínas de MHC de clase II, los estudios de modelado destacaron importantes características respecto a la superficie de contacto entre los dominios de plegamiento de Ig  $\beta 1 \alpha 1$  y  $\alpha 2 \beta 2$  que han demostrado ser críticos para diseñar los RTL monodispersos, modificados de la invención. Los dominios  $\alpha 1$  y  $\beta 1$  muestran una amplia red de enlaces de hidrógeno y un núcleo hidrófobo estrechamente empaquetado y "enterrado" (es decir, inaccesible a disolvente). La parte  $\beta 1 \alpha 1$  de las proteínas de MHC de clase II puede tener la capacidad para moverse como una única entidad independiente de la "plataforma" de plegamiento de Ig  $\alpha 2 \beta$ . Además de la evidencia de un alto grado de movilidad en las cadenas laterales que constituyen las regiones de ligador entre estos dos dominios, los cristales de MHC de clase II I-Ek contenían varias moléculas de agua dentro de esta superficie de contacto (Jardetzky *et al.*, Nature 368: 711-715, 1994; Fremont *et al.*, Science 272:1001-1004, 1996; Murthy *et al.*, Structure 5:1385, 1997). La superficie de contacto entre los dominios de plegamiento de Ig  $\beta 1 \alpha 1$  y  $\alpha 2 \beta 2$  parece estar dominada por interacciones polares, con residuos hidrófobos que sirven probablemente como "lubricante" en una superficie de contacto de tipo "bola y cavidad" altamente flexible. Puede requerirse flexibilidad en esta superficie de contacto para la libertad de movimiento dentro de los dominios  $\alpha 1$  y  $\beta 1$  para la unión/intercambio de antígeno de péptido. Alternativamente o en combinación, esta superficie de interacción puede desempeñar un papel en comunicar información sobre la interacción molecular MHC de clase II-péptido con TCR de vuelta a la APC.

55 Siguiendo estas directrices y parámetros de diseño racional, los presentes inventores han modificado satisfactoriamente por ingeniería genética derivados monodispersos de RTL humanos unicatenarios que comprenden partes de unión a péptido/reconocimiento de TCR de moléculas de MHC de clase II humanas (por ejemplo, tal como se ejemplifica, mediante HLA-DR2b (DRA\*0101/DRB1\*1501). Los RTL no modificados construidos a partir de los dominios  $\alpha 1$  y  $\beta 1$  de esta molécula de MHC de clase II, a modo de ejemplo, conservaban la actividad biológica, pero se formaban agregados de orden de orden superior, no deseados, en disolución.

Para resolver el problema de la agregación en este RTL no modificado a modo de ejemplo, se dirigió mutagénesis dirigida al sitio hacia la sustitución de residuos hidrófobos por residuos polares (por ejemplo, serina) o cargados (por ejemplo, ácido aspártico) para modificar la plataforma de lámina  $\beta$  de los RTL derivados de DR2. Según este procedimiento de diseño racional, se obtuvieron variantes de RTL novedosas que se determinó que eran predominantemente monoméricas en disolución. La cromatografía de exclusión molecular y la dispersión de luz dinámica demostraron que los RTL modificados novedosos eran monoméricos en disolución, y la caracterización estructural usando dicroísmo circular demostró una estructura secundaria altamente ordenada de los RTL.

Se cuantificó la unión de péptidos a estos RTL modificados "vacíos" usando péptidos biotinilados, y estudios funcionales mostraron que los RTL modificados que contienen péptidos fijados covalentemente podían inhibir la proliferación específica de antígeno de células T *in vitro*, así como suprimir la encefalomiелitis autoinmunitaria experimental *in vivo*. Estos estudios demostraron que los RTL que codifican para el dominio de unión a Ag/reconocimiento de TCR de moléculas de MHC de clase II son de manera innata estructuras muy robustas. Pese a la modificación de los RTL tal como se describe en el presente documento, que comprende mutaciones dirigidas al sitio que modifican la plataforma de lámina  $\beta$  del RTL, estas moléculas conservaban una actividad biológica potente de manera separada de los dominios de plegamiento de Ig de la estructura de clase II progenitora, y mostraban una reducción novedosa y sorprendente en la agregación en disoluciones acuosas. Los RTL modificados que tenían estas y otras características de superficie rediseñadas y características monodispersas, conservaban la capacidad de unirse a péptidos Ag, inhibir la proliferación de células T de una manera específica de Ag, y tratar, entre otras, la enfermedad autoinmunitaria *in vivo*.

Pueden introducirse modificaciones adicionales aparte de las modificaciones de característica de superficie anteriores en los RTL modificados de la invención, incluyendo particularmente modificaciones minoritarias en la(s) secuencia(s) de aminoácidos del componente de MHC del RTL que es probable que produzcan poco o ningún cambio en la actividad de la molécula de RTL derivada o "variante". Las variantes preferidas de polipéptidos de dominio de MHC no agregantes que comprenden RTL modificados se caracterizan normalmente por poseer una identidad de secuencia de al menos el 50% calculada a lo largo de la alineación de longitud completa con la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de dominio de MHC no agregante particular, usando Gapped BLASTP, Blast 2.0 del NCBI, configurado para parámetros por defecto. Las proteínas con incluso mayor similitud con las secuencias de referencia mostrarán identidades en porcentaje crecientes cuando se evalúen mediante este método, tal como una identidad de secuencia de al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 90% o al menos el 95%. Cuando se compara menos de la secuencia completa para determinar la identidad de secuencia, las variantes normalmente poseerán una identidad de secuencia de al menos el 75% a lo largo de intervalos cortos de 10-20 aminoácidos, y pueden poseer identidades de secuencia de al menos el 85% o al menos el 90% o el 95% dependiendo de su similitud con la secuencia de referencia. Se conocen en la técnica métodos para determinar la identidad de secuencia a lo largo de tales intervalos cortos tal como se describió anteriormente. Las variantes de RTL modificados que comprenden polipéptidos de dominio de MHC no agregantes también conservan la actividad biológica del RTL modificado no variante. Para los fines de esta invención, esa actividad puede someterse a ensayo convenientemente incorporando la variación en el componente de MHC apropiado de un RTL modificado (por ejemplo, un componente de MHC  $\beta 1 \alpha 1$ ) y determinando la capacidad del complejo RTL/Ag resultante para inhibir la proliferación específica de Ag de células T *in vitro*, tal como se describe en el presente documento.

Mutaciones diseñadas racionalmente convirtieron complejos de ligandos de receptores de células T recombinantes humanos en monómeros que conservan la actividad biológica

Los solicitantes en el presente documento demuestran y dan a conocer que la actividad biológica potente de RTL particulares (Burrows *et al.*, J. Immunol. 167:4386-95; 2001; Wang *et al.*, The Journal of Immunology, 2003; Vandenbark *et al.*, Journal of Immunology, 2003) se conservaba cuando se producían en forma monomérica, con la capacidad para inhibir la proliferación de células T *in vitro*. Es extremadamente importante desde un punto de vista clínico que la forma monomérica pueda invertir los signos clínicos de EAE e inducir tolerancia de células T a largo plazo contra el péptido MOG-35-55 encefalitogénico, restringido por DR2, en ratones Tg que expresan únicamente este alelo HLA-DR2 asociado con esclerosis múltiple.

Estudios anteriores de los solicitantes habían demostrado que la inmunización de ratones Tg-DR2 con el péptido MOG-35-55 inducía fuertes respuestas de células T, lesiones de médula espinal perivascular con desmielinización, y signos crónicos graves de EAE, así como anticuerpos anti-MOG que aparentemente no estaban implicados ni en la enfermedad ni en la inducción a tolerancia (Vandenbark *et al.*, Journal of Immunology, 2003).

Tal como se da a conocer en el presente documento, el tratamiento de los ratones Tg-DR2 tras el comienzo de EAE clínica con un ciclo de 8 días de inyecciones i.v. diarias de 33 mg de RTL342 invirtió la progresión de la enfermedad hasta niveles iniciales y mantuvo la actividad clínica reducida incluso tras el cese de inyecciones adicionales. El tratamiento con RTL303 control que contenía MBP-87-99 fijado covalentemente no inhibió la EAE ni afectó a las respuestas de células T al péptido MOG-35-55, demostrando especificidad de antígeno.

De manera significativa, las enseñanzas de los solicitantes son las primeras en documentar que los RTL monoméricos tienen tal actividad clínica potente y que las moléculas son adecuadas para la evaluación para su uso en ensayos clínicos con seres humanos para el tratamiento de la esclerosis múltiple.

5 El dominio de unión a péptido/reconocimiento de TCR del MHC de clase II del que se derivan los RTL contiene una mezcla compleja de estructura secundaria de hélice alfa y lámina beta, así como una modificación postraducional altamente conservada, un enlace disulfuro entre cisteínas en la posición 16 y 80 (numeración de RTL302). Estas moléculas son lo suficientemente pequeñas como para examinarlas sistemáticamente con la tecnología disponible actualmente, aunque lo suficientemente complejas como para que la modificación por ingeniería genética satisfactoria de otras moléculas y derivados de MHC, abarcando las moléculas y derivados de HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP, requiera la aplicación de los hallazgos y conceptos de ingeniería genética de proteínas novedosos dados a conocer en el presente documento.

15 Las moléculas de MHC de clase II tienen (al menos) tres "funciones" bioquímicas claramente definidas que pueden usarse para evaluar y cuantificar la conservación de un plegamiento tridimensional específico derivado de la secuencia primaria: unión a péptido Ag, unión a TCR y unión a CD4. Sin querer restringirse a la teoría, los solicitantes plantearon la hipótesis de que estas funciones se han codificado y están superpuestas sobre la secuencia primaria del MHC de clase II, y que algunas de estas funciones pueden separarse experimentalmente para su evaluación usando modificación genética de proteínas (Burrows *et al.*, Protein Engineering 12:771-78, 1999; Chang *et al.*, J. Biol. Chem. 276:24170-76, 2001).

20 Para los fines de la presente invención, es deseable conservar dos funciones bioquímicas clave: la capacidad para unirse específicamente a péptidos Ag; y la capacidad para unirse a las cadenas heterodiméricas  $\alpha\beta$  del TCR. La conservación de estas características clave permite la distinción de la superficie de contacto de interacción mínima con la célula T que todavía inicia una señal de información de rendimiento (Wang *et al.*, The Journal of Immunology, 2003), permitiendo la modificación por ingeniería genética de un sistema molecular para controlar las células T CD4+ de una manera específica de Ag.

25 Aunque los RTL derivados de HLA-DR2 con la secuencia de tipo natural conservaban estas dos actividades biológicas clave (Vandenbark *et al.*, Journal of Immunology, 2003), tendían a formar estructuras de orden superior (Burrows *et al.*, J. Immunol 167: 4386-95, 2001) que no podían eliminarse completamente manipulando las condiciones de disolvente. Por ejemplo, se obtuvo un rendimiento óptimo de RTL302 monomérico monodisperso de casi el 20% disminuyendo la concentración de proteína RTL302 purificada hasta 0,1 mg/ml para la etapa de plegamiento final, y cambiando los tampones de solución salina tamponada con fosfato a Tris. Sin embargo, la concentración del monómero de RTL302 purificado por encima de 0,2 mg/ml hizo que las moléculas volvieran a repartirse en una mezcla de monómero y agregado, un equilibrio que era dependiente de la concentración. Según la presente invención, la agregación de RTL derivados de HLA-DR2 es específica de determinadas partes de la secuencia de RTL derivado de DR2.

35 Una estructura cristalina con 2,6 ángstroms de resolución de HLA-DR2 con péptido Ag MBP-85-99 unido (acceso de PDB 1BX2; (Smith *et al.*, J. Exp. Med. 188:1511-20, 1998)), proporcionó datos suficientes para permitir el análisis en el presente documento de la superficie proximal a la membrana de la plataforma de lámina  $\beta$  y las superficies distales a la membrana de los dominios de plegamiento de Ig  $\alpha 2$  y  $\beta 2$ , identificando específicamente las características que contribuyen a estructuras o agregación de orden superior cuando los dominios de MHC II objeto se incorporan en un RTL no modificado. Específicamente, según la presente invención, la plataforma de lámina  $\beta$  enterrada en la molécula de HLA-DR2 progenitora define la parte inferior de los RTL, y contiene varios residuos hidrófobos que normalmente se encuentran enterrados dentro de una estructura de proteína en lugar de exponerse a disolvente.

45 Se ha investigado intensamente la propensión de diferentes residuos de aminoácido a estar presentes en estructuras de lámina  $\beta$  (Minor *et al.*, Nature 367:660-63, 1994; Pokkuluri *et al.*, Protein Science 11:1687-94, 2002; Street *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:9074-76; 1999; Chou *et al.*, Biochemistry 13:211-22, 1973; Smith *et al.*, Biochemistry 33:5510-17, 1994; Finkelstein, Protein Engineering 8:207-09, 1995), como parte de un objetivo global de comprender las reglas que rigen la estabilidad y formación de la estructura secundaria. Los trabajos disponibles han definido la preferencia marcadamente alta de láminas  $\beta$  para los aminoácidos ramificados en  $\beta$  isoleucina, valina y treonina, así como para los residuos de aminoácido aromáticos fenilalanina y tirosina.

