

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 041**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

C07K 14/31 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.06.2002 E 02746240 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.12.2015 EP 1406657**

54 Título: **Un nuevo superantígeno modificado genéticamente para terapia humana**

30 Prioridad:

28.06.2001 SE 0102327

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

17.03.2016

73 Titular/es:

ACTIVE BIOTECH AB (100.0%)

BOX 724

220 07 LUND, SE

72 Inventor/es:

FORSBERG, GÖRAN;

ERLANDSSON, EVA;

ANTONSSON, PER y

WALSE, BJÖRN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 564 041 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

Un nuevo superantígeno modificado genéticamente para terapia humana

Antecedentes de la invención**Campo de la invención**

- 5 La presente invención se refiere al campo de la inmunología y de enfermedades proliferativas, tales como cáncer. Más particularmente, se refiere a conjugados que comprenden superantígenos que se han modificado para reducir la serorreactividad y al uso de dichos conjugados en el tratamiento del cáncer.

Técnica anterior

- 10 Los superantígenos (SAG) constituyen un grupo de proteínas bacterianas y víricas que son extremadamente eficientes en la activación de una gran fracción de la población de linfocitos T. Los superantígenos se unen directamente al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) sin procesarse. De hecho, los superantígenos se unen sin procesar fuera de la ranura de unión al antígeno sobre las moléculas de MHC de clase II, evitando de este modo la mayoría del polimorfismo en el sitio de unión al péptido convencional. El mecanismo de unión depende de la unión del superantígeno al receptor de los linfocitos T (TCR) en la cadena V β , en lugar de la unión a los bucles hipervariables del receptor de los linfocitos T (TCR).

15 Las enterotoxinas estafilocócicas (SE) son un grupo homólogo de superantígenos con respecto tanto a estructura como a función (Papageorgiou y col., 2000). Se sabe que son la causa principal de intoxicación alimentaria y síndrome del shock tóxico en seres humanos.

- 20 Se ha desarrollado un nuevo abordaje terapéutico de los tumores basado en SAg para el tratamiento adyuvante de tumores sólidos. Usa las dos armas principales del sistema inmunológico mediante incorporación de la parte Fab de un anticuerpo monoclonal específico de tumor y un SAg activador de linfocitos T en una única proteína de fusión recombinante. Las proteínas Fab-SAg unidas a células tumorales pueden desencadenar que los linfocitos T citotóxicos activados por SAG maten las células tumorales directamente mediante citotoxicidad mediada por células dependiente del anticuerpo frente al superantígeno (CCDAS). Además, los linfocitos T activados producen citocinas tumorocidas y proinflamatorias que contrarrestan los problemas de heterogeneidad tumoral y captación macromolecular, respectivamente.

- 25 Las terapéuticas tumorales basadas en superantígeno han tenido algún éxito, aunque un problema clínico que necesita abordarse es la activación del sistema inmunológico sistémico. Las proteínas de fusión con SEA silvestres se han investigado en ensayos clínicos de cáncer colorrectal y de páncreas (Alpaugh y col., 1998). Aunque se han obtenido resultados alentadores se han observado limitaciones. En primer lugar, el producto era muy tóxico. En segundo lugar, los anticuerpos preformados contra los superantígenos en los pacientes hicieron que la dosificación fuera compleja. Además, el producto era inmunogénico. Por tanto, los ciclos repetidos de terapia solo fueron posibles en un número limitado de pacientes.

- 30 Hasta la presente invención, las terapias basadas en SAg eran limitantes de la dosis. La primera invención es la primera en modificar un superantígeno que dio lugar a una serorreactividad disminuida con retención de la actividad de superantígeno; por consiguiente, la presente invención es nueva y no obvia.

La técnica anterior se trata adicionalmente en los documentos siguientes:

- 40 El documento WO 99 /04820 A2, que se refiere a un método para inactivar las células diana en presencia de linfocitos T poniendo los dos tipos de células en contacto con un superantígeno en presencia de un modulador inmunitario, en el que al menos uno del superantígeno y el modulador inmunitario es un conjugado entre un superantígeno "libre" y un resto que dirige el conjugado a las células diana. Documento WO 97/36932 A1;

Documento WO 97/36932 A1, que se refiere a un conjugado entre un resto dirigido a la diana y un superantígeno silvestre modificado;

- 45 documento WO 96/01650 A1, que se refiere a un conjugado que comprende un homólogo bioespecífico que se puede unir a una estructura predeterminada y un péptido derivado de un superantígeno;

documento WO 01/30854 A2, que se refiere a un anticuerpo, o un derivado o un fragmento del mismo, que tiene una estructura de unión para una estructura diana, en la que el anticuerpo se expresa y sobre la superficie celular de las células tumorales epiteliales gastrointestinales humanas y en una subpoblación de células epiteliales gastrointestinales humanas normales y que comprende secuencias específicas;

- 50 Griggs N.D. y col.; "Mapping of multiple binding domains of the superantigen staphylococcal enterotoxin A for HLA", Journal of Immunology, vol 148, no. 8, 1992, páginas 2516-2521 divulga múltiples regiones de SEA que son responsables de la unión al Ag de HLA en las células Raji y sugiere que la unión del superantígeno SEA a las moléculas del MHC implica varias regiones en N-terminal en el SEA así como un dominio interno adicional;

Hansson J. y col.: "Genetically engineered superantigens as tolerable antitumor agents", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 94, March 1997 (1997-03), páginas 2489-2494, que trata el uso de superantígenos unidos al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en la activación de los linfocitos T y un superantígeno específico que es una proteína de fusión de C215Fab y SEA, con la mutación puntual D227A;

5 documento WO 01/36486 A2, que se refiere al uso de un Ac ScFv (ScFv Ab) capaz de reconocer una molécula asociada a enfermedad (MAE) en la fabricación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de un estado de enfermedad asociado con una MAE;

Rosendahl A. y col.: "Long-term survival and complete cures of B16 melanoma-carrying animals after therapy with tumor-targeted IL-2 and sea", Int. J. Cancer, vol. 81, 1999, páginas 156-163, que demuestra que la inmunoterapia con Fab-SEA está fuertemente potenciada por la coadministración de Fab-IL-2;

10 Sogaard M. y col.: "Antibody-targeted superantigens in cancer immunotherapy", Immunotechnology, vol. 2, 1996, páginas 151-162; que es una revisión que describe inmunoterapia para el cáncer en la que los superantígenos son dirigidos al tumor mediante fusión genética con un fragmento Fab de un anticuerpo monoclonal específico de tumor;

15 el documento EP 1 103 268 A1, divulga en términos muy generales el uso de una enterotoxina estafilocócica (EE), o un homólogo, fragmento, proteína de fusión o derivado de la misma, en la fabricación de un medicamento para la administración mediante infusión en un paciente para tratar cáncer; excluyéndose el tratamiento de los carcinomas que expresan MHC de clase II; y

20 el documento WO 91/10680 A1, que, de forma similar al documento relacionado EP 1 103 268, se centra en el tratamiento de cáncer y en los efectos de destrucción tumoral de las enterotoxinas y compuestos relacionados, y que trata las enterotoxinas de *Staphylococcus aureus* en términos generales.

Breve resumen de la invención

25 En lo anterior se ha esbozado de una forma general las características y las ventajas técnicas de la presente invención para que la descripción detallada de la invención que sigue se pueda entender mejor. Otras características y ventajas de la invención se describirán a continuación y forman el objeto de las reivindicaciones de la invención. Se cree que las nuevas son distintivas de la invención, tanto en cuanto a su organización como al método de operación, junto con objetos y ventajas adicionales, se entenderán mejor a partir de la descripción siguiente cuando se consideran en relación con las figuras adjuntas.

30 En la presente invención se proporciona un conjugado que comprende un superantígeno bacteriano y un resto de anticuerpo, en el que el superantígeno es la enterotoxina E estafilocócica (SEE), en la que la secuencia de aminoácidos del superantígeno comprende las regiones A a E, en la que la región A está dentro del sitio de unión al TCR y determina la unión al TCR, y las regiones B a E determinan la unión a las moléculas de MHC de clase II, en la que se han introducido los siguientes reemplazos de restos de aminoácidos dentro de la región C: K79E, K81E, K83S, K84S, y

35 en la que se han introducido los siguientes reemplazos de restos de aminoácidos dentro de la región A: R20G, N21T, S24G, R27K, y en la que opcionalmente también los aminoácidos en la posición 173 y/o la posición 204 dentro de la región A se ha/han sustituido, y

40 en la que se ha introducido la sustitución D227S(o A) dentro de la región E, y en la que se han sustituido uno o más de los restos de aminoácidos en las posiciones 34, 35, 39, 40, 41, 42, 44, 45 y 49 dentro de la región B y/o en las posiciones 74, 75, 78 dentro de la región C y/o las posiciones 187, 188, 189, 190 dentro de la región D y/o en la posición y/o en la posición 217, 220, 222, 223, 225 dentro de la región E, de forma que el superantígeno sustituido tiene una serorreactividad reducida en comparación con el superantígeno del cual deriva,

y en el que el resto de anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa o cualquier otro fragmento activo de anticuerpo de unión a antígeno, que está dirigido contra una estructura de superficie celular asociada a cáncer.

45 En realizaciones específicas, el superantígeno en el conjugado tiene la secuencia de aminoácidos representada en la SEC ID N° 2 (SEA/E-120).

En realizaciones adicionales, el resto de anticuerpo del conjugado es un fragmento Fab. Los fragmentos Fab específicos pueden incluir C215Fab o 5T4Fab.

En realizaciones específicas, el conjugado tiene la secuencia de aminoácidos representada en la SEC ID N° 1.

50 Otras realizaciones se refieren al conjugado tratado anteriormente usado en el tratamiento del cáncer. El cáncer se puede seleccionar de cáncer de pulmón, mama, colon, riñón, páncreas, ovarios, estómago, cuello uterino y próstata.

Otras realizaciones se refieren al uso del conjugado tratado anteriormente para la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer. El medicamento puede ser para uso en administración intravenosa en el tratamiento del cáncer.

En otras realizaciones específicas se proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del conjugado tratado anteriormente.

Breve descripción de las figuras

5 Las siguientes figuras forman parte de la presente especificación y están incluidas para demostrar adicionalmente ciertos aspectos de la presente invención. La invención puede entenderse mejor por referencia a una o más de estas figuras en combinación con la descripción detallada de realizaciones específicas presentadas en el presente documento.

10 La figura 1 muestra fragmentos peptídicos reconocidos por anti-SEA humano que se identificaron a partir de un digerido con pepsina de SEA/E-18 eluido de una columna anti-SEA. Los fragmentos se identificaron tanto antes como después de la purificación usando HPLC de fase inversa acoplada a un espectrómetro de masas (EM). Los fragmentos encontrados en el digerido al mismo tiempo de retención tanto antes como después de la purificación por afinidad se consideraron positivos.

15 La figura 2 es los siete péptidos diferentes identificados, mostrados como líneas encima de la secuencia de aminoácidos para SEA/E-120. Los caracteres en gris claro indican qué restos se han alterado en SEA/E-120 en comparación con SEA/E-18.

La figura 3 es una alineación de la secuencia estructural de SEA, SED y SEH usada como molde para construir el modelo de ordenador comparativo de SEA/E-18. Las regiones conservadas estructurales están marcadas con recuadros negros.

20 La figura 4 es una alineación de secuencia múltiple de SEA, SEE, SEA/E-18 y SEA/E-120. Mostradas como líneas encima de la alineación se encuentran las cinco regiones diferentes A-E dentro de las cuales están todas las sustituciones en SEA/E-120.

La figura 5 es un modelo de SEA/E-18 (en negro) superpuesto sobre SEA (1SXT, en gris).

La figura 6 es las regiones de SEA/E-18 que corresponden a los péptidos de seroreactividad identificados.

25 La figura 7 es un ensayo de proximidad por centelleo (SPA) que midió la unión específica de anti-SEA humano ¹²⁵I unido a C215FabSEA, C215FabSEA/E-18, -65, -97, -109, -110, -113 o -120 sobre F(ab)₂ anti-ratón conjugado con biotina sobre perlas de PVT con estreptavidina.

30 La figura 8A y la figura 8B ilustran la capacidad para mediar en la citotoxicidad dirigida a tumor. La figura 8A ilustra la citotoxicidad medida en el ensayo de citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo del superantígeno, CCDAS. La figura 8B muestra la eficiencia de los superantígenos para mediar en la destrucción de los linfocitos T de las células que expresan MHC de clase II en citotoxicidad sistémica que podrían causar efectos secundarios medidos en un ensayo de citotoxicidad celular dependiente de superantígeno (CCDS). Todas las nuevas quimeras disminuyeron su efecto en la CCDS en al menos 1 log y en hasta 3 log para C215FabSEA/E-120.

35 La figura 9 es el diagrama en cinta del modelo SEA/E-120. Las cadenas laterales de los restos G20, T21, G24 y K27 están marcadas en gris oscuro, las cadenas laterales de los restos S34, S39, S40, E41, K42, A44, T49, T74, A75, S78, E79, E81, S83 y S84 están marcadas en gris, las cadenas laterales de los restos T217, S220, T222, S223, S225 están marcadas en negro y la cadena lateral del resto S227 está marcada en gris claro.

La figura 10 es una secuencia de aminoácidos de 5T4FabSEA/ E-120 (SEC ID N° 1) con las partes variables del anticuerpo 5T4 murino y las partes constantes del anticuerpo C242 murino. Las posiciones 1-458 es la cadena A y las posiciones 459-672 es la cadena B.

Descripción detallada de la invención

Como se usa en el presente documento, la especificación "un" o "uno/a" puede significar uno o más. Como se usa en el presente documento en las reivindicaciones, cuando se utilizan junto con la palabra "que comprende", las palabras "un" o "uno/a" puede significar uno o más de uno. Tal como se usa en el presente documento "otro" puede significar al menos un segundo o más.

45 El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de inmunoglobulina que es capaz de unirse específicamente a un epítipo específico sobre un antígeno. Como se usa en el presente documento, un anticuerpo se entiende que hace referencia en líneas generales a cualquier agente de unión inmunológica tal como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. Los anticuerpos pueden ser inmunoglobulinas intactas derivadas de fuentes naturales o de fuentes recombinantes, y pueden ser porciones inmunorreactivas de inmunoglobulinas intactas. Los anticuerpos en la presente invención pueden existir en diversas formas, incluyendo, por ejemplo, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, Fv, Fab y F(ab)₂, así como anticuerpos monocatenarios y anticuerpos humanizados (Harlow y col., 1988; Bird y col., 1988).

55 El término "antígeno" como se usa en el presente documento se define como una molécula que provoca una respuesta inmunitaria. La respuesta inmunitaria puede implicar la producción de anticuerpos, la activación de células específicas competentes inmunológicamente o ambas. Un antígeno puede derivar de organismos, subunidades de proteínas/antígenos, células enteras muertas o inactivadas, o lisados. Por tanto, un experto en la técnica sabe que cualquier macromolécula, incluidas prácticamente todas las proteínas, puede servir como antígenos. Adicionalmente, los antígenos se pueden obtener a partir de ADN recombinante.

El término “cáncer”, como se usa en el presente documento, se define como una enfermedad proliferativa o una neoplasia maligna (tumor). Los ejemplos incluyen, entre otros, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovarios, cáncer cervical, cáncer de piel, cáncer pancreático, cáncer colorrectal y cáncer de pulmón.

5 El término “conjugado” como se usa en el presente documento, se define como una proteína de fusión de un superantígeno fusionado o conjugado a un anticuerpo o fragmento de un anticuerpo.

El término “inmunogénico” o “inmunogenicidad”, como se usa en el presente documento, se define como una sustancia que provoca una respuesta inmunitaria.

10 La expresión “complejo mayor de histocompatibilidad” o “MHC”, como se usa en el presente documento, se define como un grupo específico de genes muchos de los cuales codifican proteínas de superficie celular relacionadas evolutivamente implicadas en la presentación del antígeno, que están entre los determinantes más importantes de la histocompatibilidad. El MHC de clase I, o MHC-I, funciona principalmente en la presentación del antígeno a los linfocitos T CD8. El MHC de clase I.e., o MHC-II, funciona principalmente en la presentación del antígeno a los linfocitos T CD4.