55 Según la presente invención, la modificación de superficie deseada de un RTL que comprende un componente de MHC de clase II para producir una forma mucho menos propensa a la agregación puede lograrse, por ejemplo, mediante la sustitución de uno o más residuos hidrófobos identificados en la plataforma de lámina  $\beta$  del componente de MHC por residuos no hidrófobos, por ejemplo residuos polares o cargados. Se construyeron constructos de RTL modificados que ejemplifican este aspecto de la invención sustituyendo uno o más residuos hidrófobos diana identificados en la plataforma de lámina  $\beta$  de un componente HLA-DR2 de RTL 302 por uno o más residuos polares a modo de ejemplo (por ejemplo, serina) y, alternativamente residuos cargados a modo de ejemplo (por ejemplo,

aspartato). La figura 1 representa los residuos de plataforma de lámina  $\beta$  seleccionados como diana para la modificación. Inicialmente, se seleccionó como diana una parte de núcleo central de la plataforma de lámina  $\beta$  para la modificación, que comprendía V102, I104, A106, F108 y L110 (mostrado de arriba abajo en la figura 1C). Se cambiaron estos residuos mediante mutagénesis dirigida al sitio, individualmente, o en diversas combinaciones de múltiples residuos por un(os) residuo(s) de o bien serina o bien aspartato.

Los cambios individuales de estos residuos hidrófobos por un residuo diferente, polar o cargado, generalmente produjeron reducciones detectables en la agregación del RTL modificado. Cuanto más hidrófobos eran los residuos que se cambiaron, por un residuo o bien polar o bien cargado, mayor era la reducción esperada en el potencial de agregación. Cuando se cambiaron los cinco residuos diana de la plataforma de lámina  $\beta$  de núcleo indicados, se observó una conversión sustancial de los RTL por una forma más monodispersa. Cuando se cambiaron los cinco residuos diana de núcleo por un residuo de serina, aproximadamente el 15% de los RTL modificados se volvieron monoméricos en disolución. Cuando se cambiaron los cinco residuos diana de núcleo (que comprendían un "motivo" de autounión a modo de ejemplo de la molécula de DR) por residuos de aspartato, se observaron sustancialmente todos los RTL modificados en una forma monodispersa en disolución (véase a continuación). Tal como se ilustra en la figura 1C, están disponibles residuos diana hidrófobos adicionales para la modificación para alterar las características de autounión de la parte de plataforma de lámina  $\beta$  de moléculas de DR2 incorporadas en los RTL. En referencia a la figura 1C, el brazo izquierdo de la plataforma de lámina  $\beta$  representada incluye un "motivo" separado de tres residuos hidrófobos observados (de arriba abajo), L141, V138 y A133 que servirán como dianas útiles para la modificación individual o colectiva (por ejemplo, mediante delección o sustitución de aminoácido dirigida al sitio) para eliminar el/los residuo(s) hidrófobo(s) o para alterar el/los residuo(s) diana para dar un residuo no hidrófobo (por ejemplo, polar o cargado). También en referencia a la figura 1C, varios residuos hidrófobos diana están marcados a la derecha del motivo de lámina  $\beta$  de núcleo, incluyendo L9, F19, L28, F32, V45 y V51, que pueden considerarse como uno o más "motivos" diana adicionales de autounión o autoasociación para la modificación de RTL. Puede seleccionarse como diana cualquiera o una combinación de estos residuos para su modificación para eliminar el/los residuo(s) hidrófobo(s) o para altera el/los residuo(s) diana para dar un residuo no hidrófobo, esperándose que se produzcan beneficios adicionales con respecto a disminuir el potencial de agregación del RTL modificado.

La modificación de RTL normalmente implica sustitución o delección de aminoácidos en sitios diana para mutagénesis que comprenden una superficie de contacto de autounión (compuesta por uno o más residuos de aminoácido, o un motivo de autounión formado por varios residuos diana). Dentro de realizaciones a modo de ejemplo dirigidas hacia la producción de RTL modificados que comprenden componentes de RTL de MHC de clase II, los residuos seleccionados como diana para la modificación normalmente comprenden residuos o motivos hidrófobos, por ejemplo valina, leucina, isoleucina, alanina, fenilalanina, tirosina y triptófano. Estos y otros residuos diana ventajosamente pueden deleccionarse, o alternativamente pueden sustituirse por cualquier aminoácido no hidrófobo. Los aminoácidos sustituyentes adecuados para generar modificaciones de RTL deseadas pueden incluir aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas-de hidroxilo, tales como serina y treonina; aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen amida, tales como asparagina y glutamina; aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas, tales como fenilalanina, tirosina y triptófano; y aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas, tales como lisina, arginina e histidina.

Los hallazgos presentados en el presente documento validan el enfoque de diseño racional de la presente invención para modificar una serie diversa de RTL que comprenden diversos componentes de MHC, incluyendo componentes de MHC de clase I y de MHC de clase II, para disminuir la propensión del RTL modificado para agregarse en disolución. Estos conceptos son claramente aplicables a todos los tipos de moléculas de MHC de clase II, que muestran un alto grado de conservación de estructura de orden superior, incluyendo particularmente en la parte de plataforma de lámina  $\beta$  de la molécula que se expone a disolvente a través de la producción de RTL (por ejemplo, que comprende el polipéptido de MHC de clase II sc  $\beta 1 \alpha 1$ ). La cadena beta del componente HLA-DR2 modificado satisfactoriamente en los RTL a modo de ejemplo en el presente documento define una cadena central, extendida dentro de la molécula de HLA-DR2 progenitora (figura 6). La estructura cristalina con 2,6 ángstroms de resolución de HLA-DR2 con péptido Ag MBP-85-99 unido (acceso de PDB 1BX2; (Smith *et al.*, J. Exp. Med. 188:1511-20, 1998)), permitió el análisis en el presente documento de la superficie proximal a la membrana de la plataforma de lámina  $\beta$  y las superficies distales a la membrana de los dominios de plegamiento de Ig  $\alpha 2$  y  $\beta 2$ , identificando específicamente las características que contribuyeron a estructuras o agregación de orden superior. Específicamente, según la presente invención, la plataforma de lámina beta enterrada en la molécula de HLA-DR2 progenitora define la parte inferior de los RTL, y contiene diversos residuos hidrófobos que normalmente se encuentran enterrados dentro de una estructura de proteína en lugar de exponerse a disolvente.

Todas las moléculas de HLA-DR humanas seguirán estrechamente las reglas de modificación y las expectativas para el diseño racional dado a conocer en el presente documento. Asimismo, se describen y caracterizan suficientemente moléculas de HLA-DQ y HLA-DP de clase II humanas, y diversas moléculas de MHC de clase II murinas, de rata y otros mamíferos (véanse las referencias citadas anteriormente, que se incorporan en el presente documento) para aplicar las reglas analíticas de estructura-función de la invención relacionadas con la identificación

y modificación de residuos y motivos de superficie de contacto de autounión de RTL a estos sujetos relacionados dentro de los métodos y las composiciones de la invención.

5 En el caso de RTL derivados de DR2 modificados a modo de ejemplo, el mayor éxito en lo que se refiere a producir derivados de RTL monodispersos se obtuvo mediante la sustitución de los cinco residuos hidrófobos de núcleo de la plataforma de lámina  $\beta$  por un residuo cargado a modo de ejemplo, aspartato. El aspartato está significativamente poco representado en las regiones de lámina  $\beta$  de las proteínas, y la introducción en el presente documento de o bien cinco residuos de serina, o bien cinco residuos de aspartato sobre la cara externa de una cadena interior de la plataforma de lámina  $\beta$  de los RTL sólo tuvo un efecto discreto sobre la estructura secundaria tal como se cuantificó mediante dicroísmo circular (figura 3). Este efecto moderado se interpretó como un aumento de aproximadamente el 10% de estructura de 3 cadenas antiparalelas sobre la deconvolución de los espectros (tabla III).

10 Una explicación probable de por qué estos RTL modificados a modo de ejemplo mantienen las mismas características biológicas y de plegamiento básicas que sus RTL no modificados homólogos que portan los componentes de MHC nativos y residuos/motivos de autounión, procede del análisis de la lámina  $\beta$  en el contexto de su papel funcional como plataforma "abierta" en la estructura terciaria global del dominio de unión a Ag/reconocimiento de TCR de la molécula de HLA-DR2 progenitora, en lugar de una superficie cerrada como un plegamiento de Ig. Se ha investigado intensamente la propensión de diferentes residuos de aminoácido a estar presentes en estructuras de lámina  $\beta$  (Minor *et al.*, Nature 367:660-63, 1994; Pokkuluri *et al.*, Protein Science 11:1687-94, 2002; Street *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:9074-76; 1999; Chou *et al.*, Biochemistry 13:211-22, 1973; Smith *et al.*, Biochemistry 33:5510-17, 1994; Finkelstein, Protein Engineering 8:207-09, 1995), como parte de un objetivo global de comprender las reglas que rigen la estabilidad y formación de la estructura secundaria. Los trabajos disponibles han definido la preferencia marcadamente alta de láminas  $\beta$  para los aminoácidos ramificados en  $\beta$  isoleucina, valina y treonina, así como para los residuos de aminoácido aromáticos fenilalanina y tirosina.

15 Para ilustrar la amplia aplicabilidad de los principios y métodos de diseño racional de la invención para construir TRL monodispersos modificados a partir de una serie diversa de componentes de MHC, se presenta la siguiente alineación que documenta motivos de autounión homólogos identificados dentro de RTL a modo de ejemplo diferentes construidos con componentes de MHC homólogos a partir de moléculas de MHC de clase II HLA-DR, HLA-DP y HLA-DQ.

```

1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
302  MGDTRPRFLWQPKRECHFFNGTERVRFLDRYFYNQEESVRFDSVGEFRAVTELGRPDAE
600  MGDTPENYLFQGRQECYAFNGTOR -- FLERYIYNREEFVRFDSVGEFRAVTELGRPDEE
800  MRDSPEDFVYQFKGMCYFTNGTERVRLVSRSIYNREEIVRFDSVGEFRAVTLLLGLPAAE

61  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
302  YWNSQKDILEQARAAVDTYCRHNYGVVESFTVQRRVIKEEHVIIQAEFYLNPDQSGEFMF
600  YWNSQKDILEEERAVPDRMCRHNYELGGPMTLQRRVIKADHVSTYAAFVQTHRPTGEFMF
800  YWNSQKDILERKRAAVDRVCRHNYQLELRTLTLQRRVEDIVADHVASYGVNLYQSYGPSSGQ

121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
302  DFDGDEIFHVDMAKKETVWRLEEFGRFASFEAQGALANIAVDKANLEIMTKRSNYTPITN
600  EFDEDEMFVYVDLDKKETVWHLEEFGQAFSFEAQGLANIAILNNLNTLIQRSNHTQATN
800  YTHEFDGDEQFYVDLGRKETVWCLPVLRQFRGFDPQFALTNIAVLKHNLNSLIKRSNSTAATN
    
```

Alineación de secuencias de aminoácidos primarias de RTL humanos.

30 Se derivó RTL302 de DR2 (DRB1\*15011/DRA\*0101) (31). Se derivó RTL600 de DP2 (DPA1\*0103/DPB1\*0201). Se derivó RTL800 de DQ2 (DQA1\*05/DQB1\*02) (\*\*La cursiva indica residuos de aminoácido no nativos.) También se muestran los huecos en las secuencias para la alineación óptima (-) y la unión beta 1//alfa 1 ( $\downarrow$ ). Las cisteínas conservadas que forman un enlace disulfuro están sombreadas de amarillo.

35 La alineación anterior mapea un motivo de autounión homólogo identificado y modificado en el presente documento para un componente HLA-DR2 a modo de ejemplo en RTL302 en alineación con residuos diana homólogos que comprenden motivos de autounión en RTL adicionales construidos por los presentes inventores, incluyendo RTL600, que comprende un componente de MHC DP2, y RTL800, que comprende un componente de MHC DQ2. De acuerdo con la divulgación y las enseñanzas en el presente documento, ya se distinguen fácilmente numerosos residuos diana de RTL600 y RTL800 a modo de ejemplo (por ejemplo, correspondientes con residuos DR2 diana marcados mediante subrayado en la alineación) para la modificación de estas especies de MHC de clase II DQ y DP adicionales para producir RTL modificados según la invención.

Con respecto al diseño de RTL modificados que contienen un componente de MHC de clase II, la figura 6 muestra la superficie de interacción entre el dominio  $\alpha 1\beta 1$  de unión a péptido/reconocimiento de células T y los dominios  $\alpha 2\beta 2$  de plegamiento de Ig de HLA-DR2. Se moldeó y refinó la superficie de interacción entre el dominio  $\alpha 1\beta 1$  de unión a péptido/reconocimiento de células T y los dominios de plegamiento de Ig  $\alpha 2\beta 2$  usando la estructura 1BX2 de DR2 de clase II humana de alta resolución (Smith *et al.*, J. Exp. Med. 188:1511-20, 1998). Los dominios transmembrana se muestran esquemáticamente como cilindros de 0,5 nm. Los extremos amino y carboxilo terminales del MHC de clase II se marcan en N, C, respectivamente. Las cisteínas se interpretan como bola y varilla, al igual que los cinco residuos V102, I104, A106, F108, L110 (numeración 1B22). La superficie de interacción (superficie de contacto de 4 ángstroms) entre los dominios de plegamiento de Ig y el dominio de unión a péptido/reconocimiento de células T se colorea por el potencial lipófilo (LP). Las moléculas de agua dentro de esta superficie de contacto en la estructura cristalina 1BX2 se muestran como esferas rojas.

Dentro de determinadas realizaciones de la invención, la sustitución de uno o más residuo(s) hidrófobo(s) diana por uno o más residuo(s) cargado(s) (ejemplificados en el presente documento mediante aspartato) proporciona el objetivo adicional de restringir la molécula de RTL modificado para permanecer extendida o "estirada" fuera a lo largo de su cadena  $\beta$  interior mediante repulsión de tipo carga-carga, en lugar de permitir que la estructura se colapse sobre sí misma en ausencia de los dominios de plegamiento de Ig que están presentes en la molécula de HLA-DR2 progenitora. Esta conclusión concuerda con los datos en el presente documento, y está apoyada adicionalmente por informes de que la propensión de la lámina  $\beta$  por un residuo de aminoácido surge de interacciones estéricas locales de la cadena lateral de aminoácidos con el esqueleto local (Minor *et al.* Nature 367:660-63, 1994).

Los presentes resultados demuestran que los RTL que codifican para el dominio de unión a Ag/reconocimiento de TCR de moléculas de MHC de clase II son de manera innata estructuras muy robustas, que pueden conservar la actividad de manera separada de los dominios de plegamiento de Ig de la estructura de clase II progenitora, e incluso tras modificación bastante agresiva para obtener las moléculas monoméricas y monodispersas. Aplicando los métodos y las herramientas de la invención, se logra fácilmente la solubilidad aumentada y la prevención de agregación de RTL modificados mediante la modificación de un motivo o residuo(s) de superficie de contacto de autounión, ejemplificados mediante una superficie expuesta de una estructura de MHC de clase II nativa que originalmente estaba enterrada en la estructura de proteína progenitora. Al permanecer dentro de las limitaciones termodinámicas que restringen la estructura plegada final de la proteína y al no interferir con el proceso mediante el cual el dominio de proteína logra este plegamiento final, se ha superado un obstáculo clave para el diseño recombinante de RTL monodispersos, lo cual es el requisito para dejar intacto dentro de la secuencia primaria el "código" que dirige el plegamiento hacia la estructura única final que conserva la capacidad para unir péptidos y unir el TCR de una manera específica de péptido Ag, conservando una actividad biológica potente.

Las siguientes secciones proporcionan directrices detalladas sobre el diseño, la expresión y los usos de las moléculas de MHC recombinantes de la invención. A menos que se establezca de otro modo, se usan métodos de biología molecular, bioquímica e inmunología. Tales métodos convencionales se describen en Sambrook *et al.* (1989), Ausubel *et al.* (1987), Innis *et al.* (1990) y Harlow y Lane (1988). Las siguientes patentes estadounidenses y patentes y publicaciones adicionales citadas en otra parte en el presente documento se refieren al diseño, la construcción y la formulación de moléculas de MHC y sus usos, y se incorporan en el presente documento como referencia para proporcionar información técnica y de antecedentes adicional relevante para la presente invención: patentes estadounidenses n.ºs 5.130.297; 5.194.425; 5.260.422; 5.284.935; 5.468.481; 5.595.881; 5.635.363; 5.734.023.

#### Diseño de moléculas de MHC de clase II recombinantes $\beta 1\alpha 1$

Las secuencias de aminoácidos de proteínas de cadena  $\alpha$  y  $\beta$  de MHC de clase II de mamífero, así como ácidos nucleicos que codifican para estas proteínas, se conocen bien en la técnica y están disponibles a partir de numerosas fuentes, incluyendo las referencias citadas e incorporadas al presente documento, y GenBank. Dentro de realizaciones a modo de ejemplo de la invención, los RTL modificados pueden comprender un componente de MHC estructuralmente reducido o minimizado que excluye toda o parte de una proteína de MHC nativa, por ejemplo todo o parte de un dominio  $\beta 2$  de MHC de clase II, o al menos una parte de unión a CD4 del dominio  $\beta 2$ . También hay un dominio  $\alpha 2$  de la proteína de MHC de clase II normalmente excluido del RTL modificado. Los RTL de esta construcción pueden estar "vacíos" (es decir, libres de Ag de péptido), o unidos no covalentemente o unidos covalentemente al Ag de péptido. En aspectos más detallados de la invención, los dominios  $\alpha 1$  y  $\beta 1$  de MHC de clase II que comprenden el RTL modificado pueden unirse entre sí para formar un polipéptido monocatenario (sc) (Burrows *et al.*, Protein Engineering 12:771-78; 1999; Chang *et al.*, J. Biol. Chem. 276:24170-76, 2001).

Entre los RTL modificados proporcionados dentro de la invención hay constructos a modo de ejemplo que comprenden moléculas de MHC de clase II recombinantes, que en realizaciones a modo de ejemplo incluyen el dominio  $\beta 1$  de la cadena  $\beta$  del MHC de clase II unido covalentemente al dominio  $\alpha 1$  de la cadena  $\alpha$  del MHC de clase II. Los dominios  $\beta 1$  y  $\alpha 1$  están bien definidos en las proteínas de MHC de clase II de mamífero. Normalmente,

se considera que el dominio  $\alpha 1$  comprende aproximadamente 1-90 residuos de la cadena  $\alpha$  madura. La región de ligador de péptido nativa entre los dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  de la proteína de MHC de clase II abarcan desde aproximadamente el aminoácido 76 hasta aproximadamente el aminoácido 93 de la cadena  $\alpha$ , dependiendo de la cadena  $\alpha$  particular que esté considerándose. Por tanto, un dominio  $\alpha 1$  puede incluir aproximadamente 1-90  
 5 residuos de aminoácido de la cadena  $\alpha$ , pero un experto en la técnica reconocerá que el punto de corte del extremo C-terminal de este dominio no está definido necesariamente de manera precisa, y, por ejemplo, podría producirse en cualquier punto entre los residuos de aminoácido 70-100 de la cadena  $\alpha$ . La composición del dominio  $\alpha 1$  también puede variar fuera de estos parámetros dependiendo de la especie de mamífero y de la cadena  $\alpha$  particular en cuestión. Un experto en la técnica apreciará que los parámetros numéricos precisos de la secuencia de aminoácidos  
 10 son mucho menos importantes que el mantenimiento de la función del dominio.

De manera similar, normalmente se considera que el dominio  $\beta 1$  comprende aproximadamente 1-90 residuos de la cadena  $\beta$  madura. La región de ligador entre los dominios  $\beta 1$  y  $\beta 2$  de la proteína de MHC de clase II abarca desde aproximadamente el aminoácido 85 hasta aproximadamente el aminoácido 100 de la cadena  $\beta$ , dependiendo de la  
 15 cadena particular en consideración. Por tanto, la proteína  $\beta 1$  puede incluir aproximadamente 1-100 residuos de aminoácido, pero un experto en la técnica reconocerá de nuevo que el punto de corte del extremo C-terminal de este dominio no está definido necesariamente de manera precisa, y, por ejemplo, podría producirse en cualquier punto entre los residuos de aminoácido 75-105 de la cadena  $\beta$ . La composición del dominio  $\beta 1$  también puede variar fuera de estos parámetros dependiendo de la especie de mamífero y de la  $\beta$  particular en cuestión. De nuevo, un experto  
 20 en la técnica apreciará que los parámetros numéricos precisos de la secuencia de aminoácidos son mucho menos importantes que el mantenimiento de la función del dominio.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican para estos dominios pueden producirse mediante medios convencionales, tales como amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Pueden emplearse enfoques convencionales para diseñar cebadores para amplificar marcos de lectura abiertos que  
 25 codifican para estos dominios. Las bibliotecas adecuadas para la amplificación de estos dominios incluyen, por ejemplo, bibliotecas de ADNc preparadas a partir de la especie de mamífero en cuestión; tales librerías están disponibles comercialmente, o pueden prepararse mediante métodos convencionales. Por tanto, por ejemplo, pueden producirse constructos que codifican para los polipéptidos  $\beta 1$  y  $\alpha 1$  mediante PCR usando cuatro cebadores: los cebadores B1 y B2 correspondientes a los extremos 5' y 3' de la región codificante de  $\beta 1$ , y los cebadores A1 y A2 correspondientes a los extremos 5' y 3' de la región codificante de  $\alpha 1$ . Tras la amplificación por PCR de las  
 30 regiones codificantes de los dominios  $\alpha 1$  y  $\beta 1$ , estas moléculas de ácido nucleico amplificadas pueden clonarse cada una en vectores de clonación convencionales, o las moléculas pueden ligarse entre sí y luego clonarse en un vector adecuado. Para facilitar la clonación conveniente de las dos regiones codificantes, pueden diseñarse sitios de reconocimiento de endonucleasa de restricción en los cebadores de PCR. Por ejemplo, los cebadores B2 y A1 pueden incluir cada uno un sitio adecuado de manera que los fragmentos amplificados pueden ligarse fácilmente  
 35 entre sí tras la amplificación y digestión con la enzima de restricción seleccionada. Además, los cebadores B1 y A2 pueden incluir cada uno sitios de restricción para facilitar la clonación en el sitio de poliligador del vector seleccionado. La ligación de las dos regiones codificantes de dominio se realiza de manera que las regiones codificantes se unan operativamente, es decir, mantengan el marco de lectura abierto. Cuando las regiones amplificadas se clonan por separado, los fragmentos pueden liberarse posteriormente del vector de clonación y purificarse en gel preparándose para la ligación.  
 40

En realizaciones particulares, se proporciona un ligador de péptido entre los dominios  $\beta 1$  y  $\alpha 1$ . Normalmente, este ligador tiene entre 2 y 25 aminoácidos de longitud, y sirve para proporcionar flexibilidad entre los dominios de manera que cada dominio es libre de plegarse para dar su conformación nativa. La secuencia de ligador puede proporcionarse convenientemente diseñando los cebadores de PCR que codifican para la secuencia de ligador. Por  
 45 tanto, en el ejemplo descrito anteriormente, la secuencia de ligador puede codificarse mediante uno de los cebadores B2 o A1, o una combinación de cada uno de esos cebadores.

Los vectores de expresión de ácido nucleico, incluyendo casetes de expresión, serán particularmente útiles para fines de investigación. Tales vectores incluirán normalmente secuencias que codifican para el polipéptido de MHC de dominio dual ( $\beta 1$   $\alpha 1$ ) con un único sitio de restricción proporcionado hacia el extremo 5' terminal de la región  
 50 codificante del MHC, de manera que puede unirse convenientemente una secuencia que codifica para un polipéptido antigénico. Tales vectores también incluirán normalmente un promotor unido operativamente al extremo 5' terminal de la región codificante del MHC para proporcionar una expresión de alto nivel de las secuencias.

En realizaciones particulares, las moléculas  $\beta 1$   $\alpha 1$  también pueden expresarse y purificarse sin un péptido unido, en cuyo caso pueden denominarse "vacías". Las moléculas de MHC vacías pueden cargarse entonces con el péptido  
 55 seleccionado tal como se describe a continuación.

*Variantes de secuencia.* Un experto en la técnica apreciará que puede obtenerse y utilizarse las variantes de las moléculas y dominios inventivos dados a conocer de la misma manera que se ha descrito. Por tanto, la referencia en

el presente documento a un dominio de un polipéptido o molécula de MHC (por ejemplo, un dominio  $\beta 1$  de MHC de clase II) incluye tanto formas preferidas de la molécula a la que se hace referencia, así como moléculas que se basan en la secuencia de aminoácidos de la misma, pero que incluyen una o más variaciones de secuencia de aminoácidos. Tales polipéptidos variantes también pueden definirse por el grado de identidad de secuencia de aminoácidos que comparten con la molécula preferida dada a conocer. Normalmente, las variantes de dominio de MHC compartirán una identidad de secuencia de al menos el 80% con la secuencia de los dominios de MHC preferidos dados a conocer en el presente documento. Las variantes más altamente conservadas compartirán una identidad de secuencia de al menos el 90% o al menos el 95% con los dominios de MHC preferidos dados a conocer en el presente documento. Las variantes de polipéptidos de dominio de MHC también conservan la actividad biológica de los dominios de MHC preferidos dados a conocer en el presente documento. Para los fines de esta invención, esa actividad se evalúa convenientemente incorporando el dominio variante en el polipéptido  $\beta 1 \alpha 1$  apropiado y determinando la capacidad del polipéptido resultante para inhibir proliferación de células T específica de antígeno *in vitro*, tal como se describe en detalle a continuación en el presente documento.

Los polipéptidos de dominio de MHC variantes incluyen proteínas que difieren en la secuencia de aminoácidos de los dominios de MHC preferidos dados a conocer en el presente documento, pero que conservan la actividad biológica y no agregante especificada. Tales proteínas pueden producirse manipulando la secuencia de nucleótidos de la molécula que codifica para el dominio, por ejemplo mediante mutagénesis dirigida al sitio o la reacción en cadena de la polimerasa. Las modificaciones más sencillas implican la sustitución de uno o más aminoácidos por aminoácidos que tienen propiedades bioquímicas similares. Es probable que estas sustituciones denominadas conservativas tengan un efecto mínimo sobre la actividad de la proteína resultante. La tabla I muestra los aminoácidos que pueden sustituirse por un aminoácido original en una proteína y que se consideran sustituciones conservativas, que se conocen bien en la técnica.

Pueden obtenerse cambios más sustanciales en la función biológica u otras características seleccionando sustituciones que son menos conservativas, es decir, seleccionando residuos que difieren más significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura del esqueleto polipeptídico en la zona de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de lámina o helicoidal, (b) la carga o la hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Las sustituciones que se espera en general que produzcan los mayores cambios en las propiedades de la proteína serán aquellas en que (a) un residuo hidrófilo, por ejemplo, serilo o treonilo, se sustituye por un residuo hidrófobo, por ejemplo, leucilo, isoleucilo, fenilalanilo, valilo o alanilo; (b) una cisteína o prolina se sustituye por cualquier otro residuo; (c) un residuo que tiene cadena lateral electropositiva, por ejemplo, lisilo, arginilo o histadilo, se sustituye por un residuo electronegativo, por ejemplo, glutamilo o aspartilo; o (d) un residuo que tiene una cadena lateral voluminosa, por ejemplo, fenilalanina, se sustituye por uno que no tiene una cadena lateral, por ejemplo, glicina. Los efectos de estas sustituciones o deleciones o adiciones de aminoácido pueden evaluarse a través del uso del ensayo de proliferación de células T descrito.

A nivel de ácido nucleico, un experto en la técnica apreciará que las secuencias de ácido nucleico que se producen de manera natural que codifican para los dominios de MHC de clase I y II pueden emplearse en los vectores de expresión, pero que la invención no se limita a tales secuencias. Puede emplearse cualquier secuencia que codifica para un dominio de MHC funcional, y la secuencia de ácido nucleico puede adaptarse para ajustarse con la desviación del uso del codón del organismo en que va a expresarse la secuencia.