15 El término “serorreactivo”, “seorreacción” o “serorreactividad”, como se usa en el presente documento, se define como una reacción o acción que se produce como resultado de suero o sueros. Un experto en la técnica conoce que el suero o sueros de un paciente o animal contiene anticuerpos neutralizantes o anticuerpos preformados o anticuerpos endógenos frente a diversos antígenos o moléculas. Por tanto, la serorreactividad se refiere a la reacción de los anticuerpos neutralizantes en el suero.

20 El término “superantígeno”, como se usa en el presente documento, se define como una clase de moléculas que estimulan una subpoblación de linfocitos T mediante la unión a moléculas de MHC de clase II y dominios V β de los receptores de los linfocitos T, estimulando la activación de los linfocitos T que expresan segmentos génicos V β V concretos.

25 La expresión “receptor de linfocitos T” como se usa en el presente documento, se define como un receptor que consiste en un heterodímero unido por disulfuro de las cadenas α o β altamente variables expresadas en la membrana celular como un complejo con las cadenas de CD3 invariables. Los linfocitos T portadores de este tipo de receptor a menudo se denominan linfocitos T α : β . Un receptor alternativo formado por las cadenas γ y δ variables se expresa CD3 en una subpoblación de linfocitos T.

La expresión “terapéuticamente eficaz” como se usa en el presente documento se define como la cantidad de la composición farmacéutica que es eficaz en el tratamiento de una enfermedad o una afección.

30 El término “variante” o “variantes”, como se usa en el presente documento, se refiere a proteínas o péptidos que difieren de una proteína o péptido de referencia, respectivamente. Las variantes en este sentido se describen a continuación y en otros lugares de la presente divulgación con mayor detalle. Por ejemplo, los cambios en la secuencia de ácido nucleico de la variante pueden ser silenciosos, es decir, pueden no alterar los aminoácidos codificados por la secuencia de ácido nucleico. Cuando las alteraciones se limitan a cambios silenciosos de este tipo, una variante codificará un péptido con la misma secuencia de aminoácidos que el péptido de referencia. Los cambios en la secuencia de ácido nucleico de la variante pueden alterar la secuencia de aminoácidos de un péptido codificado por la secuencia de ácido nucleico de referencia. Dichos cambios de ácido nucleico pueden dar como resultado sustituciones, adiciones, supresiones, fusiones y truncamientos de aminoácidos en el péptido codificado por la secuencia de referencia, como se trata más adelante. Generalmente, las diferencias en las secuencias de aminoácidos son limitadas, de manera que las secuencias de la referencia y la variante son estrechamente similares en conjunto y, en muchas regiones, idénticas. Una variante y péptido de referencia se puede diferenciar en la secuencia de aminoácidos en una o más sustituciones, adiciones, deleciones, fusiones y truncamientos, que pueden estar presentes en cualquier combinación. Una variante también puede ser un fragmento de un péptido de la invención que difiere de una secuencia peptídica de referencia por ser más corto que la secuencia de referencia, tal como por una deleción terminal o interna. Otra variante de un péptido de la invención también incluye un péptido que conserva esencialmente la misma función o actividad que dicho péptido. Una variante también puede ser (i) uno en el que uno o más de los restos de aminoácidos están sustituidos por un resto de aminoácido conservado o no conservado y dicho resto de aminoácido sustituido puede o no ser uno codificado por el código genético, o (ii) uno en el que uno o más de los restos de aminoácidos incluye un grupo sustituyente, o (iii) uno en el que el péptido maduro está fusionado a otro compuesto, tal como un compuesto para aumentar la semivida del péptido (por ejemplo, polietilenglicol) o (iv) uno en el que los aminoácidos adicionales están fusionados con el péptido maduro, tal como una secuencia líder o secretora o una secuencia que se usa para la purificación del péptido maduro. Las variantes se pueden hacer mediante técnicas de mutagénesis, incluidas las aplicadas a ácidos nucleicos, aminoácidos, células u organismos, o pueden hacerse por medios recombinantes.

55 La expresión “actividad biológica”, como se usa en el presente documento, se refiere a una propiedad intrínseca de una molécula específica, por ejemplo activación de determinadas células o unión a determinados receptores. La definición, como se usa en el presente documento, es principalmente cualitativa en lugar de cuantitativa.

I. Modificación de los superantígenos

La presente invención se refiere a la modificación de superantígenos mediante la disminución de su inmunogenicidad mediante la reducción de su serorreactividad. Un experto en la técnica es consciente de que serorreactividad se refiere a la reacción de las moléculas o antígenos con anticuerpos neutralizantes en los sueros.

- 5 Específicamente, la presente invención se refiere a un conjugado que comprende un superantígeno bacteriano y un resto de anticuerpo, en el que el superantígeno es la enterotoxina E estafilocócica (SEE) en la que la secuencia de aminoácidos del superantígeno comprende las regiones A a E, en la que la región A está dentro del sitio de unión al TCR y determina la unión al TCR, y las regiones B a E determinan la unión a las moléculas de MHC de clase II, en la que se han introducido los siguientes reemplazos de restos de aminoácidos dentro de la región C: K79E, K81E, K83S, K84S, y
- 10 en la que se han introducido los siguientes reemplazos de restos de aminoácidos dentro de la región A: R20G, N21T, S24G, R27K, y en la que opcionalmente también los aminoácidos en la posición 173 y/o la posición 204 dentro de la región A se ha/han sustituido, y
- 15 en la que se ha introducido la sustitución D227S(o A) dentro de la región E, y
- en la que se han sustituido uno o más de los restos de aminoácidos en las posiciones 34, 35, 39, 40, 41, 42, 44, 45 y 49 dentro de la región B y/o en las posiciones 74, 75, 78 dentro de la región C y/o las posiciones 187, 188, 189, 190 dentro de la región D y/o en la posición y/o en la posición 217, 220, 222, 223, 225 dentro de la región E, de forma que el superantígeno sustituido tiene una serorreactividad reducida en comparación con el superantígeno del cual deriva; y en el que el resto de anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa o cualquier otro fragmento activo de
- 20 anticuerpo de unión a antígeno, que está dirigido contra una estructura de superficie celular asociada a cáncer.

A. Superantígenos

- El superantígeno bacteriano usado de acuerdo con la invención es SEE. Otros superantígenos bacterianos que se han utilizado en el trabajo que condujo a la presente invención incluyen otra enterotoxina estafilocócica (SE), una exotoxina de *Streptococcus pyogenes* (SPE), una toxina asociada al shock tóxico de *Staphylococcus aureus* (TSST-1), una exotoxina mitogénica de estreptococos (SME) y un superantígeno de estreptococos (SSA). Un experto en la técnica se da cuenta de que las estructuras tridimensionales de los superantígenos enumerados anteriormente se pueden obtener del banco de datos de proteínas (PDB, www.rcsb.org). También adicionalmente, un experto en la técnica puede obtener las secuencias de ácidos nucleicos y las secuencias de aminoácidos de los superantígenos enumerados anteriormente y otros superantígenos de GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/GenbankSearch.html>).
- 25
- 30

- El superantígeno SEE es un superantígeno de títulos bajos. Los expertos en la técnica conocen y entienden que los sueros de seres humanos contienen normalmente títulos elevados de anticuerpos contra superantígenos. Para los superantígenos de estafilococos, por ejemplo, los títulos relativos son TSST-1 > SEB > SEC-1 > SEC2 > SEA > SED > SEE. Un experto en la técnica se da cuenta de que estos títulos relativos indican problemas de
- 35 inmunogenicidad y problemas con serorreactividad o problemas con anticuerpos neutralizantes. Por lo tanto, la presente invención contempla el uso del superantígeno SEE de títulos bajos para evitar la serorreactividad de los superantígenos administrados parenteralmente.

- Todavía más, es claramente conocido y entendido que las secuencias de proteínas y la reactividad cruzada inmunológica de los superantígenos o enterotoxinas estafilocócicas se dividen en dos grupos relacionados. Un grupo
- 40 consiste en SEA, SEE, SED y SEH. El segundo grupo es SPEA, SEC, SEB y SSA. Por lo tanto, la presente invención también contempla el uso del superantígeno SEE de títulos bajos para disminuir o eliminar la reactividad cruzada de la presente invención con títulos altos o anticuerpos endógenos contra enterotoxinas estafilocócicas.

B. Variantes de superantígenos

- Las variantes de secuencias de aminoácida de las proteínas superantígenos pueden ser variantes de sustitución, inserción o supresión. Estas variantes se pueden purificar de acuerdo con métodos conocidos, tales como precipitación (por ejemplo, sulfato de amonio), HPLC, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad (incluyendo cromatografía de inmutafinidad) o varias separaciones por tamaño (sedimentación, electroforesis en gel, filtración en gel).
- 45

- Las variantes de sustitución o variantes de reemplazo típicamente contienen el intercambio de un aminoácido por otro en uno o más sitios dentro de la proteína. Las sustituciones pueden ser conservadoras, es decir, un aminoácido se sustituye por uno de forma y carga similar. Las sustituciones conservadoras son bien conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, los cambios de: alanina a serina; arginina a lisina; asparagina a glutamina o histidina-, aspartato a glutamato; cisteína a serina; glutamina a asparagina; glutamato a aspartato; glicina a prolina; histidina a asparagina o glutamina; isoleucina a leucina o valina; leucina a valina o isoleucina; lisina a arginina, glutamina o glutamato; metionina a leucina o isoleucina; fenilalanina a tirosina, leucina o metionina; serina a treonina; treonina a serina; triptófano a tirosina; tirosina a triptófano o fenilalanina; y valina a isoleucina o leucina.
- 50
- 55

Por lo tanto, los inventores contemplan que se pueden realizar varios cambios en las secuencias de ADN de genes sin pérdida apreciable de la utilidad o actividad biológica de las proteínas, como se trata más adelante. Siendo la

actividad la inducción de las respuestas de los linfocitos T para dar como resultado la citotoxicidad de las células tumorales. Todavía más, la afinidad del superantígeno por las moléculas MHC de clase II se reduce con efectos mínimos sobre la citotoxicidad del superantígeno.

5 Al realizar dichas sustituciones, se puede considerar el índice hidropático de los aminoácidos. La importancia del índice hidropático de los aminoácidos para conferir función biológica interactiva a una proteína se entiende generalmente en la técnica (Kyte y Doolittle, 1982). Se acepta que el carácter hidropático relativo del residuo de aminoácido contribuye a la estructura secundaria de la proteína resultante, que a su vez define la interacción de la proteína con otras moléculas, por ejemplo, enzimas, sustratos, receptores, ADN, anticuerpos, antígenos y similares.

10 A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático sobre la base de su hidrofobicidad y características de carga (Kyte y Doolittle, 1982), que son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5).

15 En la técnica se sabe que ciertos aminoácidos pueden estar sustituidos por otros aminoácidos que tienen un índice o puntuación hidropático similar y seguir siendo una proteína con actividad biológica similar, es decir seguir obteniendo una proteína biológica funcionalmente equivalente. Al realizar dichos cambios, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos están dentro de ± 2 , particularmente preferidos son aquéllos que están dentro de ± 1 de cada uno y todavía más particularmente preferidos son aquéllos dentro de $\pm 0,5$.

20 También se entiende en la técnica que la sustitución de aminoácidos similares se puede realizar con eficacia en base a la hidrofiliidad. La patente de EE.UU. 4.554.101 indica que la mayor hidrofiliidad media local de una proteína, dirigida por la hidrofiliidad de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con una propiedad biológica de la proteína. Como se detalla en la patente de EE.UU. 4.554.101, los siguientes valores de hidrofiliidad se han asignado a residuos de aminoácidos: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0 \pm 1); glutamato (+3,0 \pm 1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5 \pm 1); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5) y triptófano (-3,4).

25 Se entiende que un aminoácido puede sustituirse con otro que tenga un valor de hidrofiliidad similar y al mismo tiempo obtener una proteína biológicamente equivalente e inmunológicamente equivalente. Al realizar dichos cambios, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofiliidad están dentro de ± 2 ; particularmente preferidos son aquéllos que están dentro de ± 1 ; y todavía más particularmente preferidos son aquéllos dentro de $\pm 0,5$.

C. Proteínas de fusión

35 Un tipo especial de la variante de inserción es la proteína de fusión. Esta molécula tiene, generalmente, toda o una parte sustancial de la molécula nativa, unida en el extremo N o C, a toda o una parte de un segundo polipéptido. Por ejemplo, una proteína de fusión de la presente invención incluye la adición de un dominio inmunológicamente activo, tal como un fragmento de anticuerpo, a las células tumorales diana específicas.

Todavía más, la inclusión de un sitio de escisión en o próximo a la unión de fusión facilitará la eliminación del polipéptido extraño tras la purificación. Otras fusiones útiles incluyen enlaces de dominios funcionales, tales como sitios activos de enzimas, dominios de glicosilación, otras señales dirigidas celulares o regiones transmembrana.

40 D. Cambio de dominio

Una serie interesante de variantes se puede crear mediante la sustitución de regiones homólogas de diversas proteínas. Esto se conoce, en ciertos contextos, como "cambio de dominio."

45 El cambio de dominio implica la generación de moléculas quiméricas usando polipéptidos diferentes pero, en este caso, relacionados. Mediante la comparación de diversas proteínas de SAg, se pueden hacer predicciones en cuanto a las regiones funcionalmente significativas de estas moléculas. Por tanto, es posible cambiar dominios relacionados de estas moléculas en un esfuerzo para determinar la criticidad de estas regiones para la función del SAg. Estas moléculas pueden tener un valor adicional en cuanto a que estas "quimeras" se pueden distinguir de las moléculas naturales, al tiempo que, posiblemente, proporcionan la misma función.

E. Purificación de proteínas

50 Será deseable purificar el SAg o variantes del mismo. Los expertos en la técnica conocen bien las técnicas de purificación de proteínas. Estas técnicas implican, en un nivel, el fraccionamiento bruto de los medios celulares en las fracciones peptídicas y no peptídicas. Habiendo separado la proteína de otras proteínas, la proteína de interés puede purificarse adicionalmente usando técnicas cromatográficas y electroforéticas para lograr la purificación parcial o completa (o la purificación hasta la homogeneidad). Ciertos procedimientos analíticos adecuados para la preparación de un péptido puro son cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión; electroforesis

en gel de poliacrilamida; enfoque isoeléctrico. Un procedimiento particularmente eficaz de purificación de péptidos es la cromatografía líquida rápida de proteínas o incluso la HPLC.

5 Ciertos aspectos de la presente invención se refieren a la purificación, y en realizaciones particulares, a la purificación sustancial, de una proteína o péptido codificados. La expresión "pepticuerpo o péptido purificado", tal como se usa en el presente documento, pretende referirse a una composición, que puede aislarse de otros componentes, en la que la proteína o péptido está purificado hasta un grado con respecto al estado en que puede obtenerse de manera natural. Por tanto, una proteína o péptido purificado también se refiere también a un péptido que está libre del entorno en el que puede producirse de manera natural.

10 Generalmente, "purificado" se referirá a una proteína o péptido que se ha sometido a fraccionamiento para eliminar otros diversos componentes y que conserva sustancialmente su actividad biológica expresada. Cuando se usa la expresión "sustancialmente purificada", esta designación hará referencia a una composición en la que la proteína o péptido forma el componente principal de la composición, de modo que constituye aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 95 % o más de las proteínas en la composición.

15 Los expertos en la técnica conocerán diversos procedimientos para cuantificar el grado de purificación de la proteína o péptido a la luz de la presente divulgación. Estos incluyen, por ejemplo, determinar la actividad específica de una fracción activa, o evaluar la cantidad de los polipéptidos dentro de una fracción mediante análisis de SDS/PAGE. Un procedimiento preferido para evaluar la pureza de una fracción es calcular la actividad específica de la fracción, comparar la actividad con la actividad específica del extracto inicial y, por tanto, calcular el grado de pureza, evaluado en la presente memoria descriptiva mediante un "veces el número de purificación". Las unidades reales usadas para representar la cantidad de actividad de unión dependerán por supuesto, de la técnica de ensayo concreta elegida para seguir la purificación y si la proteína o péptido expresada exhibe o no una actividad de unión detectable.