Los RTL modificados de la invención muestran una capacidad reducida para autoagregarse en comparación con un RTL no modificado correspondiente (es decir, un RTL que comprende sólo secuencias de aminoácidos de MHC nativas). Por tanto, el diseño racional de modificaciones de superficie de RTL descritas en el presente documento produce un porcentaje aumentado de moléculas de RTL presentes como monómeros en disolución en comparación con una fracción monodispersa de RTL no modificados en disolución.

Pese a los cambios estructurales de superficie introducidos en los RTL modificados, estos constructos de RTL novedosos conservan la capacidad para unir específicamente péptidos Ag y para interaccionar funcionalmente con un TCR en una célula T diana. Las funciones a modo de ejemplo de los RTL modificados incluyen una capacidad para modular la actividad de las células T de una manera específica de Ag para reducir un potencial patógeno o para reducir un fenotipo patógeno de la célula T (por ejemplo, para inhibir la proliferación de células T, reducir la producción de citocinas inflamatoria por la célula T, o aumentar la producción de citocinas antiinflamatorias por la célula T). Como tales, los RTL modificados tienen utilidad para tratar enfermedades autoinmunitarias y otras condiciones mediadas por células T específicas de antígeno *in vivo*.

Dentro de otros aspectos de la invención, se proporcionan RTL modificados que carecen de los dominios de plegamiento de Ig transmembrana encontrados en una molécula de MHC intacta, en los que los RTL modificados no son agregantes o muestran agregación reducida en comparación con los RTL no modificados. Los RTL modificados poseen actividad reguladora de células T tal como se describe en el presente documento, pese a carecer de determinadas características estructurales presentes en la molécula de MHC intacta correspondiente. Los componentes de los RTL modificados de la invención vuelven a plegarse de una manera que es estructuralmente análoga a la de las moléculas de MHC completas nativas y los antígenos de péptido de unión para

formar complejos MHC-antígeno estables.

Las respuestas de células T deseadas que pueden provocarse, individualmente, en diversas combinaciones, o colectivamente, por los RTL modificados de la invención normalmente comprenden uno o más cambio(s) fenotípico(s) que se correlaciona(n) con un estado alterado o "reprogramado" de una célula T asociada con potencial o actividad patógena reducida (por ejemplo, una capacidad reducida para mediar o potenciar la destrucción tisular autoinmunitaria u otro(s) síntoma(s) diagnóstico(s) de una enfermedad autoinmunitaria seleccionada).

Las moléculas de RTL modificado de la invención son útiles, por ejemplo, para detectar, cuantificar y purificar células T específicas de Ag. En otras realizaciones, los RTL modificados son útiles en composiciones y métodos para modular el fenotipo, la actividad, el estado de diferenciación, el comportamiento de migración, la localización tisular y/o el destino celular de las células T. Dentro de estos aspectos de la invención, se proporcionan composiciones y métodos para modular una o más actividades de las células T seleccionadas de activación, proliferación y/o expresión de célula T de una o más citocina(s), factor(es) de crecimiento, quimiocinas, receptores de la superficie celular (por ejemplo, TCR) y/o moléculas de adhesión celular (CAM). Los RTL modificados, apropiadamente diseñados, evaluados y administrados de la invención sirven como agentes reguladores de células T potentes, *in vitro* o *in vivo*, para modular cuantitativamente o "cambiar" cualitativamente el fenotipo de las células T (particularmente con respecto al potencial patógeno de la célula T diana).

Al poner en contacto una célula T diana con un RTL modificado de la invención (que porta antígeno relacionado unido a la superficie de contacto de TCR en ausencia de factores coestimuladores (por ejemplo, APC y otras señales reguladoras conferidas por secuencias reguladoras  $\alpha 2$  y  $\beta 2$  de MHC II nativas), las composiciones y métodos de la invención pueden funcionar para "reprogramar" una célula T diana para alterar el estado de diferenciación o destino de la célula T, por ejemplo a un fenotipo o estado no patógeno inducido caracterizado por potencial patogénico reducido. Por ejemplo, los RTL modificados de la invención pueden emplearse para reprogramar una célula T desde una ruta de diferenciación patogénica original hasta una que produce un fenotipo "T supresor". En realizaciones adicionales, los RTL de la invención pueden emplearse para reprogramar una célula T provocando un "cambio" en una o más citocinas, o en un "perfil de expresión de citocina", por ejemplo un cambio desde un perfil de expresión de citocina Th1 hasta uno Th2, que a su vez proporciona métodos para reprogramar células T para tratar o gestionar enfermedades autoinmunitarias y otros trastornos mediados por las células T. Una descripción adicional de estos aspectos y otros relacionados de la invención, se proporciona en Huan *et al.*, J. Immunol. 172:4556-4566, 2004 (incorporado al presente documento como referencia).

Usos adicionales para constructos de RTL modificado de la invención incluyen, por ejemplo, evaluar la actividad y función de las células T, o la función y especificidad de unión de TCR, en contextos analíticos y de diagnóstico (véase, por ejemplo, Wang *et al.*, J. Immunol.) En realizaciones más específicas, los RTL de la invención pueden usarse para detección, cuantificación y/o purificación de células T que reconocen antígenos particulares para producir materiales e información terapéutica y de diagnóstico importante. A modo de ejemplo, la detección temprana de células T específicas para un autoantígeno particular usando, por ejemplo, un RTL marcado, facilitará la selección temprana de regímenes de tratamiento apropiados. La capacidad para purificar células T específicas de antígeno también será de gran valor en inmunoterapia adoptiva. La inmunoterapia adoptiva implica la eliminación de células T, por ejemplo, de un paciente con cáncer, la expansión de las células T *in vitro* y luego la reintroducción de las células en el paciente (véase la patente estadounidense n.º 4.690.915; Rosenberg *et al.* New Engl. J. Med. 319:1676-1680 (1988)). El aislamiento y la expansión de células T específicas de cáncer con propiedades inflamatorias aumentarán la especificidad y la eficacia de la intervención inmunológica.

En aspectos detallados de la invención, se usan RTL modificados que comprende un componente de MHC de clase I o clase II *in vivo* para seleccionar como diana y alterar una actividad o potencial patógena de las células T específicas de Ag. A modo de ejemplo, puede usarse una molécula de  $\beta 1 \alpha 1$  cargada con un Ag de célula T (por ejemplo, un epítipo, dominio, región, péptido antigénico, u otra parte, derivado o conjugado de una proteína antigénica de células T) y administrada a pacientes que padecen esclerosis múltiple u otra enfermedad autoinmunitaria para modular la actividad de las células T (por ejemplo, para modular la proliferación de células T, modular la expresión de células T de una o más citocina(s), quimiocina(s), factor(es) de crecimiento y/o factor(es) de adhesión u otro(s) factor(es) de la migración celular, o para inducir anergia y/o cambio(s) fenotípicos en el destino, estado de diferenciación, locación, señalización inespecífica o actividad de supresión y/o potencial patógeno de las células T) en células T específicas de Ag, aliviando o impidiendo de ese modo síntomas de enfermedad asociados. Alternativamente, tales moléculas pueden conjugarse con un resto tóxico para eliminar directamente las células T causantes de enfermedad.

Los siguientes ejemplos se exponen para proporcionar a los expertos habituales en la técnica una divulgación y descripción más detallada de la invención objeto, y no se pretende que limiten el alcance de lo que se considera como la invención. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperatura, concentraciones, etc.) pero deben tenerse en cuenta determinados errores experimentales y desviaciones.

## EJEMPLO 1

(Métodos)

Modelado por homología. Gran parte del razonamiento para diseccionar las moléculas se ha descrito anteriormente (Burrows *et al.*, Protein Engineering 12:771-78, 1999; Chang *et al.*, J. Biol. Chem. 276:24170-76, 2001). La alineación de secuencias de moléculas de MHC de clase II de especies de ser humano, rata y ratón proporcionó un punto de partida para los estudios y se generaron imágenes gráficas con el programa Sybilo 6.9 (Tripos Associates, St. Louis, MO) en una estación de trabajo O2 (IRIX 6.5, Silicon Graphics, Mountain View, CA) usando coordenadas depositadas en el banco de datos de proteínas de Brookhaven (Brookhaven National Laboratories, Upton, NY). El modelado por homología basado en la estructura se basó en las coordenadas cristalográficas refinadas de HLA-DR2 humano (Smith *et al.*, J. Exp. Med. 188:1511-20, 1998; Li *et al.*, J. Mol. Biol. 304:177-88, 2000), así como DR1 (Brown *et al.*, Nature 364:33-39, 1993; Murthy *et al.*, Structure 5:1385-96, 1997), moléculas de I-E<sup>k</sup> murinas (Fremont *et al.*, Science 272:1001-04, 1996) y toxinas de escorpión (Zhao *et al.*, J. Mol. Biol. 227:239-52, 1992; Housset *et al.*, J. Mol. Biol. 238:88-91, 1994; Zinn-Justin *et al.*, Biochemistry 35:8535-43, 1996). Se usaron residuos de aminoácido en HLA-DR2 humano (código de acceso de PDB 1BX2). Se determinó esta estructura mediante difracción con longitud de onda simple y sustitución molecular (paquete de refinamiento estructural de rayos X/RMN AmoRe, C.N.R.S., Francia) usando HLA-DR1 como estructura de partida (código de acceso de PDB 1DLH) (Stem *et al.*, Nature 368:215, 1994). Los siguientes residuos o bien faltaban o bien tenían átomos que faltaban en la estructura final: cadena A; K2, M36, K38, K39, E46, N78, R100, E101; cadena B: E22, E35, E52, E59, K65, E69, P108, R189, (numeración 1BX2) (Smith *et al.*, J. Exp. Med. 188:1511-20, 1998). Para estos residuos, se insertaron las cadenas laterales correctas y se modeló el esqueleto del péptido como un cuerpo rígido durante el refinamiento estructural usando minimización de energía local.

Modificación estructural de RTL. La síntesis *de novo* de RTL derivados de HLA-DR2 humano se ha descrito previamente (Chang *et al.*, J. Biol. Chem. 276:24170-76, 2001). Se usó mutagénesis dirigida al sitio para sustituir residuos hidrófobos sobre la superficie accesible a disolvente de la plataforma de lámina  $\beta$  de los RTL por residuos polares (serina) o cargados (ácido aspártico). Se realizó la modificación usando el método de mutagénesis dirigida al sitio QuickChange™ tal como se describe por Stratagene (La Jolla, CA). En resumen, se realizó la reacción de PCR con ADN polimerasa *Pfu* (Stratagene, La Jolla, CA) usando RTL302 o RTL303 como molde y dos cebadores de oligonucleótido sintéticos que contenían la(s) mutación/mutaciones deseada(s). Por ejemplo, un par de cebadores de mutación para RTL320 fueron 1) cebador directo: 5'-GGC GAG TCA TCA AAG AAG AAC ATA GCA TCA GCC AGA GCG AGA GTT ATA GTA ATC CTG ACC AAT C-3'; 2) cebador inverso: 5'-GAT TGG TCA GGA TTA CTA TAA CTC TCG CTC TGG CTG ATG CTA TGT TCT TCT TTG ATG ACT C-3'; y un par de cebadores de mutación para RTL340 fueron 1) cebador directo: 5'-GGC GAG TCA TCA AAG AAG AAC ATG ACA TCG ACC AGG ACG AGG ACT ATG ACA ATC CTG ACC AAT C-3'; 2) cebador inverso: 5'-GAT TGG TCA GGA TTG TCA TAG TCC TCG TCC TGG TCG ATG TCA TGT TCT TCT TTG ATG ACT C-3'. Se extendieron los cebadores de oligonucleótido, cada uno complementario a la cadena opuesta del molde, durante 19 ciclos de temperatura por medio de ADN polimerasa *Pfu* a una temperatura de hibridación de 55°C. Tras la incorporación de los cebadores de oligonucleótido, se generó un plásmido mutado que contenía mellas escalonadas. Tras el ciclado de temperatura, se trató el producto de PCR con endonucleasa *DpnI* para digerir el molde de ADN parental y para seleccionar mutantes que contenían la secuencia de ADN de interés. Entonces se transformó el ADN de plásmido con mellas que incorporaba la(s) mutación/mutaciones deseada(s) en *E. coli* BL21(DE3) como huésped de expresión (Novagen, Madison, WI). Se seleccionaron colonias y se usaron las células que contenían el plásmido con la(s) mutación/mutaciones deseada(s) para la purificación del plásmido usando el kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN, Valencia, CA). Entonces se digirió el ADN de plásmido purificado con *NcoI* y *XhoI* para confirmar la eficacia de la mutación. Finalmente, se secuenciaron los plásmidos deseados con los cebadores (T7) 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3' y (T7 terminal) 5'-GCT AGT TAT TGC TCA GCG G-3' para confirmar las mutaciones de interés.