25 Los expertos en la técnica conocerán bien diversas técnicas adecuadas para su uso en la purificación de proteínas. Éstas incluyen, por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio, PEG, anticuerpos y similares o mediante desnaturalización térmica, seguida de centrifugación; etapas de cromatografía tales como cromatografía de intercambio iónico, de filtración en gel, de fase inversa, de hidroxilapatita y de afinidad; enfoque isoeléctrico; electroforesis en gel; y combinaciones de tales y otras técnicas. Tal como se conoce generalmente en la técnica, se cree que el orden de realización de las diversas etapas de purificación puede cambiarse o que ciertas etapas puedan omitirse, y todavía de como resultado un procedimiento adecuado para la preparación de una proteína o péptido sustancialmente purificado.

30 Se sabe que la migración de un polipéptido o polipéptido puede variar, algunas veces de manera significativa, con diferentes condiciones de SDS/PAGE (Capaldi y col., 1977). Por tanto, se apreciará que, en condiciones de electroforesis diferentes, pueden variar los pesos moleculares aparentes de los productos de expresión purificados o parcialmente purificados.

35 La cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) se caracteriza por una separación muy rápida con una extraordinaria resolución de los picos. Esto se consigue mediante el uso de partículas muy finas y presión alta para mantener un caudal adecuado. La separación se puede conseguir en cuestión de minutos, o como máximo de una hora. Además, solo se necesita un muy pequeño volumen de la muestra porque las partículas son tan pequeñas y están tan empaquetadas que el volumen del hueco es una fracción muy pequeña del volumen del lecho. Asimismo, la concentración necesaria de la muestra no tiene que ser muy grande porque las bandas son tan estrechas que existe muy poca dilución de la muestra.

40 La cromatografía en gel, o la cromatografía en tamiz molecular, es un tipo especial de cromatografía de partición que se basa en el tamaño molecular. La teoría que subyace a la cromatografía en gel es que la columna, que se prepara con partículas muy pequeñas de una sustancia inerte que contiene poros pequeños, separa las moléculas más grandes de las moléculas más pequeñas a medida que atraviesan o rodean los poros, en función de su tamaño. Siempre que el material del cual están hechas las partículas no adsorba las moléculas, el único factor que determina la velocidad del flujo es el tamaño. Por tanto, las moléculas se eluyen de la columna en tamaño decreciente, siempre que la forma sea relativamente constante. La cromatografía en gel no tiene igual para la separación de moléculas de diferente tamaño, ya que la separación es independiente de todos los demás factores, tales como el pH, la resistencia iónica, la temperatura etc. Asimismo, no hay prácticamente adsorción, menos diseminación en zona y el volumen de elución está relacionado de un modo simple con el peso molecular.

45 La cromatografía de afinidad es un procedimiento cromatográfico que depende de la afinidad específica entre una sustancia que se va a aislar y una molécula a la que se puede unir específicamente. Esta es una interacción de tipo receptor-ligando. El material de la columna se sintetiza acoplado de forma covalente una de las parejas de unión a una matriz insoluble. El material de la columna puede adsorber específicamente la sustancia de la solución. La elución se produce cambiando las condiciones en las que no se producirá la unión (alterar el pH, la fuerza iónica, la temperatura etc.).

F. Mutagénesis de variantes

5 La presente invención contempla que la modificación de la afinidad del superantígeno para las moléculas MHC de clase II puede disminuir la toxicidad del superantígeno. Por lo tanto, la afinidad disminuida por el las moléculas de MHC de clase II da como resultado una serorreactividad disminuida o una reacción disminuida con anticuerpos neutralizantes o anticuerpos endógenos o preformados.

10 En realizaciones específicas se emplea la mutagénesis para modificar la región del superantígeno que determina la unión moléculas de MHC de clase II. La mutagénesis se lleva a cabo mediante diversos procedimientos mutagénicos estándar. La mutación es el proceso por el cual se producen cambios en la cantidad o la estructura de un organismo. La mutación puede implicar la modificación de la secuencia de nucleótidos de un solo gen, bloques de genes o un cromosoma entero. Los cambios en genes individuales pueden ser la consecuencia de mutaciones puntuales, que implican la eliminación, adición o sustitución de una única base nucleotídica dentro de una secuencia de ADN, o pueden ser la consecuencia de cambios que implican la inserción o supresión de un gran número de nucleótidos.

15 Una técnica de mutagénesis particularmente útil es la mutagénesis de barrido de alanina en la que un número de restos están sustituidos de forma individual por el aminoácido alanina de modo que se pueden determinar los efectos de la pérdida de interacciones de la cadena lateral, al tiempo que se minimiza el riesgo de perturbaciones a gran escala en la conformación de la proteína (Cunningham y col., 1989).

20 En los últimos años, se han desarrollado técnicas para la estimación de la constante de equilibrio para la unión al ligando usando cantidades minúsculas de proteína (Patentes de Estados Unidos 5.221.605 y 5.238.808). La capacidad de realizar ensayos funcionales con pequeñas cantidades de material puede explotarse para desarrollar metodologías *in vitro* altamente eficientes para la mutagénesis de saturación de los anticuerpos. Los inventores omiten las etapas de clonación mediante la combinación de la mutagénesis por PCR con transcripción / traducción *in vitro* acoplada para la generación de alto rendimiento de mutantes de la proteína. Aquí, los productos de PCR se utilizan directamente como molde para la transcripción / traducción *in vitro* de los anticuerpos de cadena sencilla mutantes. Debido a la alta eficiencia con la que se pueden generar las 19 sustituciones de aminoácidos y analizar de esta manera, ahora es posible llevar a cabo mutagénesis de saturación en numerosos restos de interés, un proceso que puede describirse como mutagénesis de saturación de barrido *in vitro* (Burks y col., 1997).

30 La mutagénesis de saturación de barrido *in vitro* proporciona un procedimiento rápido para la obtención de una gran cantidad de información de estructura-función, incluyendo: (i) identificación de restos que modulan la especificidad de unión al ligando, (ii) una mejor comprensión de la unión del ligando basada en la identificación de los aminoácidos que retienen la actividad y los que suprimen la actividad en un lugar determinado, (iii) una evaluación de la plasticidad general de un sitio activo o subdominio de proteína, (iv) identificación de las sustituciones de aminoácidos que dan como resultado un aumento de la unión.

35 La mutagénesis específica de sitio guiada por estructura representa una potente herramienta para la disección y modificación genética de las interacciones proteína-ligando (Wells, 1996, Braisted y col., 1996). La técnica proporciona la preparación y el análisis de las variantes de secuencia mediante la introducción de uno o más cambios en la secuencia de nucleótidos en un ADN seleccionado.

40 La mutagénesis específica de sitio utiliza secuencias de oligonucleótidos específicas que codifican la secuencia de ADN de la mutación deseada, así como un número suficiente de nucleótidos adyacentes, sin modificar. De este modo se proporciona una secuencia de cebador con el tamaño y la complejidad suficientes para formar un dúplex estable en ambos lados de la unión de delección que se atraviesa. Se prefiere un cebador de aproximadamente 17 a 25 nucleótidos de longitud, con aproximadamente de 5 a 10 restos a ambos lados de la unión de la secuencia que está siendo alterada.

45 La técnica típicamente emplea un vector bacteriófago que existe tanto en una forma de cadena sencilla como de cadena doble. Los vectores útiles en la mutagénesis dirigida al sitio incluyen vectores tales como el fago M13. Estos vectores fagos están disponibles comercialmente y su uso es generalmente bien conocido por los expertos en la técnica. Los plásmidos de doble cadena también se usan rutinariamente en la mutagénesis dirigida al sitio, lo que elimina la etapa de transferir el gen de interés de un fago a un plásmido.

50 En general, una primera obtiene un vector de cadena simple, o fusiona dos cadenas de un vector de doble cadena, que incluye dentro de su secuencia una secuencia de ADN que codifica la proteína o elemento genético deseado. Un cebador de oligonucleótido que lleva la secuencia mutada deseada, preparado sintéticamente, se hibrida después con la preparación de ADN monocatenario, teniendo en cuenta el grado de apareamientos erróneos cuando se seleccionan las condiciones de hibridación. El producto hibridado se somete a enzimas de polimerización de ADN tales como polimerasa I de *E. coli* (fragmento de Klenow) con el fin de completar la síntesis de la cadena portadora de la mutación. Por lo tanto, se forma un heterodúplex, en el que una cadena codifica la secuencia original no mutada y la segunda cadena porta la mutación deseada. Este vector heterodúplex se utiliza después para transformar las células huésped apropiadas, tales como células de *E. coli*, y se seleccionan los clones que incluyen vectores recombinantes portadores de la disposición de la secuencia mutada.

La información completa sobre el significado funcional y el contenido de la información de un resto de proteína dado se pueden obtener mejor mediante mutagénesis de saturación en la que se examinan las 19 sustituciones de aminoácidos. El inconveniente de este enfoque es que la logística de la mutagénesis de saturación de múltiples restos es enorme (Warren y col., 1996, Brown y col., 1996; Zeng y col., 1996; Burton y Barbas, 1994; Yelton y col., 1995; Jackson y col., 1995; Short y col., 1995; Wong y col., 1996; Hilton y col., 1996). Se deben estudiar cientos, y posiblemente incluso miles, de mutantes específicos del sitio. Sin embargo, la mejora de las técnicas hace que la producción y la detección rápida de mutantes sean mucho más sencillas. Véanse también, las patentes de Estados Unidos 5.798.208 y 5.830.650, para una descripción de mutagénesis "del recorrido".

Otros procedimientos de mutagénesis dirigida al sitio se divulgan en las Patentes de Estados Unidos 5.220.007; 5.284.760; 5.354.670; 5.366.878; 5.389.514; 5.635.377; y 5.789.166.

Además de los equivalentes funcionales biológicos que se producen utilizando técnicas de mutagénesis mencionadas anteriormente, los presentes inventores también contemplan que se pueden formular compuestos de estructura similar para imitar las partes clave de la superantígeno o conjugado de la presente invención. Tales compuestos, que pueden denominarse peptidomiméticos, pueden usarse de la misma manera que los conjugados de la invención y, por lo tanto, son también equivalentes funcionales.

Ciertos miméticos que imitan a los elementos de estructura secundaria y terciaria de de proteínas se describen en Johnson y col., (1993). El fundamento subyacente al uso de miméticos peptídicos es que la estructura peptídica de las proteínas existe principalmente para orientar las cadenas laterales de aminoácidos de modo que se faciliten las interacciones moleculares, como las de los anticuerpos y/o los antígenos. Un mimético peptídico se diseña de este modo para permitir interacciones moleculares similares a la molécula natural.

Algunas aplicaciones exitosas del concepto de mimético peptídico se han centrado en miméticos de giros β dentro de proteínas, que se sabe que son altamente antigénicos. Probablemente se pueda predecir la estructura del giro β dentro de un polipéptido mediante algoritmos basados en ordenador, como se trata en el presente documento. Una vez determinados los aminoácidos componentes del giro, pueden construirse los miméticos para lograr una orientación espacial similar de los elementos esenciales de las cadenas laterales de aminoácidos.

Otros enfoques se han centrado en el uso de pequeñas proteínas que contienen varios disulfuro como atractivos moldes estructurales para la producción de conformaciones biológicamente activas que imitan los sitios de unión de proteínas grandes. Vita y col., (1998). Un motivo estructural que parece estar conservado evolutivamente en ciertas toxinas es pequeño (30-40 aminoácidos), estable y de alta permisividad para la mutación. Este motivo se compone de una lámina beta y una hélice alfa unidas en puente en el núcleo interior por tres disulfuros.

Los giros beta II se han imitado con éxito utilizando L-pentapéptidos cíclicos y aquellos con D-aminoácidos (Weisshoff y col., 1999). Asimismo, Johannesson y col., (1999) informan sobre tripéptidos bicíclicos con propiedades de inducción de giro inverso.

En la técnica se han divulgado procedimientos para generar estructuras específicas. Por ejemplo, los miméticos de alfa-hélice se divulgan en las patentes de Estados Unidos 5.446.128; 5.710.245; 5.840.833; y 5.859.184. Estas estructuras hacen que el péptido o la proteína sean más estables térmicamente y también aumentan la resistencia a la degradación proteolítica. Se divulgan seis, siete, once, doce, trece y catorce estructuras de miembros de anillo.

Se describen procedimientos para generar giros beta conformacionalmente restringidos y protuberancias beta, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos 5.440.013; 5.618.914; y 5.670.155. Los giros beta permiten sustituyentes laterales cambiados sin tener cambios en la correspondiente conformación del armazón y tienen extremos apropiados para su incorporación en péptidos por procedimientos de síntesis convencionales. Otros tipos de giros miméticos incluyen giros inversos y gamma. Los miméticos de giro inverso se divulgan en las patentes de Estados Unidos 5.475.085 y 5.929.237, y los miméticos de giro gamma se describen en las patentes de Estados Unidos 5.672.681 y 5.674.976.

G. Expresión de los superantígenos

La presente invención también implica el uso de vectores de expresión y células huésped. Estos vectores de expresión, que se han modificado genéticamente para contener la secuencia de ácido nucleico de los conjugados, se introducen o se transforman en las células huésped para producir los conjugados de la presente invención.

Las células huésped pueden modificarse genéticamente para incorporar secuencias de ácidos nucleicos y expresar péptidos de la presente invención. La introducción de secuencias de ácido nucleico en la célula huésped puede efectuarse mediante transfección mediada por fosfato cálcico, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección, microinyección, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, transducción, carga de raspaduras, introducción balística, infección u otros procedimientos. Dichos procedimientos se describen en muchos manuales de laboratorio estándar, tales como Davis y col., BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, (1986) y Sambrook, y col., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989).

Los ejemplos representativos de células huésped apropiadas incluyen células bacterianas, tales como estreptococos, estafilococos, *E. coli*, *Streptomyces* y células de *Bacillus subtilis*; células fúngicas, tales como células de levadura y células de *Aspergillus*; células de insecto tales como células de *Drosophila S2* y *Spodoptera Sf9*; células animales tales como CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, BHK, 293 y células de melanoma de Bowes.

5 II. Tratamiento del cáncer

En la presente invención, un superantígeno se conjuga con un anticuerpo o un fragmento de un anticuerpo para atacar y destruir las células cancerosas. Ejemplos de cáncer incluyen, entre otros, cáncer de pulmón, mama, colon, riñón, páncreas, ovarios, estómago, cuello uterino y próstata.

10 En un aspecto de la presente invención, la célula tumoral debe tener algún marcador que sea susceptible de atacar, es decir, no está presente en la mayoría de las otras células. Existen muchos marcadores tumorales y cualquiera de estos puede ser adecuado para la orientación en el contexto de la presente invención. Las dianas específicas de la presente invención incluyen anticuerpos. Los anticuerpos que se contemplan en la presente invención incluyen, entre otros, el fragmento Fab. Los ejemplos del fragmento Fab incluyen C215Fab o 5T4Fab. Además de Fab, otros marcadores tumorales frecuentes incluyen el antígeno carcinoembrionario, antígeno específico de próstata, antígeno asociado a un tumor urinario, antígeno fetal, tirosinasa (p97), gp68, TAG-72, HMFG, antígeno sialil de Lewis, MucA, MucB, PLAP, receptor de estrógeno, receptor de laminina, erb B y p155.

20 Se contempla que la presente invención se puede administrar a un paciente que sufre cáncer o una enfermedad proliferativa. La cantidad administrada al paciente es una cantidad terapéuticamente eficaz o una cantidad que tiene como resultado el tratamiento del cáncer o la enfermedad. La administración del conjugado puede ser a través de una vía parenteral o alimentaria. Los ejemplos de vías alimentarias incluyen, entre otras, la oral, rectal, sublingual y bucal. Los ejemplos de vías parenterales incluyen, entre otras, las vías intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intramuscular, intradérmica, intratumoral e intravascular.

III. Composiciones farmacéuticas

25 Los compuestos de la presente invención se pueden emplear solos o junto con otros compuestos, tales como compuestos terapéuticos.

30 Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones y/o dispersiones acuosas estériles, formulaciones incluyendo aceite de sésamo, aceite de cacahuete y/o propilenglicol acuoso, y/o polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones y/o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y/o debe ser fluida de modo que se pueda introducir con facilidad en las jeringuillas. Debe ser estable en las condiciones de la fabricación y/o almacenamiento y/o debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y/u hongos.

35 Las soluciones de los compuestos activos como base libre y/o sales farmacológicamente aceptables se pueden preparar en agua, mezcladas adecuadamente con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también se pueden preparar en glicerol, polietilenglicoles líquidos y/o sus mezclas y/o en aceites. En condiciones habituales de almacenamiento y/o uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

40 El conjugado de la presente invención se puede formular en una composición en una forma neutra y / o de sal. Entre las sales farmacéuticamente aceptables se incluyen las sales de adición ácida (formadas con los grupos amino libre de la proteína), y/o que se forman con ácidos inorgánicos, tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico y/o fosfórico, y/o dichos ácidos orgánicos como acético, oxálico, tartárico, mandélico y/o similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivar de bases inorgánicas, tales como, por ejemplo, los hidróxidos sódico, potásico, amónico, cálcico y/o férrico, y/o bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y/o similares. En cuanto al uso de agentes terapéuticos peptídicos como principios activos, se puede usar la tecnología de las patentes de EE.UU. 4.608.251; 4.601.903; 4.599.231; 4.599.230; 4.596.792; y / o 4.578.770.

45 El vehículo también puede ser un disolvente y/o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, un poliol (por ejemplo glicerol, propilenglicol y/o polietilenglicol líquido, y/o similares), mezclas adecuadas de los mismos, y/o aceites vegetales. Se puede mantener la fluidez apropiada, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y/o por el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos se puede conseguir mediante varios agentes antibacterianos y/o antifúngicos, por ejemplo parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y/o similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo azúcares y/o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede efectuar mediante el uso en las composiciones de agentes retardantes de la absorción, por ejemplo monoestearato de aluminio y/o gelatina.

55 Se preparan soluciones inyectables estériles mediante la incorporación de los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente adecuado con varios de los otros principios enumerados anteriormente, según se requiera, seguido por esterilización filtrada. En general, las dispersiones se preparan mediante la incorporación de los diversos principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y/o los

otros principios requeridos de los enumerados en lo que antecede. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos de preparación preferidos son las técnicas de secado al vacío y/o liofilización, que dan un polvo del principio activo más cualquier principio deseado adicional a partir de una solución del mismo previamente filtrada para esterilizar. También se contempla la preparación de soluciones más, y / o altamente, concentradas para la inyección directa, en las que se prevé el uso de DMSO como disolvente para dar como resultado una penetración extremadamente rápida, la liberación de altas concentraciones de los agentes activos en una pequeña área.

Tras la formulación, las soluciones se administrarán de un modo compatible con la formulación de dosificación y/o una cantidad tal que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en diversas formas de dosificación, tales como el tipo de soluciones inyectables descritas anteriormente, pero también se pueden usar cápsulas de liberación de fármaco y/o similares.

Para administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución se tamponará adecuadamente, en caso necesario, y/o el diluyente líquido se convierte primero en isotónico con suficiente solución salina y/o glucosa. Estas soluciones acuosas concretas son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea y/o intraperitoneal. A este respecto, los medios acuosos estériles que pueden emplearse serán conocidos por los expertos en la técnica a la luz de la presente divulgación. Por ejemplo, una dosificación puede disolverse en 1 ml de solución isotónica de NaCl y/o añadirse a 1.000 ml de fluido de hipodermoclasia y/o inyectarse en el sitio de infusión propuesto, (véase por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª Edición, páginas 1035-1038 y/o 1570-1580). Necesariamente se producirá alguna variación en la dosis en función de la afección del sujeto que se esté tratando. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis adecuada para el sujeto individual.

El conjugado y / o los agentes activos se pueden formular dentro de una mezcla terapéutica para comprender de aproximadamente 0,0001 a 1,0 miligramos, y / o de aproximadamente 0,001 a 0,1 miligramos, y / o de aproximadamente 0,1 a 1,0 y / o incluso de aproximadamente 10 miligramos por dosis y / o así sucesivamente. También pueden administrarse varias dosis.

Además de los compuestos formulados para la administración parenteral, tal como inyección intravenosa, intraarticular y/o intramuscular, otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, comprimidos y/u otros sólidos para administración oral; formulaciones liposómicas; cápsulas de liberación prolongada; y/o cualquier otra forma utilizada en la actualidad, incluyendo cremas.

También se pueden usar soluciones y / o pulverizaciones nasales, aerosoles, aerosoles y / o inhalantes en la presente invención. Las soluciones nasales son normalmente soluciones acuosas diseñadas para administrar en los conductos nasales en gotas y / o aerosoles. Las soluciones nasales se preparan de manera que sean similares en muchos aspectos a las secreciones nasales, de manera que se mantiene la acción ciliar normal. Por lo tanto, las soluciones nasales acuosas normalmente son isotónicas y / o ligeramente tamponadas para mantener un pH de 5,5 a 6,5. Además, en la formulación se pueden incluir conservantes antimicrobianos, similares a los utilizados en las preparaciones oftálmicas, y / o estabilizadores farmacológicos adecuados, si se requiere. Se conocen varias preparaciones nasales comerciales y / o pueden incluir, por ejemplo, antibióticos y / o antihistamínicos y / o se utilizan para la profilaxis del asma.

Formulaciones adicionales que son adecuadas para otros modos de administración incluyen supositorios vaginales y / o pesarios. También se puede usar un pesario y / o supositorio rectal. Los supositorios son formas de dosificación sólidas de varios pesos y / o formas, por lo general medicadas, para la inserción en el recto, la vagina y / o la uretra. Después de la inserción, los supositorios se ablandan, se funden y / o disuelven en los fluidos de la cavidad. En general, para los supositorios, aglutinantes y/o vehículos tradicionales pueden incluir, por ejemplo, polialquilenglicoles y/o triglicéridos; tales supositorios pueden estar formados por mezclas que contienen el principio activo en el intervalo de 0,5 % a 10 %, preferentemente de 1 % a 2 %.

Las formulaciones orales incluyen dichos excipientes empleados habitualmente, por ejemplo calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio y/o similares. Estas composiciones toman la forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida y/o polvos. En ciertas realizaciones definidas, las composiciones farmacéuticas orales comprenderán un diluyente inerte y / o un vehículo comestible asimilable, y / o se pueden encerrar en cápsulas de gelatina de cubierta dura y / o blanda, y / o se pueden comprimir para formar comprimidos, y / o se pueden incorporar directamente en el alimento de la dieta. Para el fin de la administración terapéutica oral, los compuestos activos pueden incorporarse con excipientes y/o usarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y/o similares. Tales composiciones y/o preparaciones deben contener al menos 0,1 % de compuesto activo. El porcentaje de las composiciones y/o preparaciones puede, por supuesto, variarse y/o puede estar, de forma conveniente, entre aproximadamente 2 a aproximadamente un 75 % del peso de la unidad y/o preferentemente entre 25-60 %. La cantidad de compuestos activos en tales composiciones terapéuticamente útiles es tal que se obtendrá una dosificación adecuada.

Los comprimidos, trociscos, píldoras, cápsulas, y/o similares pueden también contener los siguientes: se pueden añadir un aglutinante como goma de tragacanto, goma arábiga, almidón de maíz y/o gelatina; excipientes tales como fosfato dicálcico; un agente disgregante tal como almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico y/o similares; un lubricante tal como estearato de magnesio; y/o un agente aromatizante tal como menta piperita, aceite y/o aroma de gaulteria o de cereza. Cuando la forma unitaria de dosificación es una cápsula, puede contener, además de materiales del tipo anterior, un vehículo líquido. Puede haber presentes otros diversos materiales como revestimientos y/o para, de otro modo, modificar la forma física de la unidad de dosificación. Por ejemplo, los comprimidos, píldoras y/o cápsulas pueden estar recubiertos con goma shellac, azúcar y/o ambos. Un jarabe o elixir puede contener los compuestos activos, sacarosa como agente edulcorante, metilo y/o propilparabenes como conservantes, un pigmento y/o un aromatizante, tal como sabor a cereza y/o a naranja.

En ciertas realizaciones, el uso de formulaciones lipídicas y / o nanocápsulas se contempla para la introducción de un conjugado / o agentes, y / o vectores de terapia génica, incluyendo vectores tanto silvestres como antisentido, en las células huésped.

Las nanocápsulas pueden atrapar generalmente compuestos de manera estable y / o reproducible. Para evitar efectos secundarios debido a la sobrecarga polimérica intracelular, tales partículas ultrafinas (de tamaño de aproximadamente 0,1 μm) se diseñarán utilizando polímeros capaces de degradarse *in vivo*. Las nanopartículas de polialquilo-cianoacrilato biodegradables que cumplen estos requisitos se contemplan para su uso en la presente invención, y / o tales partículas se pueden hacer fácilmente.

En una realización de la invención, el conjugado puede asociarse con un lípido. Los conjugados asociados a un lípido se pueden encapsular en el interior acuoso de un liposoma, intercalarse dentro de la bicapa lipídica de un liposoma, unirse a un liposoma mediante una molécula de unión que está asociada tanto con el liposoma como con el oligonucleótido, atraparse en un liposoma, formar complejos con un liposoma, dispersarse en una solución que contiene un lípido, mezclarse con un lípido, combinarse con un lípido, estar contenido como una suspensión en un lípido, estar contenido o formar complejo con una micela, o asociarse de otra manera con un lípido. Las composiciones asociadas con lípidos o lípidos/conjugados de la presente invención no se limitan a ninguna estructura particular en solución. Por ejemplo, pueden estar presentes en una estructura bicapa, como micelas, o con una estructura colapsada. Pueden también simplemente intercalarse en una solución, posiblemente formando agregados que no son uniformes ni en tamaño ni en forma.

Los lípidos son sustancias grasas que pueden ser lípidos de origen natural o sintético. Por ejemplo, los lípidos incluyen las gotas de grasa que se producen naturalmente en el citoplasma, así como la clase de compuestos que son bien conocidos por los expertos en la técnica que contienen hidrocarburos alifáticos de cadena larga y sus derivados, tales como ácidos grasos, alcoholes, aminas, aminoalcoholes, y aldehídos.

Los fosfolípidos se pueden usar para la preparación de los liposomas según la presente invención y pueden llevar una carga neta positiva, negativa o neutra. Se puede usar fosfato de diacetilo para conferir una carga negativa a los liposomas, y se puede utilizar estearil amina para conferir una carga positiva a los liposomas. Los liposomas pueden estar hechos de uno o más fosfolípidos.

Un lípido con carga neutra puede comprender un lípido sin carga, un lípido sustancialmente no cargado, o una mezcla de lípidos con un número igual de cargas positivas y negativas. Los fosfolípidos adecuados incluyen fosfatidilcolinas y otros que son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Los lípidos adecuados para su uso según la presente invención se pueden obtener de fuentes comerciales. Por ejemplo, dimiristoilfosfatidilcolina ("DMPC") se puede obtener de Sigma Chemical Co., dicetilfosfato ("DCP") se obtiene de K & K Laboratories (Plainview, NY); colesterol ("Chol") se obtiene de Calbiochem-Behring; dimiristoilfosfatidilglicerol ("DMPG") y otros lípidos se pueden obtener de Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, Ala.). Las soluciones madre de lípidos en cloroformo o cloroformo / metanol pueden almacenarse a aproximadamente -20 °C. Preferiblemente, el cloroformo se usa como el único disolvente, ya que se evapora más fácilmente que el metanol.

Los fosfolípidos de fuentes naturales, tales como fosfatidilcolina de huevo o de soja, ácido fosfatídico de cerebro, fosfatidilinositol de cerebro o vegetal, cardiolipina de corazón y fosfatidiletanolamina bacteriana o vegetal preferiblemente no se utilizan como el fosfátido primario, es decir, constituyendo el 50 % o más de la composición total del fosfátido, debido a la inestabilidad y falta de estanqueidad de los liposomas resultantes.

Los fosfolípidos pueden formar diversas estructuras distintas de los liposomas cuando se dispersan en agua, dependiendo de la relación molar entre el lípido y el agua. A relaciones bajas, el liposoma es la estructura preferida. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, la fuerza iónica y / o la presencia de cationes divalentes. Los liposomas pueden mostrar una permeabilidad baja a sustancias iónicas y / o polares, pero a temperaturas elevadas experimentan una transición de fase que altera notablemente su permeabilidad. La transición de fase implica un cambio de una estructura ordenada estrechamente empaquetada, conocida como el estado de gel, a una estructura menos ordenada más suelta, conocida como el estado fluido. Esto se produce a una temperatura de transición de fase característica y / o tiene como resultado un aumento de la permeabilidad a iones,

azúcares y / o fármacos.

Los liposomas interactúan con las células a través de cuatro mecanismos diferentes: endocitosis mediante células fagocíticas del sistema reticuloendotelial tales como macrófagos y / o neutrófilos; adsorción a la superficie celular, ya sea mediante fuerzas hidrofóbicas y/o electrostáticas débiles e inespecíficas y / o mediante interacciones específicas con componentes de la superficie celular; fusión con la membrana plasmática celular mediante inserción de la bicapa lipídica del liposoma en la membrana plasmática, con liberación simultánea de contenidos liposomales en el citoplasma; y / o por transferencia de lípidos liposomales a las membranas celulares y / o subcelulares, y / o viceversa, sin ninguna asociación de los contenidos del liposoma. La variación de la formulación del liposoma puede alterar qué mecanismo es operativo, aunque más de uno puede operar al mismo tiempo.

5 La liberación de oligonucleótidos mediada por liposomas y la expresión de ADN extraño *in vitro* han tenido mucho éxito. Wong y col., (1980) demostraron la viabilidad de la liberación mediada por liposomas y la expresión de ADN extraño en células de embrión de pollo cultivado, HeLa y de hepatoma. Nicolau y col., (1987) consiguieron con éxito la transferencia de genes mediada por liposomas en ratas después de la inyección intravenosa.

10 En ciertas realizaciones de la invención, el lípido puede asociarse con un virus hemaglutinante (VHJ). Se ha demostrado que esto facilita la fusión con la membrana celular y estimula la entrada en la célula de ADN encapsulado en liposomas (Kaneda y col., 1989). En otras realizaciones, el lípido puede formar complejos o se puede usar junto con proteínas cromosómicas nucleares no histonas (HMG-1) (Kato y col., 1991). En otras realizaciones más, el lípido puede formar complejos o se puede usar junto con HVJ y HMG-1. Estos vectores de expresión se han empleado con éxito en la transferencia y expresión de un oligonucleótido *in vitro* e *in vivo*, por lo que son aplicables para la presente invención. Cuando se emplea un promotor bacteriano en la construcción de ADN, también será deseable incluir dentro del liposoma una polimerasa bacteriana apropiada.

15 Los liposomas utilizados según la presente invención se pueden preparar por diferentes métodos. El tamaño de los liposomas varía dependiendo del procedimiento de síntesis. Un liposoma suspendido en una solución acuosa generalmente tiene la forma de una vesícula esférica, que tiene una o más capas concéntricas de moléculas de bicapa lipídica. Cada capa consiste en una matriz paralela de moléculas representadas por la fórmula XY, en la que X es un resto hidrófilo e Y es un resto hidrófobo. En suspensión acuosa, las capas concéntricas se disponen de manera que los restos hidrófilos tienden a permanecer en contacto con una fase acuosa y las regiones hidrófobas tienden a autoasociarse. Por ejemplo, cuando las fases acuosas están presentes tanto dentro como fuera del liposoma, las moléculas lipídicas pueden formar una bicapa, conocida como lamela, de la disposición XY-YX. Se pueden formar agregados de lípidos cuando las partes hidrófilas e hidrófobas de más de una molécula de lípido se asocian entre sí. El tamaño y la forma de estos agregados dependerán de muchas variables diferentes, tales como la naturaleza del disolvente y la presencia de otros compuestos en la solución.