Expresión y replegamiento de moléculas de RTL solubles. La expresión, la purificación y el replegamiento de RTL derivados de HLA-DR2 humano se describieron previamente (Chang *et al.*, J. Biol. Chem. 276:24170-76, 2001). Se han realizado varias modificaciones en el protocolo para racionalizar la producción mientras que se mantenía o se aumentaba ligeramente el rendimiento de proteína. Se hicieron crecer bacterias en cultivos de un litro hasta fase semilogarítmica ( $DO_{600}=0,6-0,7$ ) en caldo Luria-Bertani (LB) que contenía carbenicilina (50  $\mu\text{g/ml}$ ) a 37°C. Se indujo la producción de proteína recombinante mediante la adición de  $\beta$ -D-tiogalactósido de isopropilo (IPTG) 0,5 mM. Tras la incubación durante 4 horas, se recogieron las células mediante centrifugación y se almacenaron a 4°C (corto plazo) o -80°C (largo plazo) antes del procesamiento. Todas las manipulaciones de purificación de proteínas posteriores se realizaron a 4°C. Se resuspendieron los sedimentos de células en tampón de lisis (Tris-Cl 50 mM, NaCl 0,1 M, EDTA 5 mM, pH 7,4). Se añadió lisozima (disolución 10 mg/ml en tampón de lisis; 1 mg por gramo de sedimento de células) y se incubó la disolución a temperatura ambiente durante 30 minutos, agitando suavemente cada 10 minutos. Entonces se sonicó la suspensión celular durante 6 x 5 segundos enfriándose la suspensión celular en un baño de agua helada salada. Se centrifugó la suspensión celular (20.000 g durante 10 minutos a 4°C, Beckman J2-21, JA-14 rotor), se eliminó por vertido la fracción de sobrenadante, se resuspendió el sedimento de células y se lavó dos veces en 100 ml de tampón de lisis que contenía Triton X-100 al 1% y luego un lavado en tampón de lisis sin Triton X-100, y entonces se resuspendió en 100 ml de tampón A (etanolamina 20 mM, urea 6 M,

- pH 10), y se agitó suavemente a 4°C durante la noche. Tras la centrifugación (40.000 g durante 45 minutos a 4°C, rotor Beckman J2-21, JA-20), se filtró el sobrenadante que contenía la proteína recombinante solubilizada de interés (0,22 µ Stericup, Millipore) y se almacenó a 4°C hasta la purificación. Se purificaron las proteínas recombinantes de interés y se concentraron mediante cromatografía de intercambio iónico FPLC usando medios de intercambio aniónico Source 30Q (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) en una columna XK26/20 (Pharmacia Biotech), usando un gradiente escalonado con tampón A y tampón B (etanolamina 20 mM/HCl, urea 6 M, NaCl 2 M, pH 10,0). Se reunieron las fracciones que contenían la proteína recombinante de interés y se concentraron para cromatografía de exclusión molecular (tampón de SEC, etanolamina 20 mM, urea 6 M, NaCl 0,2 M, pH 10,0; columna, Superdex 75, HRI6/60). Se reunieron las fracciones que contenían la proteína de interés y se diluyeron con tampón de SEC hasta DO<sub>280</sub> de 0,1. Se dializaron las proteínas frente a Tris-Cl 20 mM a pH 8,5, que eliminó la urea y permitió el repliegamiento de la proteína recombinante. Tras la diálisis, se concentraron las proteínas mediante ultrafiltración centrífuga con membranas Centricon10 (Amicon, Beverly, MA). Para la purificación hasta homogeneidad se incluyó una etapa de terminación usando cromatografía de exclusión molecular (Superdex 75, HRI6/60). El rendimiento final de la proteína purificada varió entre 15 y 30 mg/l de cultivo bacteriano.
- 15 Ensayo de desplazamiento en gel de SDS. Se desnaturalizaron alícuotas de muestra de proteína purificada mediante ebullición durante 5 min en tampón Laemmli con o sin el agente reductor β-mercaptoetanol, y luego se analizaron mediante electroforesis (SDS-PAGE al 12%). Tras la electroforesis, se tiñeron los geles con azul brillante de Coomassie (Sigma, St. Louis, MO) y se eliminó la tinción para la observación del desplazamiento según el peso molecular.
- 20 Dispersión de luz dinámica. Se realizaron experimentos de dispersión de luz dinámica (DLS) con un instrumento DynaPro™ (Protein Solutions, Inc., Charlottesville, VA). Se filtraron las muestras de proteínas en tampón Tris-Cl 20 mM a pH 8,5 a través de un filtro de membrana de 100 nm Anodisc (Whatman, Clifton, NJ) a una concentración de 1,0 mg/ml y se cargaron 20 µl de muestra filtrada en una cubeta de cuarzo y se analizaron a 488 Dm. Se recogieron cincuenta espectros a 4°C para obtener una estimación del coeficiente de difusión y la polidispersidad relativa de las proteínas en disolución acuosa. Entonces se analizaron los datos mediante el software Dynamics versión 5.25.44 (Protein Solutions, Charlottesville, VA) y se restaron los niveles iniciales con tampón. Los datos se expresaron como la media del radio hidrodinámico calculado. Se calcularon los pesos moleculares de los RTL suponiendo una forma hidratada globular para las moléculas usando el software Dynamics versión 5.25.44 (Protein Solutions, Charlottesville, VA).
- 30 Análisis de dicroísmo circular (DC) y desnaturalización térmica. Se realizaron análisis de DC y estudios de desnaturalización térmica tal como se describió anteriormente (Chang *et al.*, J. Biol. Chem 276:24170-76, 2001). En resumen, se analizaron proteínas recombinantes en tampón Tris-Cl 20 mM pH 8,5 usando un espectrómetro Aviv modelo 215 DC (Aviv Associates, Lakewood, NJ). Los espectros fueron el promedio de 4-5 barridos desde 260 hasta 180 nm, registrados a una velocidad de barrido de 5 nm/min con una constante de tiempo de 4 segundos. Se recogieron los datos a intervalos de 0,5 nm. Se obtuvieron los promedios de los espectros y se alisaron usando algoritmos integrados y se restaron los niveles iniciales con tampón. Se estimó la estructura secundaria usando un paquete de software de deconvolución (CDNN versión 2.1, Aviv Associates, Lakewood, NJ) basándose en el método de selección de variables (Compton *et al.*, Analytical Biochemistry 155: 155-67, 1986). Se registró el DC frente a la temperatura (curva de desnaturalización térmica) a una longitud de onda fija de 208 nm. Se generaron gradientes de temperatura desde 60 hasta 95°C con un dispositivo termoeléctrico controlado por software para generar etapas de elevación o disminución de la temperatura. Las velocidades de calentamiento y enfriamiento fueron de entre 10-12°C/h. Se normalizaron las curvas de transición hasta 0 mdeg a 60°C y se representaron gráficamente como el cambio en la absorbancia (mdeg) en función de la temperatura.
- 45 Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (EL/SA). Se adquirieron el péptido MOG-35-55 biotilado (Biot-MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK-OH), los péptidos MOG-35-55 y MBP-85-99 no biotilados (ENPVVHFFKNIVTPR-OH) de New England Peptide, Inc., (Fitchburg, MA). Se verificó la pureza de los péptidos mediante HPLC de fase inversa y se realizó la identificación de masa usando MALDI-TOF para verificar que la masa estaba dentro del 0,1% del peso molecular esperado. Se liofilizaron los péptidos y se almacenaron a -80°C hasta su uso. Se llevaron a cabo experimentos de ensayo de unión directa con el fin de determinar determine la capacidad de los RTL para unirse al péptido y para determinar la concentración del péptido biotilado a la que todos los sitios de unión específica se saturaban en las condiciones usadas en los estudios. Se recubrieron placas de ELISA (Maxisorp, Nunc, Rochester, NY) con 50 µl de proteína a una concentración de 1 µg/ml en Tris 20 mM, pH 8,5 (50 ng de proteína; es *decir*, 40 nM) durante la noche a 4°C, se lavaron 4 veces con disolución de lavado (Tween 20 al 0,05%, PBS, pH 7,4), y se bloquearon con una disolución de caseína (BioFX, Owing Mills, MD) durante 1,5 h a temperatura ambiente.
- 55 Entonces se lavaron las placas 4X y se añadieron 50 µl de péptido biotilado (diluciones en serie) a los pocillos, a TA, durante 1,5 h, y luego se lavaron 4X. Se añadieron 50 µl de un conjugado de estreptavidina-peroxidasa de rábano (STR-HRP, 1:5000, DAKO, Glostrup, Dinamarca) en PBS a los pocillos y se incubaron a TA durante 1,5 h, luego se lavaron 4X para eliminar el conjugado no unido. Se añadieron 50 µl de sustrato de HRP (BioFX) durante 45 min, a TA. Se detuvieron las reacciones con disolución de detención (BioFX) y se determinó el péptido unido de manera indirecta leyendo la absorbancia a 405 nm en un lector de placas de ELISA (Applied Biosystems, Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Se usó una curva patrón de concentración de STR-HRP frente a DO<sub>405</sub> para determinar la
- 60

concentración de péptido unido. Para controlar la unión no específica, se recubrieron los pocillos con leche desnatada en polvo (LDP) al 3% en PBS y se trataron de la misma forma que los pocillos recubiertos con RTL. Para determinar el tiempo requerido para alcanzar la unión en estado estacionario de los péptidos a las proteínas, se recubrieron placas de ELISA, se lavaron y se bloquearon igual que anteriormente y luego se añadió péptido biotinilado en PBS/EDTA 1 mM a pH 7,4 a 0,15  $\mu\text{M}$  en diferentes tiempos (de 0 a 36 h).

Ensayo de clones de células T y proliferación de células T. Se seleccionaron clones de células T específicas de antígeno de PBMC de un paciente con EM homocigoto para HLA-DRB1\* 1501 tal como se describió anteriormente (Burrows *et al.*, J. Immunol 167:4386-95, 2001). Se subclonaron los clones de células T específicas de antígeno seleccionados mediante el método de dilución limitante y posteriormente se evaluaron para determinar la proliferación específica de antígeno (Burrows *et al.*, J. Immunol 167:4386-95, 2001). Se seleccionó el clon con el índice de estimulación (IE) más alto y se cultivó de manera continua en medio RPMI complementado con suero humano al 1% e IL-2 5 ng/ml. Se determinó la capacidad de clonación de las células mediante RT-PCR con un clon definido como una población de células T utilizando un único gen  $V\beta$  de TCR (Burrows *et al.*, J. Immunol 167:4386-95, 2001). Se expandieron los clones de células T mediante estimulación con péptido MOG-35-55 o MBP-85-99 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y  $2 \times 10^5$  PBMC autólogas irradiadas (2500 rad) por pocillo en una placa de 96 pocillos. Se mantuvieron las células T expandidas en RPMI con suero humano al 1% que contenía IL-2 5 ng/ml. Se añadió IL-2 nueva dos veces a la semana y volvieron a estimularse los clones de células T con PBMC autólogas irradiadas (2500 rad) cada tres semanas. Se realizó periódicamente la proliferación de células T específicas de antígeno para verificar la calidad de las células. Para estos ensayos, se lavaron los clones de células T específicas de antígeno dos veces con medio RPMI y volvieron a sembrarse  $5 \times 10^4$  células en cada pocillo de una placa de 96 pocillos y se incubaron por triplicado con  $2 \times 10^5$  PBMC autólogas recién aisladas e irradiadas (2500 rad) con 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  del péptido deseado. Se incubaron las células durante 72 horas con [ $^3\text{H}$ ]-timidina añadida durante las últimas 18 horas. Se recogieron las células mediante un colector 96 (Tomtec, Hamden, CT) y se midió la radioactividad incorporada en un contador de centelleo líquido 1205 BS (Wallac, Turku, Finlandia). Se calculó el índice de estimulación (IE) dividiendo las cpm medias de los pocillos a los que se había añadido péptido entre las cpm medias de los pocillos control sólo con medio. En los experimentos de tratamiento de RTL, se preincubaron 8  $\mu\text{M}$  de los RTL deseados con los clones de células T durante 72 horas, seguido por dos lavados con medios RPMI antes de realizar el ensayo de proliferación de células T.

Ratones. Se desarrollaron ratones HLA-DR2 Tg que portaban moléculas de MHC de clase II quiméricas tal como se describió anteriormente (Woods *et al.*, J. Exp. Med. 180:173-81, 1994). El dominio de unión a péptido de MHC de clase II está codificado por secuencias humanas mientras que la parte proximal a la membrana que incluía el dominio de unión a CD4 está codificada por secuencias de ratón ( $\text{DR}\alpha 1^*0101:\text{I-E}\alpha$  y  $\text{DR}\beta 1^*1501:\text{I-E}\beta$ , descrito anteriormente). Se obtuvo el constructo  $\text{DR}\beta 1^*1501:\text{I-E}\beta 3$  esencialmente tal como se describe en Woods *et al.* (Woods *et al.*, J. Exp. Med. 180:173-81, 1994), con los siguientes cambios: Se digirió parcialmente el vector pACYC184 que contenía los exones 1 y 2 de  $\text{DRB1}^*0401$ , y los exones 3-6 de  $\text{E}\beta 3$  con BamHI y se trató con la polimerasa Klenow para eliminar un sitio BamHI en el vector. Posteriormente, se clonó el exón 2 de  $\text{DRB1}^*1501$  en pACYC 184 que se había digerido previamente con BamHI y EcoRI para eliminar el exón 2 de  $\text{DRB1}^*0401$ . Se generaron ratones transgénicos mediante la microinyección de constructos quiméricos de cadena  $\alpha$  y  $\beta$  en huevos fertilizados de apareamientos (DBA/2xC57BL/6)F<sub>1</sub>. Se transfirieron los embriones viables a hembras pseudopregnadas para el desarrollo a término. Se sometió a retrocruzamiento dos veces la descendencia transgénica con el ratón deficiente en MHC de clase II,  $\text{MHCII}^{\Delta\Delta}$  (Madsen *et al.*, ProNatAcad Sci USA 96:10338-43, 1999).