20 Los liposomas dentro del alcance de la presente invención se pueden preparar de acuerdo con técnicas de laboratorio conocidas. En una realización preferida, los liposomas se preparan mezclando lípidos liposomales en un disolvente en un recipiente, por ejemplo, un vaso, un matraz en forma de pera. El recipiente debe tener un volumen diez veces mayor que el volumen de la suspensión de liposomas prevista. Mediante el uso de un evaporador rotatorio se elimina el disolvente a aproximadamente 40 °C a presión negativa. El disolvente normalmente se elimina en de aproximadamente 5 minutos a 2 horas, dependiendo del volumen deseado de los liposomas. La composición se puede secar adicionalmente en un desecador al vacío. Los lípidos secos generalmente se desechan después de aproximadamente 1 semana debido a una tendencia a deteriorarse con el tiempo.

25 Los lípidos secos se pueden hidratar en fosfolípido a aproximadamente 25–50 mM en agua estéril, libre de pirógenos agitando hasta que se vuelve a suspender toda la película de lípido. Los liposomas acuosos se pueden separar después en alícuotas, cada una colocada en un vial, liofilizada y sellada al vacío.

30 En la alternativa, los liposomas pueden prepararse de acuerdo con otros procedimientos de laboratorio conocidos: el método de Bangham y col., (1965); el método de Gregoriadis, como se describe en DRUG CARRIERS IN BIOLOGY AND MEDICINE, G. Gregoriadis ed. (1979) pp. 287–341; y el procedimiento de evaporación de fase inversa como describen Szoka y Papahadjopoulos (1978). Los procedimientos mencionados anteriormente se diferencian en sus respectivas capacidades para atrapar material acuoso y sus relaciones espacio acuoso-lípido respectivas.

35 Los lípidos secos o liposomas liofilizados preparados como se ha descrito anteriormente pueden deshidratarse y reconstituirse en una solución de péptido inhibidor y diluirse hasta una concentración apropiada con un disolvente adecuado, por ejemplo, DPBS. Después, la mezcla se agita energicamente un mezclador de vórtice. El ácido nucleico encapsulado se elimina mediante centrifugación a 29.000 x g y los sedimentos de liposomas se lavan. Los liposomas lavados se resuspenden a una concentración de fosfolípidos totales adecuada, por ejemplo, aproximadamente 50 a 200 mM. La cantidad de ácido nucleico encapsulado se puede determinar de acuerdo con procedimientos estándar. Después de la determinación de la cantidad de ácido nucleico encapsulado en la preparación de liposomas, los liposomas se pueden diluir a concentraciones apropiadas y almacenarse a 4 °C hasta su uso.

Una composición farmacéutica que comprende los liposomas por lo general incluirá un vehículo o diluyente estéril farmacéuticamente aceptable, tal como agua o solución salina.

IV. Ejemplos

5 Los ejemplos siguientes se han incluido para demostrar las formas de realización preferidas de la invención. Los expertos en la técnica deben apreciar que las técnicas divulgadas en los ejemplos siguientes representan técnicas descubiertas por el inventor para funcionar bien en la práctica de la invención y, por tanto, se puede considerar que constituyen modos preferidos para su práctica.

10 En los siguientes ejemplos, se utilizan diferentes superantígenos; sin embargo, solo los conjugados que comprenden el superantígeno enterotoxina estafilocócica E (VEA) con las modificaciones establecidas en las reivindicaciones están de acuerdo con la invención, los otros superantígenos y conjugados se incluyen por motivos ilustrativos y comparativos.

Ejemplo 1

Mutagénesis *in vitro*

15 Las diferentes variantes superantígenos se hicieron usando un procedimiento basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Brevemente, los productos de PCR contenían dos sitios de enzimas de restricción únicos, uno en cada extremo. Para el procedimiento de subclonación, se usó pUC19 (GIBCO BRL Life Technologies, Middlesex, Reino Unido), preparado de acuerdo con el protocolo del kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN, Hilden, Alemania). Se incluyeron mutaciones puntuales que no afectaban a la secuencia de aminoácidos, para facilitar su posterior análisis. La reacción PCR se realizó en un sistema de PCR de Perkin Elmer Geneamp 2400 con Taq ADN polimerasa y el tampón de PCR apropiado que contenía MgCl₂ 15mM (Roche Molecular Biochemicals, Basilea, Suiza). Los productos de la PCR y los vectores se escindieron durante la noche con las enzimas de restricción apropiadas. Se purificaron usando electroforesis en gel de agarosa al 1 % (GIBCO BRL Life Technologies) que contenía 0,5 µg/ml de bromuro de etidio (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) en tampón TAE (Sigma-Aldrich). El ADN que contiene el fragmento se escindió del gel y se extrajo usando el sistema CONSERT™ Rapid Gel Extraction (GIBCO BRL Life Technologies). El vector y el inserto se ligaron (ADN ligasa de T4, Roche Molecular Biochemicals) a temperatura ambiente durante 3-4 horas. La mezcla de ligación se transformó en la cepa de *Escherichia coli* DH5 (GIBCO BRL Life Technologies) según las instrucciones adjuntas con las células. Los clones positivos se verificaron mediante secuenciación del ADN. Las secuencias correctas se escindieron con RsrII/HindIII a 37 °C durante la noche y se ligaron en el vector de expresión (Dohlsten y col., 1994). Las partes variables de los Fab se cambiaron por C215 para adaptarse a los modelos animales internos. Finalmente, la construcción se sometió a electroporación en la cepa de *Escherichia coli* UL635 K12 (xyl-7, ara-14, T4R, ΔompT).

Ejemplo 2

Identificación de regiones de unión anti-SEA humanas

35 Las regiones reconocidas por los anticuerpos anti-SEA humanos se identificaron a partir de un digerido con pepsina de SEA o una variante química de SEA y SEE, SEA / E-18, descrito anteriormente como SEE / A-A (Antonsson y col., 1997) con la sustitución D227A.

Cada superantígeno se incubó con 0,5 % de pepsina HCl 10 mM, NaCl 150 mM (p / p) durante 60 minutos a 37 °C. La mezcla de péptidos se neutralizó con Tris-HCl 2M a pH 8,0 y se aplicó en una columna de 1 ml de HiTrap (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) con anti-SEA humano inmovilizado. Se usó PBS, Na₂HPO₄ 8,1 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM a pH 7,3 como tampón de lavado y los fragmentos de unión al anticuerpo se eluyeron usando ácido acético 0,1 M a pH 3,0. Los fragmentos se identificaron tanto antes como después de la purificación usando HPLC acoplada a un espectrómetro de masas (EM) (FIG.1). La cromatografía se llevó a cabo en una columna C18 (2x250mm) (VYDAC™, Hesperia, California, EE.UU.) utilizando un gradiente lineal de 10 a 60 % de acetonitrilo en ácido trifluoroacético al 0,1 % durante 30 minutos a 40 °C. La determinación de la masa se realizó utilizando EM con electropulverización (Finnigan LCQ, Thermoquest, San Jose, California, EE.UU.). Los fragmentos encontrados en el digerido al mismo tiempo de retención tanto antes como después de la purificación por afinidad se consideraron positivos (FIG.2).

Ejemplo 3

Modelización molecular

50 El superantígeno químico SEA/E-18 se basó en la secuencia de SEE a excepción de cuatro restos de aminoácidos cerca del extremo N que eran de SEA y una sustitución en la parte del extremo C de D227A (FIG. 3 y FIG. 4) (Antonsson y col., 1997).

Brevemente, se usaron estructuras tridimensionales de superantígenos con una identidad de secuencia mucho más alta con SEE disponibles desde el PBD como moldes para construir un modelo de homología de SEAE-18, es decir SEA (1ESF, Shard et al, 1SXT, Sundstrom et al 1996 A), SED (Sundstrom y col., 1996 B) y SEH (1ENF) (Hakansson y col., 2000). SEA era más similar a SEE con una identidad de secuencia del 80 %. SED tenía una identidad de secuencia de 60 % y SEH del 50 % con SEE.

La construcción del modelo se realizó mediante el módulo HOMOLOGY en el software INSIGHTII (MSI, San Diego). Las estructuras de los tres superantígenos SEA, SED y SEH se alinearon y se determinaron las regiones estructurales conservadas (SCR) (FIG. 3). Estas regiones típicamente se asignaron a estructuras secundarias regulares en las moléculas. La secuencia bruta para SEA/E-18 se cargó y ensartó sobre las SCR de la estructura de SEA (FIG. 5). Se usaron los coordinados de 1SXT para SEA excepto por los primeros nueve restos en el extremo N, en el que se utilizó 1ESF. Las regiones entre las SCR eran, en la mayoría de los casos, zonas de bucles flexibles y se construyeron a partir de la SEA y SED. La mayor parte de los bucles se construyeron a partir de SEA a excepción de los restos Gln19, Ile140, Asp141, Lys142, Ser189, Gly191, Asp200, Pro206, Asp207 y Leu224, que se construyeron a partir de SED. Algunas áreas dentro de las SCR mostraron una mayor similitud de secuencia con SED y, por tanto, se construyeron usando SED como plantilla estructural (Ile37, Glu49, Asn50, Thr51, Leu52, Ser195 y Thr218) (FIG.3).

Debido al hecho de que la SEA se utilizó como molde estructural para la mayoría de los restos en SEA / E-18 no se produjeron problemas con cadenas laterales que se solapan. Los puntos de corte y empalme antes y después de las SCR se repararon. En primer lugar, las cadenas laterales sustituidas se relajaron y después la minimización de la energía y las simulaciones de dinámica molecular relajaron todas las cadenas laterales dentro de las SCR utilizando protocolos estándar en HOMOLOGY. Las áreas de bucle se relajaron de una en una usando las 1.000 primeras etapas de minimización de la energía, seguidas de 1.000 etapas dinámica molecular. Este protocolo refinamiento se aplicó primero a las cadenas laterales del bucle y luego a todos los átomos en el bucle. Para todas las simulaciones se usó el campo de fuerza CVFF con una constante de fuerza de 100 kcal/Å² usando un intervalo de tiempo de 2 fs.

El modelo final se analizó para detectar las regiones malas usando el módulo PROSTAT en INSIGHTII. No se detectaron regiones malas. El interior de la proteína se empaquetó bien sin diferencias significativas en comparación con SEA. Todos los restos terminaron en regiones permitidas en un gráfico de Ramachandran. La superposición de 1SXT con el modelo produjo un RMSD de 0,4 Å cuando se compararon los átomos Ca. La principal diferencia entre las dos estructuras se ve en el bucle β9-β10 (restos His187-Thr193) (FIG. 5).

Los nuevos modelos de nuevas variantes de superantígenos se construyeron utilizando el modelo SEA/E-18 como molde. Los restos de aminoácidos específicos se cambiaron directamente en el modelo. La conformación de la cadena lateral más favorable se seleccionó mediante una simple búsqueda de hidrancia estérica, seguida de una corta minimización de la energía.

Ejemplo 4

Cultivo y purificación

Las quimeras C215FabSEA/E se expresaron como proteínas de fusión en la cepa de *E. coli* K12 UL635 utilizando un plásmido con un promotor Lac UV-5 inducido por IPTG y un gen de resistencia a kanamicina.

Brevemente, las bacterias de la solución madre congelada (-70 °) en 20 % de glicerol se incubaron a 25 °C durante 22-24 horas en matraces de agitación que contienen (por litro) 2,5 g de (NH₄)₂SO₄, 3 g de KH₂PO₄, 2 g de K₂HPO₄, 0,5 g de citrato sódico, 1 g de MgSO₄·H₂O, 0,05 g de kanamicina, 12 g de glucosa monohidrato y 1 ml de solución de oligoelementos, aunque sin Na₂MOO₄·2H₂O. Las células se cultivaron hasta una Abs₆₂₀ de 2-3 y se usaron 10 ml del medio de cultivo para inocular un fermentador de 1 litro (Belach Bioteknik, Suecia) con un volumen de partida de 800 ml. El medio de fermentación contenía (por litro) 2,5 g de (NH₄)₂SO₄, 9 g de K₂HPO₄, 6 g de K₂HPO₄, 0,5 g de citrato sódico, 1 g de MgSO₄·7H₂O, 0,05 g de kanamicina, 23,1 g de glucosa monohidrato y 1 ml de solución de oligoelementos como anteriormente. El pH se mantuvo constante a 7,0 mediante titulación de 25 % de NH₃, la aireación fue de 1 l / min y la temperatura de 25 °C. Durante la fase discontinua, el O₂ disuelto se mantuvo a 30 % regulando la agitación de 400 rpm a 2000 rpm y durante la alimentación por lotes mediante la regulación de la alimentación de glucosa (60 % p/v). La formación de producto fue inducida cuando la absorbancia a 620 nm fue de 45 añadiendo Oisopropil-β-D-tiogalactopiranosido 1 mM (IPTG). Después de la fermentación, las células se eliminaron mediante centrifugación a -20 °C antes de la purificación.

El procedimiento de purificación se dividió en tres etapas. Primera se extrajo el ADN del sobrenadante del cultivo mediante 0,19 % de polietilenimina (p / v) en NaCl 0,2 M, pH 7,4, usando una bomba peristáltica con un caudal de 12 ml / min. Después de centrifugación a 7500 x g durante 30 min, se recogió el sobrenadante.

Se aplicó en una columna de Sepharose 60 ml de proteína G de flujo rápido (Amersham Pharmacia Biotech) con un caudal de 14 ml/min. La columna se lavó usando PBS y la elución se realizó con ácido acético 100 mM, 0,025 % de Tween 20, a pH 3,0. El producto eluido se recolectó y el pH se ajustó a 1,5 unidades por debajo del punto isoelectrónico teórico con NaOH 1M, se filtró (0,2µm) y se diluyó cuatro veces con 0,025 % de Tween 20. Las variantes degradadas se eliminaron usando cromatografía de intercambio iónico. La fuerza iónica de la muestra se ajustó a 2

mS/cm y la columna utilizada fue SP-Sepharose-HP, Hiload 16/10(Amersham Pharmacia Biotech). La elución se realizó con un flujo de 4,0 ml/min durante 50 minutos utilizando un gradiente lineal de 0–55 % de tampón B, NaAc 100 mM, NaCl 400mM, 0,025 % de Tween 20, pH 5,0 en tampón A, NaAc 10 mM, 0,025 % de Tween 20, a pH 5,0.

Ejemplo 5

5 Serorreactividad

La reactividad entre las variantes del superantígeno y el anti-SEA humano se midió en un ensayo de proximidad de centelleo (SPA).

10 En una placa de microtitulación (OptiPlate, Packard Instruments) se incubaron perlas de PVT recubiertas con estreptavidina, 150 µg de perlas/pocillo (Amersham Pharmacia Biotech) durante 30 minutos a temperatura ambiente con fragmentos F(ab)₂ de IgG anti-ratón conjugados con biotina, 3 µg/mg de perlas. Las perlas se preincubaron con superantígenos conjugados con C215Fab en una serie de dilución a 1:2, en la que la concentración final más alta en los pocillos fue 40 nM. Finalmente se incubaron con 1 nM de anticuerpos anti-SEA humanos purificados por afinidad conjugados con ¹²⁵I y la cantidad de □-centelleo se midió en una Top-Counter (Packard Instruments).

15 La reactividad anti-SEA humana para las variantes del superantígeno también se midió en un ensayo de inmunosorción ligado a enzimas, ELISA (Cavallin y col., 2000). Los resultados fueron similares a los obtenidos en el SPA.

Ejemplo 6

Función biológica

20 La capacidad para inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo de superantígeno, CCDAS y citotoxicidad celular dependiente de superantígeno, CCDS se comparó en un ensayo estándar de liberación de ⁵¹Cr en 4 horas.