Inducción de EAE activa y tratamiento con RTL. Se inmunizaron por vía subcutánea ratones Tg HLA-DR2 macho y hembra de entre 8 y 12 semanas de edad tal como se describe (Ito *et al.*, J Immunol. 167, 2001) en cuatro sitios en los costados con 0,2 ml de una emulsión compuesta por 200  $\mu\text{g}$  de péptido MOG-35-55 de ratón con adyuvante completo de Freund (CFA) que contenía 400  $\mu\text{g}$  de *Mycobacterium tuberculosis* H37RA (Difco, Detroit, MI). Además, se administró a los ratones toxina pertúsica (Ptx, List Biological Laboratories, Campbell, CA) en el día 0 y el día 2 tras la inmunización (25 ng y 67 ng por ratón, respectivamente). Se trataron los ratones por vía i.v. diariamente durante 8 días, comenzando 2-4 días tras el comienzo de los signos clínicos, con 100  $\mu\text{l}$  de RTL312, RTL342 o vehículo (Tris 20 mM, pH 8,5) que contenían 33  $\mu\text{g}$  de proteínas de RTL. Se evaluaron diariamente los ratones inmunizados de manera activa para determinar signos clínicos de EAE según la siguiente escala: 0 = normal; 1 = cola flácida o debilidad leve de las patas traseras; 2 = cola flácida y debilidad moderada de las patas traseras o ataxia leve; 3 = cola flácida y debilidad moderadamente grave de las patas traseras; 4 = cola flácida y debilidad grave de las patas traseras o debilidad leve de las patas delanteras o ataxia moderada; 5 = cola flácida y paraplejia con sólo debilidad moderada de las patas delanteras; y 6 = cola flácida y paraplejia con debilidad grave de las patas delanteras o ataxia grave o estado moribundo. Se determinó la puntuación diaria promedio para cada ratón sumando las puntuaciones clínicas diarias y dividiendo entre el número de días en que el ratón mostraba signos clínicos. Se calcularon las puntuaciones máxima media y diaria promedio más menos la DE para los grupos control y experimental.

## EJEMPLO 2

(Mutaciones diseñadas racionalmente convirtieron complejos de ligandos de receptores de células T recombinantes humanos en monómeros que conservaban la actividad biológica)

Se han descrito recientemente estudios de modificación por ingeniería genética de proteínas de ligando de TCR recombinantes (RTL) derivados de los dominios alfa-1 y beta-1 de HLA-DR2 (DRB1\*1501/DRA\*0101) (Chang *et al.*, J. Biol. Chem. 276:24170-76, 2001). Estas moléculas formaron agregados bien definidos que eran altamente solubles en tampones acuosos, con conservación de la actividad biológica (Burrows *et al.*, J. Immunol. 167:4386-95, 2001; Buenafe, JBC, 2003; Vandebark *et al.*, Journal of Immunology, 2003). Se analizó la superficie proximal a la membrana de la plataforma de lámina  $\beta$  que se empaquetaba sobre las superficies distales a la membrana de los dominios de plegamiento de Ig  $\alpha 2$  y  $\beta 2$ , considerando específicamente las características que podrían contribuir a estructuras o agregación de orden superior (figura 1).

La figura 1 muestra HLA-DR2, RTL302, y la superficie accesible a disolvente de la plataforma de lámina  $\beta$  de RTL. El panel izquierdo (A) muestra un modelo a escala de una molécula de MHC de clase II sobre la superficie de una APC. El panel derecho (B) muestra RTL302, una molécula monocatenaria soluble derivada de los dominios de unión a antígeno/reconocimiento de células T. La estructuras se basan en las coordenadas cristalográficas de HLA-DR2 (código de acceso de PDB 1BX2), y los dominios transmembrana se muestran esquemáticamente como cilindros de 0,5 nm. Los extremos amino y carboxilo terminales de HLA-DR2 y RTL302 se marcan en N, C, respectivamente. Los enlaces disulfuro se presentan como modelos de bola y varilla. El panel inferior derecho (C) muestra los residuos hidrófobos de la plataforma de lámina beta de RTL302. Las cadenas de lámina beta se representan en forma de cinta y los residuos hidrófobos se agrupan basándose en su ubicación dentro de la plataforma de lámina beta y en su nivel relativo de interacción con residuos de los dominios de plegamiento de Ig  $\alpha 2$  y  $\beta 2$ . Los residuos del grupo I V102, I104, A106, F108, L110 comprendían un núcleo central a lo largo de la cadena beta-1 del dominio alfa-1, y de manera periférica a este núcleo, L9 y M119. Los residuos del grupo II F19, L28, F32, V45, y V51 eran residuos de dominio beta-1 y los residuos del grupo III A133, V138 y L141 eran del dominio alfa-1.

Se agruparon estos residuos, basándose en su ubicación dentro de la plataforma de lámina beta y en su nivel relativo de interacción con residuos de los dominios de plegamiento de Ig  $\alpha 2$  y  $\beta 2$ , y se construyó una serie de mutantes dirigidos al sitio, sustituyendo residuos individuales y luego múltiples por residuos o bien de serina o bien de ácido aspártico. El estudio se desarrolló en dos fases, centrándose la primera fase en obtener proteínas solubles que eran monodispersas, y centrándose la segunda en la caracterización biofísica y bioquímica de las moléculas modificadas. La mutagénesis dirigida al sitio reiterativa permitió generar dos RTL modificados que eran adecuados para la caracterización biológica adicional (tabla I).

TABLA I. Moléculas usadas en este estudio

Molécula	Descripción
RTL302	Dominios $\beta 1 \alpha 1$ de HLA DR2 humano (DRB1*150101/DRA*0101)
RTL302 (5S)	RTL302 (V102S, I104S, A106S, F108S, L110S) <sup>a</sup>
RTL302 (5D)	RTL302 (V102D, I104D, A106D, F108D, L110D)
RTL303	RTL302/MBP-85-99 <sup>b</sup>
RTL312	RTL302/MOG-35-55 <sup>c</sup>
RTL320	RTL303 (5S)
RTL340	RTL303 (5D)
RTL342	RTL312(5D)
<sup>a</sup> Numeración de RTL302. Estos residuos corresponden a los residuos de cadena alfa de HLA-DR2 V6, I8, A10, F12 y L14. La numeración de residuos aumenta en las moléculas con Ag fijado para representar el péptido Ag (longitud variable) más el ligador (15 residuos).	
<sup>b</sup> MBP-85-99, ENPWHFFKNIVTPR	
<sup>c</sup> MOG-35-55, MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK	

RTL302 podría convertirse en un monómero con sustituciones de o bien cinco serinas (5S) o bien cinco aspartatos (5D), RTL302(5S) y RTL302(5D), respectivamente, dentro de un grupo de residuos a lo largo de la cara externa de la primera cadena de una lámina  $\beta$  antiparalela derivada de la cadena alfa de la molécula progenitora de HLA-DR2. Estos se denominaron residuos de núcleo del grupo I (figura 1, panel izquierdo A). La comparación de las moléculas modificadas con 5S o 5D con RTL302 mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC) (figura 2, panel superior A) demostró que tanto RTL302(5S) como RTL302(5D) se comportaban como monómeros de aproximadamente 25 kD.

La figura 2 muestra la cromatografía de exclusión molecular de RTL modificados. Se analizaron mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC) RTL purificados y replegados. El panel superior (A) muestra SEC de RTL302, RTL302(5S) y RTL302(5D). Estos RTL no contienen péptidos Ag fijados covalentemente. El panel inferior (B) muestra SEC de RTL derivados del HLA-DR2 de tipo natural que contienen el péptido Ag MBP-85-99 (RTL303) o MOG-35-55 (RTL312) fijado covalentemente. También se presentan las variantes 5S y 5D de RTL303 (RTL320 y

RTL340, respectivamente) y la variante 5D de RTL312 (RTL342). Se calibró la columna de exclusión molecular Superdex 75 16/60 con un conjunto de proteínas de peso molecular conocido con volúmenes de exclusión tal como se indica (\*); mioglobina, 17,3 kD; ovoalbúmina, 43 kD; albúmina sérica bovina 67 kD; catalasa 232 kD; tiroglobulina, 670 kD.

5 Se usó dispersión de luz dinámica (DLS) para medir las constantes de difusión y para calcular los radios hidrodinámicos para las moléculas (tabla II), y estos estudios demostraron de manera inequívoca que RTL302(5S) y RTL302(5D) eran monoméricos. Cuando se fijaron covalentemente péptidos Ag al extremo amino terminal de las moléculas, sus propiedades variaron ligeramente dependiendo del péptido Ag usado, y lo que es más importante, difirieron dependiendo de la presencia de las modificaciones 5S polar o 5D cargada. Comparando RTL320 (modificación 5S, péptido MBP-85-99 fijado covalentemente) con RTL340 (modificación 5D, péptido MBP-85-99 fijado covalentemente), RTL320 todavía tendía a agregarse, formándose la mayoría de las moléculas (85%) en multímeros de aproximadamente 5 moléculas. RTL340 era completamente monomérico y era más robusto en lo que se refiere a poder adaptarse a diversos péptidos Ag unidos covalentemente tales como MBP-85-99 (RTL340) y MOG-35-55 (RTL342) sin alteración significativa en las propiedades en disolución de los RTL (figura 2; tabla II).

15 Tabla II. Análisis hidrodinámico de RTL mediante dispersión de luz dinámica

Molécula	Radio (nm)	PM estimado (kD)	% de masa en tampón
RTL302 (pico I)a	17,6	2760	100
RTL302 (pico II)	2,5	27	100
RTL302 (5S)	2,5	27	98
RTL302 (5D)	2,3	25	100
RTL303	15,4	2030	100
RTL312 (pico I)	15,2	1970	31
RTL312 (pico II)	4,3	102	69
RTL320 (pico I)	13,5	1490	100
RTL320 (pico II)	4,8	131	100
RTL340	2,5	28	100
RTL342	2,6	31	100

Se analizó el estado hidrodinámico de RTL modificados mediante análisis de dispersión de luz usando un instrumento de dimensionamiento molecular DynaPro™ (Protein Solutions, Inc.). <sup>a</sup>Algunas de las proteínas mostraron dos picos claramente definidos mediante SEC y estos se caracterizaron independientemente. El pico I se refiere al pico de agregado (mayor) y el pico II se refiere a la fracción de menor tamaño, en la mayoría de los casos monomérica.

Los análisis bioquímicos adicionales demostraron que las moléculas modificadas con 5S y 5D conservaban su estructura nativa. Los RTL contienen un enlace disulfuro conservado nativo entre la cisteína 16 y 80 (numeración de aminoácidos de RTL302, correspondiente a los residuos 15 y 79 de la cadena beta de HLA-DR2). La oxidación al aire de estos residuos para reconstituir el enlace disulfuro nativo se demostró mediante un ensayo de desplazamiento en gel en el que se sometieron a ebullición muestras idénticas con o sin el agente reductor  $\beta$ -mercaptoetanol ( $\beta$ -ME) durante 5 minutos antes de SDS-PAGE. En ausencia de  $\beta$ -ME, los enlaces disulfuro se conservan y las proteínas normalmente demuestran una movilidad superior durante la electroforesis a través de geles de acrilamida debido a su estructura más compacta. Todas las moléculas de RTL producidas mostraron este patrón, indicando la presencia del enlace disulfuro conservado nativo. Estos datos representan una confirmación primaria de la integridad conformacional de las moléculas.

El dicroísmo circular (DC) demostró las estructuras secundarias altamente ordenadas de los constructos de RTL. Los RTL sin péptido Ag fijado covalentemente contenían el 20-25% de hélice alfa, el 21-27% de cadena beta antiparalela y el 20-22% de estructuras de giros beta (figura 3A; tabla III).

Tabla III. Análisis de estructura secundaria de RTL

Molécula	Hélice $\alpha$	Lámina $\beta$ antiparalela	Lámina $\beta$ paralela	Giro $\beta$	Estructuras helicoidales al azar	Total
RTL302 (pico I)	0,21	0,21	0,02	0,23	0,33	0,99
RTL302 (pico II)	0,20	0,27	0,00	0,20	0,32	0,99
RTL302(SS)	0,20	0,21	0,02	0,22	0,34	1,00
RTL302(5D)	0,20	0,27	0,00	0,20	0,20	1,00
RTL303	0,26	0,20	0,04	0,19	0,32	1,00
RTL312	0,18	0,24	0,07	0,17	0,31	0,96
RTL320 (pico I)	0,22	0,22	0,03	0,21	0,32	1,00
RTL320 (pico II)	0,19	0,19	0,03	0,23	0,35	1,00

Molécula	Hélice $\alpha$	Lámina $\beta$ antiparalela	Lámina $\beta$ paralela	Giro $\beta$	Estructuras helicoidales al azar	Total
RTL340	0,15	0,20	0,03	0,27	0,35	1,00
RTL342	0,19	0,22	0,05	0,18	0,30	0,93

Contenido en estructura secundaria derivado de los espectros deconvolucionados de los RTL presentados en la figura 3.

La figura 3 muestra espectros de dicroísmo circular (DC) de RTL derivados de DR2 modificados. El panel superior (A) muestra espectros de DC de RTL302, RTL302(5S) y RTL302(5D) "vacíos". El panel central (B) muestra espectros de DC de RTL que contienen el péptido Ag MBP-85-99 fijado covalentemente. RTL303, RTL320 y RTL340. El panel inferior (C) muestra curvas de desnaturalización térmica para RTL303, RTL320 y RTL340 mostrando un alto grado de cooperatividad y estabilidad. RTL340 era resistente a la desnaturalización y agregación térmica completa y es soluble incluso tras someterse a ebullición durante 5 minutos. A menos que se indique otra cosa, las mediciones de DC se realizaron a 25°C en un instrumento Aviv-215 usando una celda de 0,1 mm desde 260 hasta 180 nM en muestras de proteínas en Tris-Cl 20 mM, pH 8,5. Se determinó la concentración de cada proteína mediante análisis de aminoácidos. Los datos se expresan como Delta-épsilon por mol por cm. El análisis de la estructura secundaria se realizó usando el método de selección de variables (Compton *et al.*, Analytical Biochemistry 155:155-67, 1986).