25 En resumen, las dianas que se utilizaron para la CCDS fueron células de linfoma de células B Raji humanas y las dianas de la CCDAS fueron células de carcinoma colorrectal humano Colo205. Las células se marcaron con ⁵¹Cr y se diluyeron a una concentración de 50.000 células / ml a los pocillos de microtitulación en forma de V. Como células efectoras, se usó una línea de linfocitos T humanos reactivos a SEA en una relación entre el efector y la diana de 45:1 para la CCDAS y de 30:1 para la CCDS. Se agregaron variantes Sag en concentraciones de 10⁻⁹–10⁻¹⁶m para la CCDAS y de 10⁻⁷–10⁻¹⁴M para la CCDS. Se recogieron los sobrenadantes y la liberación de ⁵¹Cr se midió en una TopCount (Packard Instruments). El porcentaje de citotoxicidad específica se calculó como 100 x [(cpm de liberación experimental – cpm de liberación de fondo) / (cpm de liberación total - cpm de de liberación de fondo)].

Ejemplo 7

30 Identificación de epítomos de anticuerpos

35 En los pacientes, los anticuerpos preexistentes contra superantígenos han complicado su aplicación clínica, ya que requiere el ajuste de su dosis en la terapia (Alpaugh y col., 1998). Otro enfoque para limitar el impacto de los anticuerpos preformados era modificar la región del superantígeno responsable de la unión al receptor de linfocitos T (Antonsson, y col., 1997). Sin embargo, la presente invención ha mejorado aún más el potencial terapéutico de los superantígenos mediante el uso de ingeniería genética para eliminar los epítomos del anticuerpo del superantígeno.

40 Se encontró que SEE mostraba una fuerte reducción en la reactividad del anticuerpo en comparación con SEA (Antonsson y col., 1997). Desafortunadamente, con esta reducción también se produjo una notable disminución de las propiedades de destrucción del tumor cuando se fusiona a un Fab reactivo con el tumor (Antonsson y col., 1997). Por lo tanto, se investigaron las construcciones quiméricas de SEA y SEE. Al introducir los aminoácidos correspondientes de SEA en cuatro posiciones en la región de unión al TCR de SEE, se obtuvieron las propiedades deseadas. Estas sustituciones Arg20Gly, Asn21Thr, Ser24Gly y Arg27Lys (región A) en SEE, dieron como resultado la quimera SEA/E-18 (FIG. 4) (Antonsson y col., 1997). Esta quimera mostró una reducción de más de un 50 % en la reactividad de los anticuerpos, como en SEE, al tiempo que conserva el nivel eficiente de citotoxicidad, como SEA. Además, para disminuir la afinidad entre el superantígeno y el MHC de clase II, que reducen la CDS y, con ello, mejoran la ventana terapéutica, SEA / E-18 contiene también la sustitución Asp227Ala (Abrahmsén y col., 1995).

50 Para disminuir aún más la capacidad de anti-SEA humano para reconocer SEA/E-18, se determinaron los epítomos de unión al anticuerpo dentro de los superantígenos. El péptido / fragmentos de un digerido parcial con pepsina de cualquiera de SEA silvestre o SEA/E-18 se capturaron utilizando anticuerpos anti-SEA inmovilizados. Después de la purificación, las secuencias peptídicas se identificaron utilizando CL-EM (Fig. 1). De este modo las posibles áreas que participan en el reconocimiento de anticuerpos se localizaron en la secuencia de aminoácidos. Cabe destacar que la mayoría de los péptidos recuperados se encuentran alrededor de las regiones que se sabe que interactúan con el MHC de clase II (Abrahmsén y col., 1995) (FIG. 2 y FIG. 6). La estructura tridimensional de SEA (Schad y col., 1995; Sundström y col., 1996) y un modelo de ordenador de SEA/E-18 (FIG. 5), basado en la estructura cristalina de

SEA (Schad y col., 1995; Sundström y col., 1996 A), se usó para localizar los restos expuestos en la superficie dentro de los péptidos identificados. Los siguientes restos fueron identificados como candidatos expuestos y potenciales en los epítomos de unión al anticuerpo: Glu34, Lys35, Glu39, Asn40, Lys41, Glu42, Asp44, Asp45, Glu49, Lys74, Asp75, Asn78, Lys79, Lys81, Lys83, Lys84, Asp173, His187, Ser189, Glu190, Gln204, Lys217, Asn220, Glu222, Asn223, His225 y Asp227 (Tabla 1).

Estos residuos se sustituyeron posteriormente para reducir la unión a los anticuerpos. Los nuevos modelos de computación con otras variantes mejoradas de SAg se realizaron de forma continua para confirmar y comparar los resultados adquiridos con este último. Específicamente se estudió la influencia de las cadenas laterales y se identificaron los cambios que afectaban a la estabilidad de la proteína.

10 Ejemplo 8

Modificación del superantígeno para reducir la serorreactividad

Los niveles de anticuerpo de unión a los restos identificados se caracterizaron inicialmente por de dos a seis sustituciones simultáneas en SEA/E-18. De este modo se obtuvieron las variantes de SAg SEA/E-62 (Lys217Thr, Asn220Ala, Glu222Thr, Asn223Ala, His225Ala) (región E), SEA/E-63 (Ser189Asp, Glu190Ala) (región D), SEA/E-64 (Glu34Lys, Lys35Glu, Glu39Lys, Asn40Ser, Lys41Glu, Glu42Lys) (región B), SEA/E-65 (Lys79Glu, Lys81Glu, Lys83Glu, Lys84Glu) (región C), SEA/E-74 (Asp44Ala, Asp45Ala, Glu49Thr) (región B) y SEA/E-75 (Lys74Thr, Asp75Ala, Asn78Ser) (región C) (Tabla 1, FIG.4).

Para investigar si los anticuerpos anti-SEA de un grupo de IgG humana podían reconocer las diferentes variantes del SAg se desarrolló un ensayo de proximidad de centelleo (SPA). Las variantes modificadas fueron reconocidas todas en menor medida en comparación a SEA/E-18 (Tabla 1). La reducción más sustancial de la unión se debió a las sustituciones realizadas en SEA/E-65. En el análisis de SPA se observó una reducción de más de 40 % (figura 7). Sin embargo, muchas sustituciones también generaron una reducción en el nivel de producción de *E. coli* y, además, la actividad biológica también disminuyó ocasionalmente. Mediante el examen de las sustituciones se podrían identificar los restos responsables dentro de cada variante y excluir o modificarlas para lograr mejores propiedades. En general, el nivel de producción se aumentó mediante reemplazos hidrófilos en comparación con los más hidrófobos.

La reducción en la unión al anticuerpo fue sinérgica cuando se combinaron las variantes, como en SEA/E-91 compuesto por EAE / E-63, SEA / E-65 y un SEA/E-74 modificado (con Asp45 silvestre) (Tabla 1). La variante con el resultado más sobresaliente en el análisis de SPA con una reducción de la unión de casi el 70 % en comparación con SEA/E-18 fue SEA/E-110, una combinación de SEA/E-63, SEA/E-75 y SEA/E-62 modificado (SEA/E-97), SEA/E-64 (SEA/E-108), SEA/E-65 (SEA/E-84), y SEA/E-74 (wt Asp45) (FIG.7, tabla 1). Las modificaciones responsables de la mayor parte de la reducción en la unión del anticuerpo se encontraban dentro de SEA/E-109 (Glu34Ser, Glu39Ser, Asn40Ser, Lys41Glu, Glu42Lys, Asp44Ala, Glu49Thr, Lys74Thr, Asp75Ala, Asn78Ser, Lys79Glu, Lys81Glu, Lys83Ser, Lys84Ser) una combinación de SEA/E-75 y SEA/E-64 modificado (SEA/E-108), SEA/E-65 (SEA/E-84) y SEA/E-74 (wt Asp45). Esto es porque las variantes del superantígeno, que contiene dichas sustituciones, todas mostraron una buena reducción en el análisis de SPA.

Por lo tanto, los restos sustituidos en SEA/E-62, SEA/E-64, SEA/E-65 y SEA/E-74 dieron como resultado una reducción entre 20 y 40 % de la reactividad del anticuerpo, en comparación con SEA/E-18 (Tabla 1).

Tabla 1

Quimera	E34	K35	E39	N40	K41	E42	D44	D45	E49	K74	D75	N78	K79	K81	K83	K84	D173	H187	S188	S189	E190	Q204	K217	N220	E222	N223	M225	D227	Rendimiento (mg/l)	Serorreactividad (Bmax)	CCDSA	CCDS
SEA/E-21																		A	T								A	55.0	99%	0,5	1	
SEA/E-62																		A	T				T	A	T	A	A	A	1.0	77%	1	0,5
SEA/E-97																		A	T				T	S	T	S	S	S	48.0	93%	3	1
SEA/E-63																		A	T			D	A				A	14.0	95%	1	0,5	
SEA/E-64	K	E	K	S	E	K												A	T								A	23.0	68%	0,5	0,5	
SEA/E-108	S		S	S	E	K												A	T								A	30.0	68%	0,7	0,9	
SEA/E-65													E	E	E	E		A	T								A	1.5	57%	1	0,5	
SEA/E-90													E	E	E	E		A	T			R					A	2.2	52%	1	1	
SEA/E-84													E	E	S	S		A	T								A	15.0	59%	1	1	
SEA/E-68																	A	A	T								A	28.5	93%	0,5	1	
SEA/E-74						A	A	T										A	T								A	42.0	80%	1	0,5	
SEA/E-91						A		T					E	E	E	E		A	T		D	A					A	12.0	48%	1	0,1	
SEA/E-75									T	A	S							A	T								A	53.0	88%	0,1	1	
SEA/E-93			S	E	K	A	A	T					E	E	E	E		A	T	D	A						A	15.0	43%	1	ninguna	
SEA/E-107																	A	A	T	D	A	R	T	S	T	S	S	S	6.0	78%	1	0,1
SEA/E-113																	A	A	T	D	A	T	T	S	T	S	S	S	14.0	89%	3	0,5
SEA/E-109	S		S	S	E	K	A	T	T	A	S		E	E	S	S		A	T								A	24.0	49%	1	0,04	
SEA/E-110	S		S	S	E	K	A	T	T	A	S		E	E	S	S	A	A	T	D	A	T	T	S	T	S	S	S	0.5	32%	0,07	0,005
SEA/E-115	S		S	S	E	K	A	T	T	A	S		E	E	S	S	A	A	T				T	S	T	S	S	S	2.0	48%	0,5	0,01
SEA/E-118	S		S	S	E	K	A	T	T	A	S		E	E	S	S	A	S	T				T	S	T	S	S	S	2.0	46%	0,5	0,005
SEA/E-119	S		S	S	E	K	A	T	T	A	S		E	E	S	S	A	T					T	S	T	S	S	S	10.0	52%	1	0,05
SEA/E-120	S		S	S	E	K	A	T	T	A	S		E	E	S	S							T	S	T	S	S	S	30.0	38%	3	0,04
SEA/E-121	S		S	S	E	K	A	T	T	A	S		E	E	S	S	A						T	S	T	S	S	S	7.0	44%	1	0,04
SEA/E-122	S		S	S	E	K	A	T	T	A	S		E	E	S	S		S					T	S	T	S	S	S	12.0	48%	1	0,006

La actividad biológica se ha establecido en 1 para C215Fab/SEA/E-18 tanto en la CDAS como en la CCDS. El valor para evaluar la serorreactividad, es decir Bmax, se expresa en porcentajes de C215Fab/SEA/E-18. los valores en tipo extra negrita se basan en los experimentos realizados con un lote de anticuerpos diferente al de los otros.

Ejemplo 9

Sustituciones que afectan a los niveles de producción

5 Como se ha indicado anteriormente, algunas de las sustituciones en la superficie del superantígeno dieron lugar a niveles disminuidos de producción en *E. coli*. Muchas combinaciones de tales sustituciones ni siquiera se podían producir. Por lo tanto, se decidió investigar modificaciones alternativas de aquellos residuos que aparentemente causaban una reducción en el rendimiento. Las sustituciones que afectaban al rendimiento sin disminuir la unión a los anticuerpos no se investigaron más. En lugar de ello se utilizaron restos silvestres.

10 En el primer conjunto de variantes de superantígenos, el resto Lys 35 en SEA/E-64 estaba afectando al nivel de expresión de forma negativa. Cuando se utiliza el resto silvestre en la posición 35 junto con las sustituciones de serina de Glu34 y Glu 39, que dio lugar a la variante del SAg SEA/E-108, hubo un aumento en el rendimiento de 23 mg / l a 30 mg / l. Sin embargo, la reducción de la reactividad de los anticuerpos se mantuvo. Al introducir las sustituciones de ácido glutámico de los restos Lys79, Lys81, Lys 83 y Lys 84 en SEA/E-65, se produjo un nivel de producción de únicamente 1,5 mg/l. Debido al hecho de que el efecto en la reactividad del anticuerpo había disminuido en un 43 % en comparación con SEA/E-18, se hizo un esfuerzo para identificar mejores sustituciones. La mejor combinación, con respecto tanto al rendimiento como la reactividad del anticuerpo reducida, se encontró que era SEA / E-84 con restos de serina en la posición 83 y 84 y el ácido glutámico conservado en las posiciones 79 y 81 (Tabla 1). El nivel de producción se incrementó diez veces y la reactividad de los anticuerpos se redujo un 41 % con respecto al SEA/E-18 (Tabla 1). El nivel de producción se incrementó diez veces y la reactividad de los anticuerpos se redujo un 41 % con respecto al SEA/E-18 (Tabla 1). El nivel de producción también disminuyó más de diez veces con las sustituciones Lys217Thr, Asn220Ala, Glu222Thr, Asn223Ala, His225Ala y Asp227Ala en SEA/E-62, a 1,0mg/l. No obstante, al reemplazar las sustituciones de alanina por restos de serina, que dan lugar a SEA/E-97, se obtuvieron rendimientos de la producción de 48 mg/ml (Tabla 1).

25 Es interesante que al combinar SEA/E-65 con más variantes, tales como SEA/E-63 y SEA/E-74 modificado, como en SEA/E-91, el bajo nivel de producción se invirtió a 12 mg/l (Tabla 1). Por otra parte sólo había un nivel de expresión de la variante del superantígeno SEA / E-110 de 0,5 mg / l y 14 mg / l, respectivamente No obstante, el nivel de producción de SEA/E-110 aumentó a 30 mg/l al retirar las sustituciones Asp174Ala, His87Ala, Ser188Thr, Ser189Asp, Glu190Ala y Gln204TAhr creando SEA(E-120 (Tabla 1).

30 La introducción de un gran número de sustituciones dentro del superantígeno puede conducir a problemas con la expresión en *E. coli*. Existen al menos tres mecanismos diferentes para esto; disminución de la termodinámica, destrucción de la vía de plegamiento natural o sitios proteolíticos de reciente introducción. Aunque el objetivo de este estudio era eliminar los epítopos antigénicos en la superficie, que muy probablemente no interferirían con ningún armazón estructural principal, siempre había una posibilidad de que las nuevas estructuras dependieran de otros restos distintos a la construcción silvestre, para el mantenimiento de su estabilidad. Por lo tanto, constantemente se realizaban nuevos modelos de ordenador para predecir o confirmar la ubicación de los restos sustituidos en la nueva estructura. De esta manera se pudieron identificar los restos responsables dentro de las variantes tempranas del

superantígeno que causan problemas, por ejemplo con los niveles de expresión y logran las variantes mejoradas ya sea con los restos silvestres o sustituciones mejores (Tabla1).

En conclusión, para lograr un mejor nivel de producción, los siguientes restos Lys83, Lys84, Asn220, Asn223, His225 y Asp227 serán reemplazados a serina, no a alanina. Además, para evitar una reducción en los niveles de expresión, los restos Lys35, Asp173, His187, Ser188, Ser189, Glu190 y Gln204 deben conservarse.

Ejemplo 10

Evaluación de la función biológica dentro de las diferentes variantes de Sac

Debido a que los superantígenos fueron diseñados principalmente para la terapia de tumores (Dohlsten y col., 1994), era importante evitar las sustituciones que disminuyen la citotoxicidad dirigida a tumores dentro de las nuevas variantes de superantígenos. Por consiguiente, la capacidad para mediar en la citotoxicidad dirigida al tumor se midió para todas las nuevas variantes de superantígeno en un ensayo de CCDAS (Fig. 3). Además, la eficiencia de los superantígenos para mediar EN la destrucción de los linfocitos T de las células que expresan MHC de clase II da como resultado citotoxicidad sistémica que podría causar efectos secundarios medidos en un ensayo de CCDS (FIG. 3). Para uso clínico, la CCDS debería ser, muy probablemente, baja para aumentar la ventana terapéutica.