Los RTL con péptidos Ag fijados covalentemente contenían el 15-19% de hélice alfa, el 19-22% de cadena beta antiparalela y el 18-23% de estructuras de giros beta (figura 3B; tabla III). Estas tres estructuras secundarias básicas de una cadena de polipéptido (hélice, lámina, estructura helicoidal) muestran cada una un espectro de DC característico en el UV lejano, y una proteína que consiste en estos elementos presenta espectros que pueden deconvolucionarse en cada una de las contribuciones individuales. Aunque hay limitaciones inherentes en el método (tal como no considerar la(s) interacción(es) de cromóforo dentro de diferentes regiones estructurales), el ajuste es bastante aceptable para lo que se esperaría para una evaluación cualitativa del plegamiento de proteínas de RTL y concuerda con los datos previos recogidos para las versiones multiméricas de los RTL (Chang *et al.*, J. Biol. Chem 276:24170-76, 2001). Los RTL monoméricos monodispersos conservan la estructura nativa del dominio de unión a Ag/reconocimiento de TCR progenitor de HLA-DR2.

También se usó DC para monitorizar la pérdida de estructura tras la desnaturalización térmica. Los RTL mostraron un alto grado de estabilidad térmica y el análisis de mínimos cuadrados no lineal indicó que los RTL descritos en este estudio se pliegan de manera cooperativa (figura 3C). La temperatura ( $T_m$ ) a la que se perdió la mitad de la estructura en Tris 20 mM, pH 8,5, fue difícil de determinar debido a las altas temperaturas de fusión observadas. La extrapolación de las curvas usando análisis no lineal produce una  $T_m$  de 92°C para RTL303, 87°C para RTL320 y 98°C para RTL340. Se notificó previamente una  $T_m$  para RTL303 de 78°C cuando la molécula se solubilizó en PBS (Chang *et al.*, J. Biol. Chem. 276:24170-76, 2001) reflejando el efecto que tenía el disolvente sobre la estabilidad global de las moléculas.

Se usó un ensayo de ELISA de "captura de péptido" con MOG biotinilada para comparar la unión de péptido Ag a RTL302, RTL302(5S) y RTL(5D). Se usa análisis de regresión no lineal usando un modelo de unión de un sitio (hipérbola) para calcular  $B_{m\acute{a}x}$  y  $K_d$  para las moléculas (figura 4A).

La figura 4 muestra la medición directa de la unión de péptido a RTL derivados de HLA-DR2. Unión de MOG biotinilada a RTL302 (círculos abiertos), RTL302(5S) (rombos abiertos) y RTL302(5D) (cuadrados abiertos). El panel izquierdo (A) muestra la saturación en función de la concentración de MOG biotinilada (la parte insertada muestra el análisis de Scatchard de la unión a péptido). El panel derecho (B) muestra la unión del péptido MOG biotinilado (0,15  $\mu$ M) a RTL en función del tiempo para comparar la tasa de unión inicial.

Tal como se muestra en la figura 4B, la unión del péptido MOG (0,15  $\mu$ M) a RTL en función del tiempo fue extremadamente rápida. Usando análisis de regresión lineal, se calculó que la velocidad inicial de unión de MOG era de 0,17 $\pm$ 0,06  $\Delta$ DO/min para RTL302, 0,11 $\pm$ 0,02  $\Delta$ DO/min para RTL302(5S) y 0,10 $\pm$ 0,02 para RTL(5D).

Se caracterizó la actividad *in vitro* de los RTL en un ensayo diseñado para cuantificar su capacidad para inducir la inhibición específica por Ag de la proliferación de células T (Burrows *et al.*, J. Immunol. 167:4386-95, 2001; Wang *et al.*, The Journal of Immunology, 2003; Vandenbark *et al.*, Journal of Immunology, 2003). El clon de células T restringidos por DR2, 4-G1, es específico para el péptido MBP-85-99. Las células que no se pretrataron con RTL (control "sin tratar") mostraron un índice de estimulación de 68X y las células pretratadas con RTL302 "vacío" mostraron un índice de estimulación próximo a 90X, un aumento del 31% por encima del control "sin tratar". La preincubación con RTL303, RTL320 o RTL340 mostró una inhibición de la proliferación mayor del 90% en comparación con el control "sin tratar" (tabla IV).

Tabla IV. Inhibición de la proliferación de células T específica de antígeno mediante la preincubación con RTL

Clon EN4-G1	Preincubación				
	Sin tratar	RTL302	RTL303	RTL320	RTL340
+APC solo	588,97	569,1	578,7	592,0	641,9
+APC/MBP85-99 (10 µg/ml)	40144,67	50841,1	2560,4	1847,7	1515,8
Índice de estimulación	68	89	4	3	2
Inhibición (%)	--	+31,1	-93,5	-95,2	-96,5

Cada punto de datos representa el promedio de pocillos por triplicado de cada tratamiento.

5 Recientemente se ha descrito encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE) inducida por MOG-35-55 en ratones transgénicos (Tg) DR2 (DRB1\*1501) (Vandenbark *et al.*, Journal of Immunology, 2003). Este modelo animal de esclerosis múltiple (EM) se caracterizó como una enfermedad crónica moderadamente grave con una penetrancia del 100%. Las características de la enfermedad incluyen parálisis ascendente marcada por lesiones del SNC inflamatorias, desmelinizantes. Se indujo EAE con el péptido MOG-35-55/CFA en el día 0 más Ptx en los días 0 y 2, y pudo observarse que los síntomas iniciales de la enfermedad comenzaban aproximadamente 10 días tras la inducción. Para evaluar el potencial clínico del RTL342 monomérico, se trataron ratones Tg-DR2 con EAE inducida por MOG 2-4 días tras el comienzo de los signos clínicos con RTL312, RTL342 o vehículo solo (figura 5, y véase también la tabla V).

10 La figura 5 muestra que RTL342 monomérico, disperso fue tan eficaz como RTL312 en el tratamiento de EAE en animales transgénicos DR\*1501. Puntuaciones clínicas medias de ratones transgénicos para HLA DR2 (DRB1\*1501/DRA\*0101) tratados con 33 µg de RTL312 (v), RTL342 (Δ) o vehículo solo (Tris, pH 8,5) (•). Se inmunizó a todos los ratones por vía s.c. con 200 µg de MOG-35-55 y 400 µg de CF A conjuntamente con 100 ng de Ptx por vía i.v. en el día 0 y 266 ng de Ptx 2 días después de la inmunización. En el día 14, se distribuyó a todos los ratones en 6 grupos según su similitud en la enfermedad y el sexo. Se inyectó diariamente a los ratones por vía i.v. RTL312, RTL342 o vehículo. (n = 4 por grupo, excepto para el grupo con vehículo donde n = 3; las flechas indican tratamiento).

20 El tratamiento con RTL312 o RTL342 revirtió rápidamente los signos clínicos establecidos de EAE (puntuación de aproximadamente 2,5) hasta una puntuación diaria promedio de <0,5 unidades hacia el final del periodo de tratamiento de ocho días. Este bajo grado de discapacidad se mantuvo sin inyecciones de RTL adicionales a lo largo del resto del periodo de observación, que en un experimento duró 5 semanas una vez detenido el tratamiento. En cambio, para la reversión de la EAE mediada por RTL312 o RTL342, los grupos control que recibieron vehículo o inyección de 33 µg de RTL303 no específico de Ag (que contiene el péptido MBP-85-99) desarrollaron EAE crónica moderadamente grave (puntuación >4).

Tabla V. Tratamiento con RTL de ratones transgénicos para DR2

Tratamiento	Incidencia	Comienzo	Pico	Mortalidad	
RTL312	4/4	9,5 ± 2,8	3 ± 1,8	0/4	29,8 ± 21,7*
RTL342	4/4	10,8 ± 2,2	2,6 ± 1,1	0/4	16 ± 10,9*
Vehículo	3/3	12,3 ± 1,2	6 ± 0	0/4	133,7 ± 11,1
*=		grupo experimental		grupo (p = 0,000)	

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entienden los expertos habituales en la técnica a la que pertenece esta invención.

**REIVINDICACIONES**

1. Ligando de células T recombinante (RTL) modificado, aislado que tiene un potencial reducido para agregarse en disolución, que comprende:

5 un componente de complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en forma de un polipéptido monocatenario (sc) que comprende múltiples elementos de dominio de MHC unidos covalentemente que comprenden dominios  $\alpha 1$  y  $\beta 1$  de un polipéptido de MHC de clase II, en el que el extremo amino terminal del dominio  $\alpha 1$  está unido covalentemente al extremo carboxilo terminal del dominio  $\beta 1$ , en el que el componente de MHC de clase II no incluye un dominio  $\alpha 2$  o  $\beta 2$ , y en el que el componente de MHC está modificado mediante la sustitución de uno o más aminoácidos hidrófobos dentro de la plataforma de lámina  $\beta$  de un polipéptido de MHC nativo o RTL que comprende el polipéptido de MHC nativo, mediante lo cual el RTL modificado muestra agregación reducida en disolución en comparación con la agregación mostrada por un RTL control, no modificado que tiene dicha estructura de componente de MHC pero que incorpora el polipéptido de MHC nativo que tiene una plataforma de lámina  $\beta$  no modificada.

15 2. RTL modificado, aislado según la reivindicación 1, en el que el componente de MHC de clase II comprende dominios  $\alpha 1$  y  $\beta 1$  de una proteína HLA-DR, dominios  $\alpha 1$  y  $\beta 1$  de una proteína HLA-DQ o dominios  $\alpha 1$  y  $\beta 1$  de una proteína HLA-DP.

3. RTL modificado, aislado según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que los dominios  $\alpha 1$  y  $\beta 1$  están acoplados mediante un ligador de péptido.

20 4. RTL modificado, aislado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además un determinante antigénico de células T unido al componente de MHC de clase II o unido covalentemente al componente de MHC de clase II.

5. RTL modificado, aislado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, combinado con o acoplado a una toxina eficaz para mediar en la destrucción de células T.

25 6. RTL modificado, aislado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dichos uno o más aminoácidos dentro de la plataforma de lámina  $\beta$  se seleccionan de las posiciones de aminoácido V102, I104, A106, F108 y L110 de RTL302, en el que RTL302 consiste en la secuencia de aminoácidos

MGDTRPRFLWQPKRECHFFNGTERVRFLLDRYFYNQEESVRFSDVGFRAVTELGPRDAEYWNSQKD  
 ILEQARAADVITYCRHNYGVVESFTVQRRVIKEEHVILQAEFYLNPDQSGEFMFDFDGDEIFHVDMAK  
 KETVWRLEEFGRFASFQAQALANIAVDKANLEIMTKRSNYTPITN.

7. RTL modificado, aislado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dichos uno o más aminoácidos están modificados mediante la sustitución por un aminoácido no hidrófobo.

30 8. RTL modificado, aislado según la reivindicación 7, en el que dichos uno o más aminoácidos están modificados mediante la sustitución por un aminoácido polar o cargado.

9. RTL modificado, aislado según la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en el que dichos uno o más aminoácidos están modificados mediante la sustitución por un residuo de serina o aspartato.

35 10. RTL modificado, aislado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que cada una de las posiciones de aminoácido V102, I104, A106, F108 y L110 de RTL302 están modificadas mediante la sustitución por un aminoácido no hidrófobo, en el que RTL302 consiste en la secuencia de aminoácidos

MGDTRPRFLWQPKRECHFFNGTERVRFLLDRYFYNQEESVRFSDVGFRAVTELGPRDAEYWNSQKD  
 ILEQARAADVITYCRHNYGVVESFTVQRRVIKEEHVILQAEFYLNPDQSGEFMFDFDGDEIFHVDMAK  
 KETVWRLEEFGRFASFQAQALANIAVDKANLEIMTKRSNYTPITN..

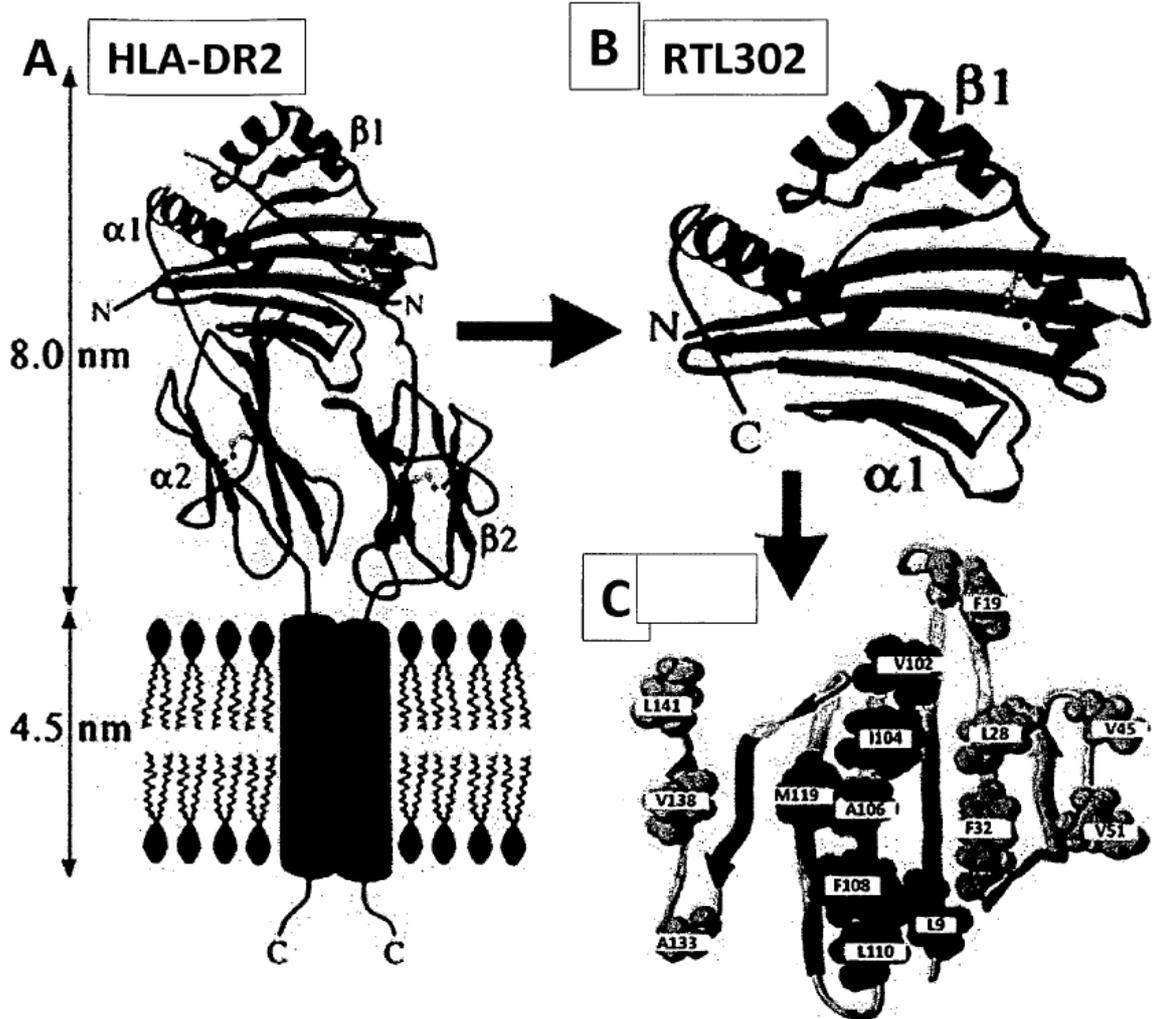
11. RTL modificado, aislado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dichos uno o más aminoácidos comprenden uno o cualquier combinación de L9, F19, L28, F32, V45, V51, A133, V138 y L141 de RTL302, en el que RTL302 consiste en la secuencia de aminoácidos

MGDTRPRFLWQPKRECHFFNGTERVRFLLDRYFYNQEESVRFDSVDFGEFRAVTELGPRDAEYWNSQKD  
ILEQARAAVDTYCRHNYGVVESFTVQRRVIKEEHVIIQAEFYLNPDQSGEFMDFDGDGEIFHVDMAK  
KETVWRLEEFGRFASFEAQ GALANIAVDKANLEIMTKRSNYTPITN..

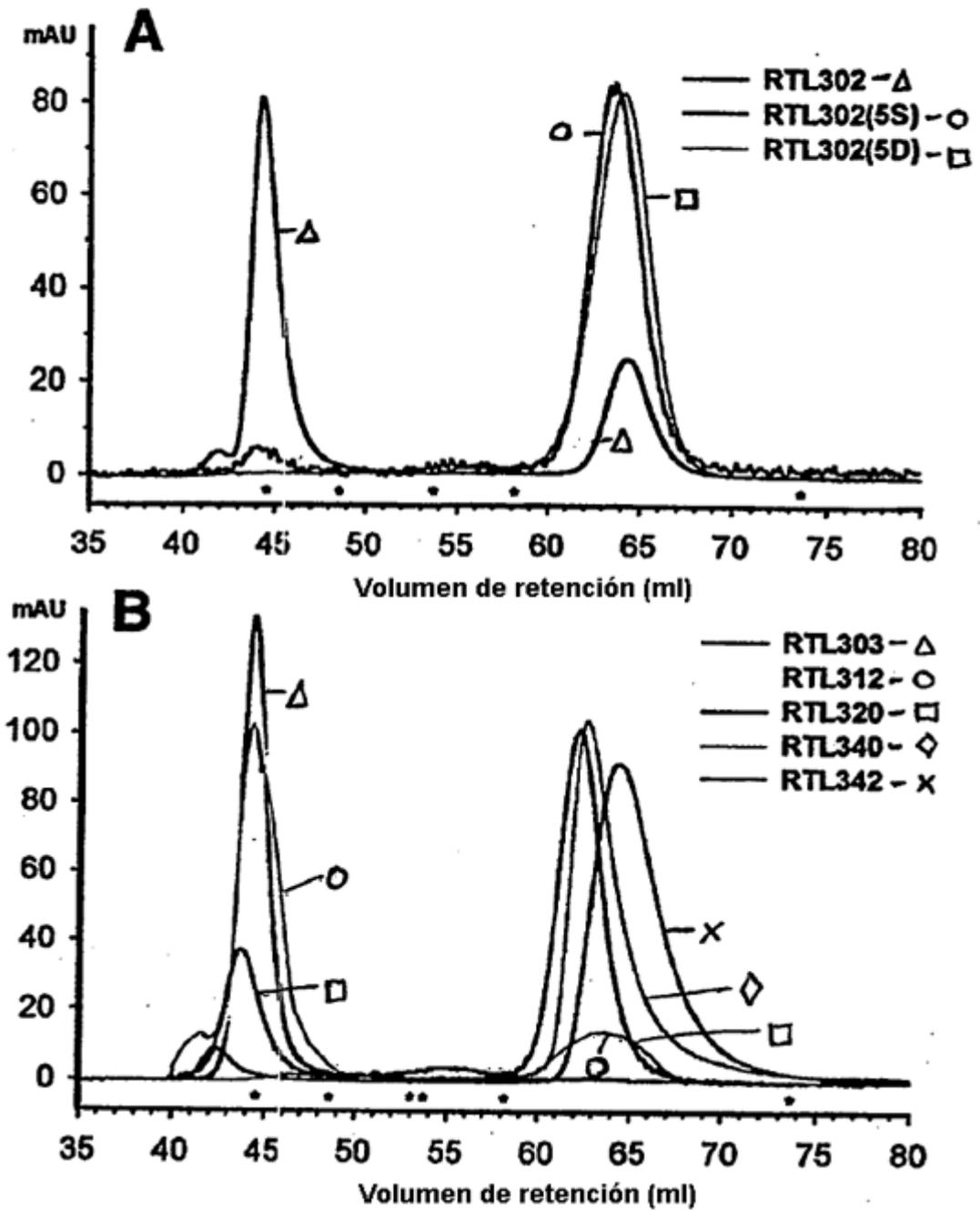
- 5 12. RTL modificado según la reivindicación 4, en el que el RTL modificado unido al determinante antigénico es eficaz para inhibir la proliferación de células T o la producción de citocinas inflamatorias *in vitro* o *in vivo* o es eficaz para reducir una actividad patógena o potencial patógeno de una célula T asociada con una enfermedad autoinmunitaria en un sujeto o célula de mamífero.
13. Formulación farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad o trastorno autoinmunitario en un sujeto mamífero que comprende un ligando de receptor de células T (RTL) recombinante, modificado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
- 10 14. Ligando de receptor de células T recombinante, modificado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para su uso en el tratamiento de un trastorno autoinmunitario en un sujeto.
15. Ligando de receptor de células T recombinante, modificado según la reivindicación 14, para su uso en el tratamiento del trastorno autoinmunitario esclerosis múltiple.
16. RTL modificado según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 15, en el que el determinante antigénico comprende proteína oligodendrocítica de mielina 35-55.

15

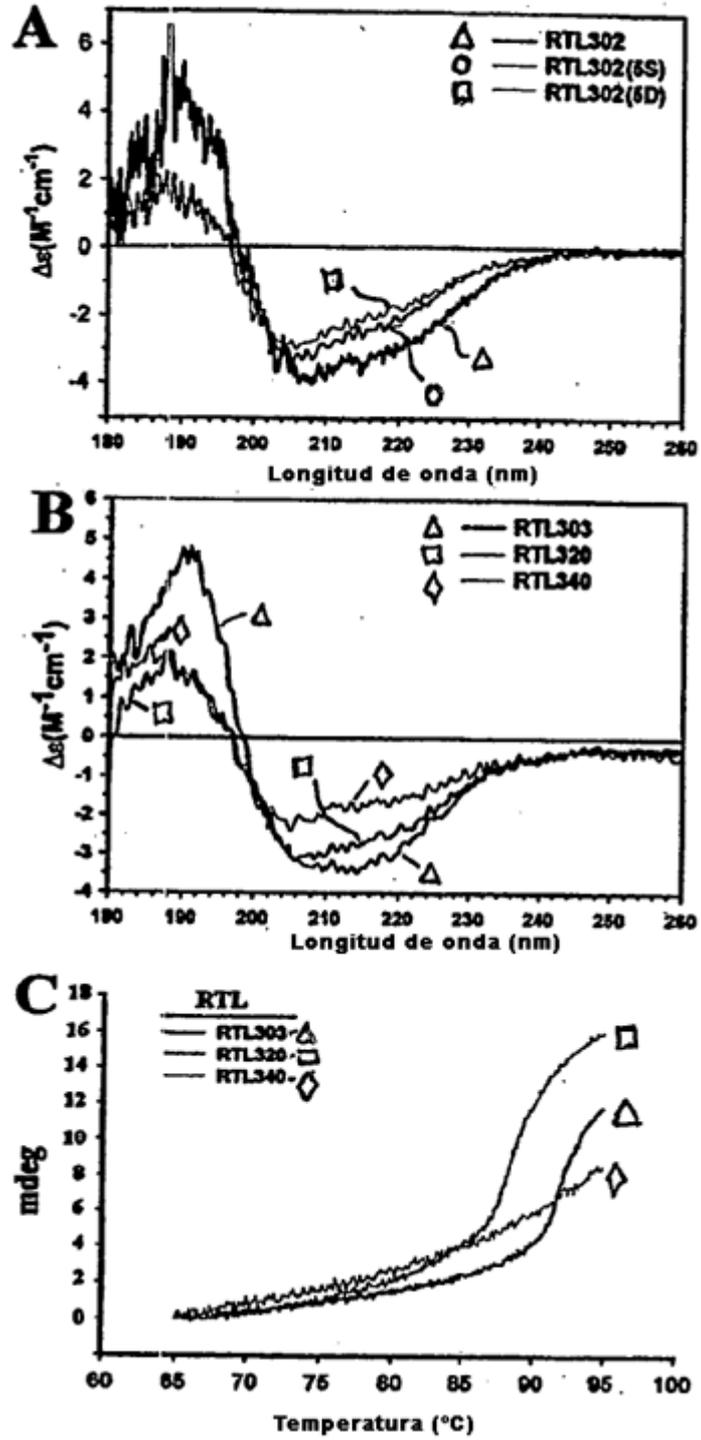
FIGURA 1



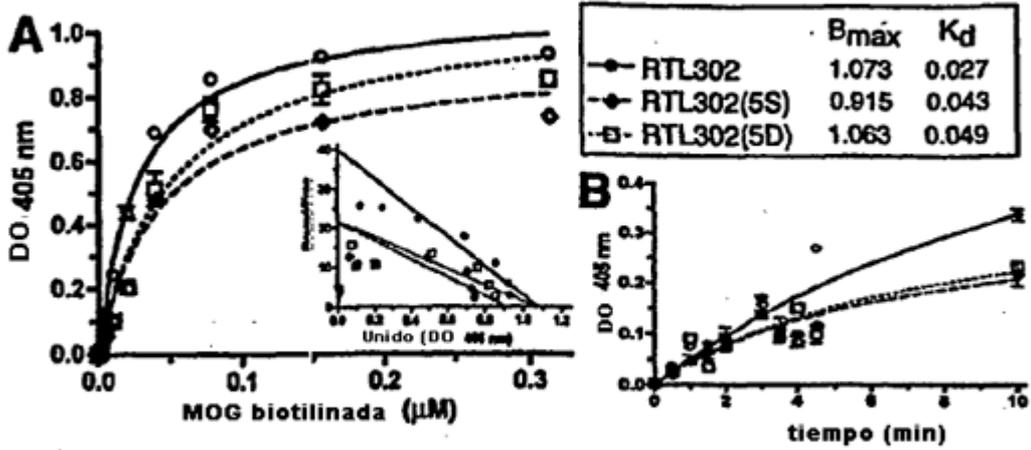
**FIGURA 2**



**FIGURA 3**



**FIGURA 4**



**FIGURA 5**

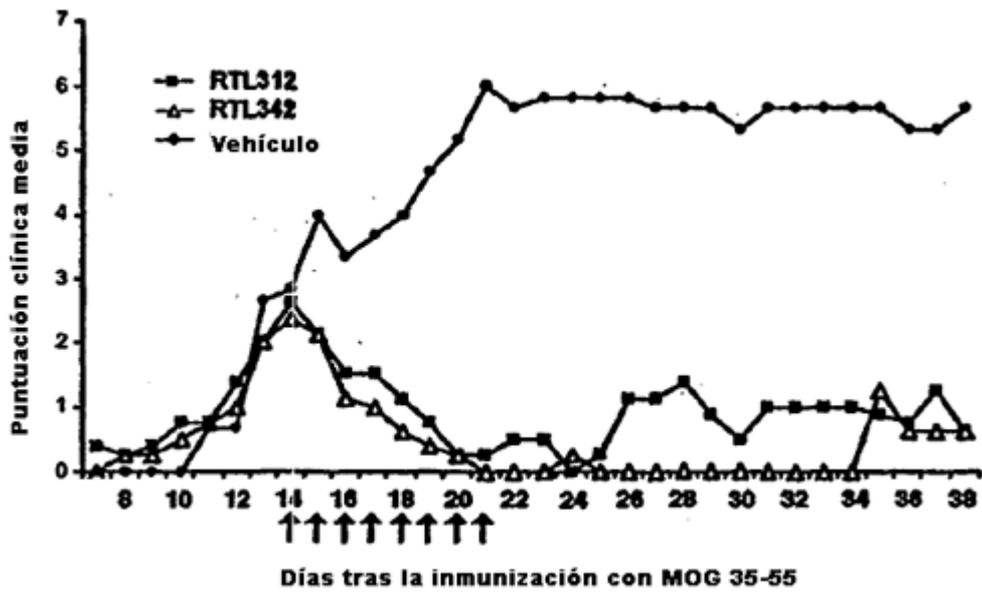


FIGURA 6