La mayor parte del conjunto inicial de variantes de SAg tenían el mismo nivel de potencia citotóxica específica de tumor que SEA / E-18 (Tabla 1). Las excepciones fueron SEA/E-75 con los reemplazos Lys74Thr, Asp75Ala y Asn78Ser que disminuyó diez veces y SEA/E-64, con los reemplazos Glu34Lys, Lys35Glu, Glu39Lys, Asn40Ser, Lys41Glu y Glu42Lys, que disminuyó cinco veces en comparación con SEA/ E-18 (Tabla1). Curiosamente, la disminución de la actividad en SEA/E-75 solo se observó en esta variante, en combinación con otras sustituciones por ejemplo en SEA/E-109 se detectó actividad completa (tabla 1). Además, la actividad se CCDS se mantuvo sin cambios en SEA/E-75 en comparación con SEA/E-18. Por tanto, era probable que las sustituciones Lys74Thr, Asp75Ala y Asn78Ser perturbaran las interacciones importantes para la citotoxicidad dependiente de anticuerpos por sí sola.

La mayoría de las variantes del superantígeno descritas en el presente documento sí mostraron una clara reducción en la CCDS. Se observó una ligera disminución en la actividad de CCDS para las variantes iniciales SEA/E-62, SEA/E-63, SEA/E-64, SEA/E-65 y SEA/E-74 en comparación con SEA/E-18.

Todas las variantes del superantígeno contenían el resto sustituido Asp227Ala o Ser. Se sabía que esta sustitución reducía la afinidad por el MHC de clase III 100 veces y, de este modo, la actividad de CCDS (Abrahmsén y col., 1995). Sin embargo, dado que la variante del Sag SEA/E-109, con las sustituciones en el extremo N, mostró una mayor disminución en comparación con SEA/E-18 que SEA/E-113, con las sustituciones en el extremo C, esto indicó que dentro de SEA/E-109 se han cambiado restos adicionales que son importantes para la CCDS y, muy probablemente, que se unen al MHC de clase II (FIG.8).

Por lo tanto, los restos que causaron la mayor reducción fueron Lys79Ser y Lys81Ser en SEA/E-83 y la sustitución Asp45Ala en SEA/E-74. La mayoría de estas sustituciones se encuentran alrededor de los residuos que previamente se ha demostrado que interactúan con el MHC de clase II (Abrahmsén y col., 1995).

Ejemplo 11

Diseño de una nueva variante del superantígeno

Para el diseño de la variante óptima del superantígeno, se combinaron todas las sustituciones favorables que conducían a un SEA/E-120 superior (figura 4 y figura 9).

En primer lugar, todas las modificaciones favorables en el extremo C, es decir los restos Asp173Ala, Ser189Thr, Glu190Ala, Lys217Thr, Asn220Ser, Glu222Thr, Asn223Ser, His225Ser y Asp227Ser junto con Gln204Thr se montaron formando una variante del SAg SEA/E-113. Esta variante exhibió la reducción prevista de la reactividad anti-SEA y niveles aceptables de expresión pero con una actividad biológica algo disminuida (Tabla 1, FIG. 7 y FIG. 8A y FIG. 8B). Todas las sustituciones favorables en el extremo N, es decir los restos Glu34Ser, Glu39Ser, Asn40Ser, Lys41Glu, Glu42Lys, Asp44Ala, Glu49T, Lys74T, Asn78Ser, Lys79Glu, Lys81Glu, Lys83Ser y Lys84Ser se montaron en SEA/E-109. Una disminución considerable en la reactividad anti-SEA se observó para esta variante del superantígeno, junto con un nivel elevado de expresión e incluso un perfil biológico mejorado (Tabla 1, FIG. 7 y FIG. 8A y FIG. 8B). Sin embargo, al crear la combinación de estas dos variantes SEA/E-113 y SEA/E-109 en SEA/E-110 hubo una pérdida importante de tanto el rendimiento como de la función biológica (Tabla 1). La potencia biológica se recuperó totalmente cuando los restos silvestres Ser189, Glu190 y Gln204 se utilizaron de nuevo en SEA/E-115 (Tabla 1), pero los niveles de producción todavía estaban a un nivel bajo. La modelización molecular de esta variante sugirió que los restos Asp173, His187 y Ser188, podrían ser importantes para la estabilización del plegamiento y, posteriormente, dio lugar a rendimientos más altos.

Se realizaron varias combinaciones diferentes para evaluar estos restos, lo que dio como resultado SEA/E-118, SEA/E-119, SEA/E-120, SEA/E-121 y SEA/E-122 (Tabla1). La mejor producción se obtuvo con SEA/E-120 con los

restos silvestres en las tres posiciones. Junto con las SEA/E-21, SEA/E-74, SEA/E-97, SEA/E-108 y SEA/E-109 realizadas anteriormente, estas fueron las únicas variantes de SAg que alcanzaron niveles de expresión de más de 20 mg/l (Tabla 1). No se observaron diferencias significativas en relación de la actividad biológica o la reactividad de los anticuerpos entre las variantes.

5 Diseño de un conjugado nuevo

SEA/E-120 se fusionó genéticamente a la porción Fab del anticuerpo reactivo al tumor que es 5T4 (Dohlsten y col., 1994) (FIG. 10).

El antígeno de 5T4 se expresa en una variedad de diferentes tumores, como el cáncer no microcítico de pulmón, cáncer de mama, cáncer de células renales, cáncer de páncreas, cáncer de ovarios y cáncer de colon. También se hicieron sustituciones en la secuencia silvestre de 5T4 de lograr rendimientos más altos. En la cadena pesada; His41Pro, Ser44Gly, Ile69Thr y Val113Gly y en la cadena ligera; Phe10Ser, Thr45Lys, Ile63Ser, Phe73Leu, Thr77Ser, Leu78Val y Leu83Ala.

Además, el alcance de la presente solicitud no pretende limitarse a las realizaciones particulares del proceso, la máquina, la fabricación, la composición de materia, los medios, los procedimientos y las etapas descritos en la especificación. Como un experto en la técnica apreciará fácilmente a partir de la divulgación de la presente invención, los procesos, máquinas, fabricación, composiciones de materia, medios, procedimientos o etapas existentes actualmente o que se vayan a desarrollar más adelante, que realizan sustancialmente la misma función o logran sustancialmente el mismo resultado que las realizaciones correspondientes descritas en el presente documento se pueden usar de acuerdo con la presente invención. En consecuencia, se pretende que las reivindicaciones adjuntas incluyan dentro de su alcance tales procesos, máquinas, fabricación, composiciones de materia, medios, procedimientos o etapas.

Un experto en la técnica aprecia fácilmente que la presente invención está bien adaptada para llevar a cabo los objetivos y obtener los finales y ventajas mencionados, así como los inherentes al presente documento. Las composiciones, métodos, procedimientos y técnicas descritos en el presente documento son actualmente representativos de las realizaciones preferidas y pretenden servir de ejemplo y no se pretenden como limitaciones del alcance.

Referencias citadas

Todas las patentes y publicaciones mencionadas en esta memoria son indicativas del nivel de experiencia de los expertos en la técnica a la que pertenece la presente invención.

30 Patente de Estados Unidos 4.554.101
 Patente de Estados Unidos 5.221.605
 Patente de Estados Unidos 5.238.808
 Patente de Estados Unidos 5.798.208
 Patente de Estados Unidos 5.830.650
 35 Patente de Estados Unidos 5.220.007
 Patente de Estados Unidos 5.284.760
 Patente de Estados Unidos 5.354.670
 Patente de Estados Unidos 5.366.878
 Patente de Estados Unidos 5.389.514
 40 Patente de Estados Unidos 5.635.377
 Patente de Estados Unidos 5.789.166
 Patente de Estados Unidos 5.446.128
 Patente de Estados Unidos 5.710.245
 Patente de Estados Unidos 5.840.833
 45 Patente de Estados Unidos 5.859.184
 Patente de Estados Unidos 5.440.013
 Patente de Estados Unidos 5.618.914
 Patente de Estados Unidos 5.670.155
 Patente de Estados Unidos 5.475.085
 50 Patente de Estados Unidos 5.929.237
 Patente de Estados Unidos 5.672.681
 Patente de Estados Unidos 5.674.976
 Patente de Estados Unidos 4.608.251
 Patente de Estados Unidos 4.601.903
 55 Patente de Estados Unidos 4.599.231
 Patente de Estados Unidos 4.599.230
 Patente de Estados Unidos 4.596.792
 Patente de Estados Unidos 4.578.770
 Abrahmsén L., y col., EMBO J. 14:2978-86, 1995.

- Alpaugh R. K., y col., Clin Cancer Res. 4:1903–14, 1998.
 Antonsson P., y col., J Immunol 158:4245–51, 1997.
 Bangham y col., J. Mol. Biol., 13:238–252, 1965.
 Bird y col., Science. 242:423–6. 1988.
 5 Braisted et al, Proc Natl Acad Sci U S A. 93(12):5688–92, 1996.
 Burks y col., Proc Natl Acad Sci U S A. 94(2):412–7, 1997.
 Capaldi y col., Biochem. Biophys. Res. Comm., 76:425, 1977.
 Cavallin A., y col., J Biol Chem. 275:1665–72, 2000.
 Cunningham y col., Science. 244(4908):1081–5, 1989.
 10 Davis y col., Basic Methods in Molecular Biology, 1986
 Dohlstien M., y col., Proc Natl Acad Sci U.S.A. 91:8945–9, 1994.
 DRUG CARRIERS IN BIOLOGY AND MEDICINE, G. Gregoriadis ed. (1979) pp. 287–341.
 Hakansson, M. y col., J Mol Biol. 302:527–37, 2000.
 Harlow, y col., Antibodies: A Laboratory Manual, 1988.
 15 Johannesson y col., J. Med. Chem. 42:601–608, 1999.
 Kaneda y col., J Biol Chem., 264(21):12126–12129, 1989.
 Kato y col., J Biol Chem., 266(6):3361–3364, 1991.
 Nicolau y col., Methods Enzymol., 149:157–176, 1987.
 Papageorgiou A. C. y col., Trends in Microbiology 8: 369–375, 2000.
 20 Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Edition, Capítulo 61, páginas 1035–1038 y 1570–1580.
 Sambrook et. al., In: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d Ed., 1989.
 Schad E. M., y col., EMBO J. 14:3292–3301, 1995.
 Short y col., J Biol Chem. 270(48):28541–50, 1995.
 Sundstrom M, y col., EMBO J. 15:6832–40, 1996 A.
 25 Sundstrom M., y col., J Biol Chem 271:32212–16, 1996 B.
 Szoka y Papahadjopoulos, Proc. Natl. Acad. Sci., 75:4194–4198, 1978.
 Vita y col., Biopolymers 47:93–100, 1998.
 Warren y col., Biochemistry 35(27):8855–62, 1996.
 Weisshoff y col., Eur. J. Biochem. 259:776–788, 1999.
 30 Wells y col., Methods. 10(1):126–34, 1996.
 Wong y col., Gene, 10:87–94, 1980.
 Yelton y col., J Immunol. 155(4):1994–2004, 1995.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> FORSBERG, GORAN ERLANDSSON, EVA ANTONSSON, PER WALE, BJORN
 35 <120> UN NUEVO SUPERANTÍGENO MODIFICADO GENÉTICAMENTE PARA TERAPIA HUMANA
 <130> P02188US0;10104199
 40 <140> TBA
 <141> 20-06-2001
 <160> 7
 45 <170> PatentIn versión 3.0
 <210> 1
 <211> 672
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(672)
 55 <223> Proteína conjugada
 <400> 1

ES 2 564 041 T3

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Arg Ile Asn Pro Asn Asn Gly Val Thr Leu Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr

ES 2 564 041 T3

65					70					75					80
Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Ser	Thr	Met	Ile	Thr	Asn	Tyr	Val	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
			100					105					110		
Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Ser	Val
			115					120				125			
Tyr	Pro	Leu	Ala	Pro	Gly	Ser	Ala	Ala	Gln	Thr	Asn	Ser	Met	Val	Thr
								135				140			
Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Thr
145					150					155					160
Trp	Asn	Ser	Gly	Ser	Leu	Ser	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val
				165					170					175	
Leu	Gln	Ser	Asp	Leu	Tyr	Thr	Leu	Ser	Ser	Ser	Val	Thr	Val	Pro	Ser
			180						185				190		
Ser	Thr	Trp	Pro	Ser	Glu	Thr	Val	Thr	Cys	Asn	Val	Ala	His	Pro	Ala
			195				200					205			
Ser	Ser	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Ile	Val	Pro	Arg	Asp	Ser	Gly	Gly
			210			215					220				
Pro	Ser	Glu	Lys	Ser	Glu	Glu	Ile	Asn	Glu	Lys	Asp	Leu	Arg	Lys	Lys
225					230					235					240
Ser	Glu	Leu	Gln	Gly	Thr	Ala	Leu	Gly	Asn	Leu	Lys	Gln	Ile	Tyr	Tyr
				245					250					255	
Tyr	Asn	Ser	Lys	Ala	Ile	Thr	Ser	Ser	Glu	Lys	Ser	Ala	Asp	Gln	Phe
			260					265					270		
Leu	Thr	Asn	Thr	Leu	Leu	Phe	Lys	Gly	Phe	Phe	Thr	Gly	His	Pro	Trp
			275				280					285			
Tyr	Asn	Asp	Leu	Leu	Val	Asp	Leu	Gly	Ser	Thr	Ala	Ala	Thr	Ser	Glu
			290			295					300				
Tyr	Glu	Gly	Ser	Ser	Val	Asp	Leu	Tyr	Gly	Ala	Tyr	Tyr	Gly	Tyr	Gln
305					310					315					320
Cys	Ala	Gly	Gly	Thr	Pro	Asn	Lys	Thr	Ala	Cys	Met	Tyr	Gly	Gly	Val
				325					330					335	
Thr	Leu	His	Asp	Asn	Asn	Arg	Leu	Thr	Glu	Glu	Lys	Lys	Val	Pro	Ile
			340					345					350		
Asn	Leu	Trp	Ile	Asp	Gly	Lys	Gln	Thr	Thr	Val	Pro	Ile	Asp	Lys	Val
			355				360					365			
Lys	Thr	Ser	Lys	Lys	Glu	Val	Thr	Val	Gln	Glu	Leu	Asp	Leu	Gln	Ala
			370			375					380				
Arg	His	Tyr	Leu	His	Gly	Lys	Phe	Gly	Leu	Tyr	Asn	Ser	Asp	Ser	Phe
385					390					395					400
Gly	Gly	Lys	Val	Gln	Arg	Gly	Leu	Ile	Val	Phe	His	Ser	Ser	Glu	Gly

ES 2 564 041 T3

				405						410					415
Ser	Thr	Val	Ser	Tyr	Asp	Leu	Phe	Asp	Ala	Gln	Gly	Gln	Tyr	Pro	Asp
			420					425					430		
Thr	Leu	Leu	Arg	Ile	Tyr	Arg	Asp	Asn	Thr	Thr	Ile	Ser	Ser	Thr	Ser
		435					440					445			
Leu	Ser	Ile	Ser	Leu	Tyr	Leu	Tyr	Thr	Thr	Ser	Ile	Val	Met	Thr	Gln
	450					455					460				
Thr	Pro	Thr	Ser	Leu	Leu	Val	Ser	Ala	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr
465					470					475					480
Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Asn	Asp	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln
				485					490					495	
Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Ser	Tyr	Thr	Ser	Ser	Arg
			500					505					510		
Tyr	Ala	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Tyr	Gly	Thr	Asp
		515					520					525			
Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Val	Gln	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Val	Tyr
	530					535					540				
Phe	Cys	Gln	Gln	Asp	Tyr	Asn	Ser	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr
545					550					555					560
Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Ala	Asp	Ala	Ala	Pro	Thr	Val	Ser	Ile	Phe
				565				570						575	
Pro	Pro	Ser	Ser	Glu	Gln	Leu	Thr	Ser	Gly	Gly	Ala	Ser	Val	Val	Cys
			580					585					590		
Phe	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Lys	Asp	Ile	Asn	Val	Lys	Trp	Lys	Ile
		595					600					605			
Asp	Gly	Ser	Glu	Arg	Gln	Asn	Gly	Val	Leu	Asn	Ser	Trp	Thr	Asp	Gln
	610					615					620				
Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Met	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Thr
625					630					635					640
Lys	Asp	Glu	Tyr	Glu	Arg	His	Asn	Ser	Tyr	Thr	Cys	Glu	Ala	Thr	His
				645					650					655	
Lys	Thr	Ser	Thr	Ser	Pro	Ile	Val	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Asn	Glu	Ser
			660					665					670		

<210> 2
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <221> Péptido
 <222> (1)..(233)
 <223> Proteína quimérica

10

<400> 2

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

<210> 3
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <221> péptido
 <222> (1)..(233)
 <223> Proteína quimérica

10

<400> 3

ES 2 564 041 T3

Ser Glu Lys Ser Glu Glu Ile Asn Glu Lys Asp Leu Arg Lys Lys Ser
 1 5 10 15

Glu Leu Gln Gly Thr Ala Leu Gly Asn Leu Lys Gln Ile Tyr Tyr Tyr
 20 25 30

Asn Glu Lys Ala Ile Thr Glu Asn Lys Glu Ser Asp Asp Gln Phe Leu
 35 40 45

Glu Asn Thr Leu Leu Phe Lys Gly Phe Phe Thr Gly His Pro Trp Tyr
 50 55 60

Asn Asp Leu Leu Val Asp Leu Gly Ser Lys Asp Ala Thr Asn Lys Tyr
 65 70 75 80

Lys Gly Lys Lys Val Asp Leu Tyr Gly Ala Tyr Tyr Gly Tyr Gln Cys
 85 90 95

Ala Gly Gly Thr Pro Asn Lys Thr Ala Cys Met Tyr Gly Gly Val Thr
 100 105 110

Leu His Asp Asn Asn Arg Leu Thr Glu Glu Lys Lys Val Pro Ile Asn
 115 120 125

Leu Trp Ile Asp Gly Lys Gln Thr Thr Val Pro Ile Asp Lys Val Lys
 130 135 140

Thr Ser Lys Lys Glu Val Thr Val Gln Glu Leu Asp Leu Gln Ala Arg
 145 150 155 160

His Tyr Leu His Gly Lys Phe Gly Leu Tyr Asn Ser Asp Ser Phe Gly
 165 170 175

Gly Lys Val Gln Arg Gly Leu Ile Val Phe His Ser Ser Glu Gly Ser
 180 185 190

Thr Val Ser Tyr Asp Leu Phe Asp Ala Gln Gly Gln Tyr Pro Asp Thr
 195 200 205

Leu Leu Arg Ile Tyr Arg Asp Asn Lys Thr Ile Asn Ser Glu Asn Leu
 210 215 220

His Ile Ala Leu Tyr Leu Tyr Thr Thr
 225 230

<210> 4
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus* sp.

<400> 4

5

ES 2 564 041 T3

Ser Glu Lys Ser Glu Glu Ile Asn Glu Lys Asp Leu Arg Lys Lys Ser
 1 5 10 15

Glu Leu Gln Gly Thr Ala Leu Gly Asn Leu Lys Gln Ile Tyr Tyr Tyr
 20 25 30

Asn Glu Lys Ala Lys Thr Glu Asn Lys Glu Ser His Asp Gln Phe Leu
 35 40 45

Gln His Thr Ile Leu Phe Lys Gly Phe Phe Thr Asp His Ser Trp Tyr
 50 55 60

Asn Asp Leu Leu Val Asp Phe Asp Ser Lys Asp Ile Val Asp Lys Tyr
 65 70 75 80

Lys Gly Lys Lys Val Asp Leu Tyr Gly Ala Tyr Tyr Gly Tyr Gln Cys
 85 90 95

Ala Gly Gly Thr Pro Asn Lys Thr Ala Cys Met Tyr Gly Gly Val Thr
 100 105 110

Leu His Asp Asn Asn Arg Leu Thr Glu Glu Lys Lys Val Pro Ile Asn
 115 120 125

Leu Trp Leu Asp Gly Lys Gln Asn Thr Val Pro Leu Glu Thr Val Lys
 130 135 140

Thr Asn Lys Lys Asn Val Thr Val Gln Glu Leu Asp Leu Gln Ala Arg
 145 150 155 160

Arg Tyr Leu Gln Glu Lys Tyr Asn Leu Tyr Asn Ser Asp Val Phe Asp
 165 170 175

Gly Lys Val Gln Arg Gly Leu Ile Val Phe His Thr Ser Thr Glu Pro
 180 185 190

Ser Val Asn Tyr Asp Leu Phe Gly Ala Gln Gly Gln Tyr Ser Asn Thr
 195 200 205

Leu Leu Arg Ile Tyr Arg Asp Asn Lys Thr Ile Asn Ser Glu Asn Met
 210 215 220

His Ile Asp Ile Tyr Leu Tyr Thr Ser
 225 230

<210> 5
 <211> 203
 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus* sp.

5

<400> 5

ES 2 564 041 T3

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

<210> 6
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus* sp.

<400> 6

Glu Asp Leu His Asp Lys Ser Glu Leu Thr Asp Leu Ala Leu Ala Asn
 1 5 10 15
 Ala Tyr Gly Gln Tyr Asn His Pro Phe Ile Lys Glu Asn Ile Lys Ser
 20 25 30
 Asp Glu Ile Ser Gly Glu Lys Asp Leu Ile Phe Arg Asn Gln Gly Asp
 35 40 45
 Ser Gly Asn Asp Leu Arg Val Lys Phe Ala Thr Ala Asp Leu Ala Gln
 50 55 60

5

10

ES 2 564 041 T3

Lys Phe Lys Asn Lys Asn Val Asp Ile Tyr Gly Ala Ser Phe Tyr Tyr
 65 70 75 80
 Lys Cys Glu Lys Ile Ser Glu Asn Ile Ser Glu Cys Leu Tyr Gly Gly
 85 90 95
 Thr Thr Leu Asn Ser Glu Lys Leu Ala Gln Glu Arg Val Ile Gly Ala
 100 105 110
 Asn Val Trp Val Asp Gly Ile Gln Lys Glu Thr Glu Leu Ile Arg Thr
 115 120 125
 Asn Lys Lys Asn Val Thr Leu Gln Glu Leu Asp Ile Lys Ile Arg Lys
 130 135 140
 Ile Leu Ser Asp Lys Tyr Lys Ile Tyr Tyr Lys Asp Ser Glu Ile Ser
 145 150 155 160
 Lys Gly Leu Ile Glu Phe Asp Met Lys Thr Pro Arg Asp Tyr Ser Phe
 165 170 175
 Asp Ile Tyr Asp Leu Lys Gly Glu Asn Asp Tyr Glu Ile Asp Lys Ile
 180 185 190
 Tyr Glu Asp Asn Lys Thr Leu Lys Ser Asp Asp Ile Ser His Ile Asp
 195 200 205
 Val Asn Leu Tyr Thr Lys Lys Lys Val
 210 215

<210> 7
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus* sp.

<400> 7

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

5

10

ES 2 564 041 T3

			100						105					110		
Leu	His	Asp	Asn	Asn	Arg	Leu	Thr	Glu	Glu	Lys	Lys	Val	Pro	Ile	Asn	
		115					120					125				
Leu	Trp	Ile	Asp	Gly	Lys	Gln	Thr	Thr	Val	Pro	Ile	Asp	Lys	Val	Lys	
	130					135					140					
Thr	Ser	Lys	Lys	Glu	Val	Thr	Val	Gln	Glu	Leu	Asp	Leu	Gln	Ala	Arg	
145					150					155					160	
His	Tyr	Leu	His	Gly	Lys	Phe	Gly	Leu	Tyr	Asn	Ser	Asp	Ser	Phe	Gly	
				165					170					175		
Gly	Lys	Val	Gln	Arg	Gly	Leu	Ile	Val	Phe	His	Ser	Ser	Glu	Gly	Ser	
			180					185					190			
Thr	Val	Ser	Tyr	Asp	Leu	Phe	Asp	Ala	Gln	Gly	Gln	Tyr	Pro	Asp	Thr	
		195					200					205				
Leu	Leu	Arg	Ile	Tyr	Arg	Asp	Asn	Lys	Thr	Ile	Asn	Ser	Glu	Asn	Leu	
	210					215					220					
His	Ile	Asp	Leu	Tyr	Leu	Tyr	Thr	Thr								
225					230											

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado que comprende un superantígeno bacteriano y un resto de anticuerpo, en el que el superantígeno es la enterotoxina E estafilocócica (SEE), en el que la secuencia de aminoácidos del superantígeno comprende las regiones A a E, en el que la región A está dentro del sitio de unión al TCR y determina la unión al TCR, y las regiones B a E determinan la unión a las moléculas de MHC de clase II, en el que se han introducido los siguientes reemplazos de restos de aminoácidos dentro de la región C: K79E, K81E, K83S, K84S, y en el que se han introducido los siguientes reemplazos de restos de aminoácidos dentro de la región A: R20G, N21T, S24G, R27K, y en la que opcionalmente también los aminoácidos en la posición 173 y/o la posición 204 dentro de la región A se ha/han sustituido, y en el que se ha introducido la sustitución D227S(o A) dentro de la región E, y en el que se han sustituido uno o más de los restos de aminoácidos en las posiciones 34, 35, 39, 40, 41, 42, 44, 45 y 49 dentro de la región B y/o en las posiciones 74, 75, 78 dentro de la región C y/o las posiciones 187, 188, 189, 190 dentro de la región D y/o en la posición y/o en las posiciones 217, 220, 222, 223, 225 dentro de la región E, de forma que el superantígeno sustituido tiene una serorreactividad reducida en comparación con la del superantígeno del cual deriva, y en el que el resto de anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa o cualquier otro fragmento activo de anticuerpo de unión a antígeno, que está dirigido contra una estructura de superficie celular asociada a cáncer.
2. Un conjugado de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el superantígeno tiene la secuencia de aminoácidos representada en la SEC ID N° 2 (*SEA/E-120*).
3. Un conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el resto de anticuerpo es un fragmento Fab.
4. Un conjugado de acuerdo con la reivindicación 3, en la que el resto de anticuerpo es C215Fab.
5. Un conjugado de acuerdo con la reivindicación 3, en la que el resto de anticuerpo es 5T4Fab.
6. Un conjugado de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene la secuencia de aminoácidos representada en la SEC ID N° 1.
7. Un conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para su uso en el tratamiento del cáncer.
8. Un conjugado de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmón, de mama, de colon, de riñón, de páncreas, de ovarios, de estómago, de cuello uterino y de próstata.
9. Uso de un conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.
10. Uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el medicamento es para administración intravenosa.
11. Una composición farmacéutica que comprende, como principio activo, una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

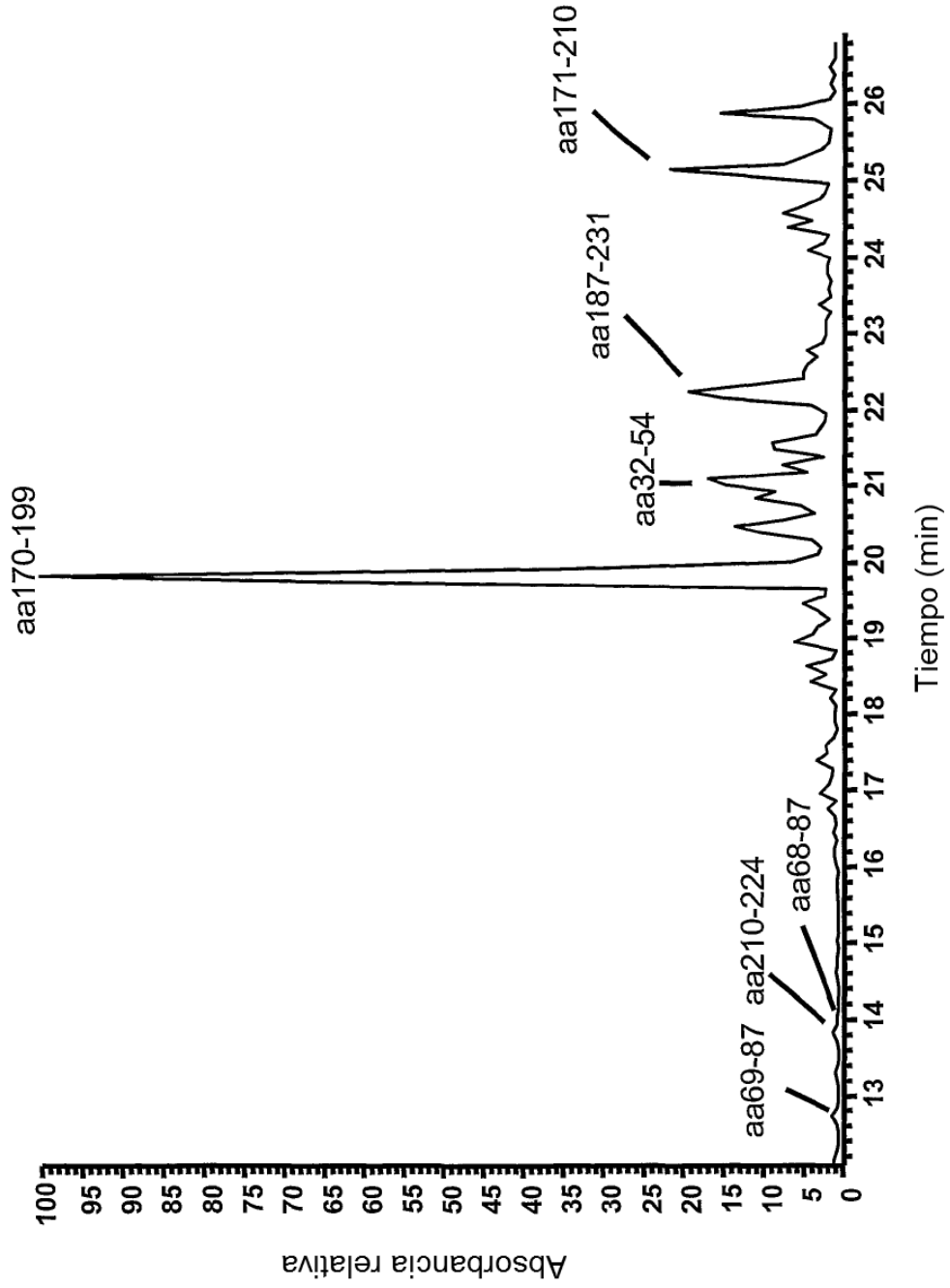


FIG. 1

SEC ID N° 2	1-50	SEKSEEINEKDLRKKSELQGTALGNLKQIYYYNKAITSSSEKSAADQFLTN	1	6	11	16	21	26	31	36	41	46
	51-100	TLLFKGFFTGHPWYNDLIVDLIGSTATSEYEGSSVDLYGAYYGYQCAGGT										
	101-150	PNKTACMYGGVTLHDNRLTEKKVPINLWIDGKQTTVPIDKVKTSKKEV										
	151-200	TVQELDLQARHYLHGKFGLYNSDSFSGGKVQRGLIVFHSSEGSTVSYDLFD										
	201-233	AQGQYPTLLRIYRDNITISSTSLISLYLYTT										

FIG. 2

SEC ID N° 3 **SEAE18:** SEKSEINEKDLRKKSELQGTALGNLKQIYYN--EKAITENKESDDQF
SEC ID N° 4 **SEA :** SEKSEINEKDLRKKSELQGTALGNLKQIYYN--EKAKTENKESHQF
SEC ID N° 5 **SED :** ALHKKSELSTALNNMKHSYADA--NPIIGANKSTGDQF
SEC ID N° 6 **SEH :** EDLHDKSELTDLALANAYGQYNHPPFIKENIKSDEISGEKDL

SEAE18: LENTLLFKGFFTHPWYNDLLVLDLGSKDATNKYKGGKVDLYGAYGYQCA
SEA : LQHTILFKGFFTHSWYNDLLVDFDSKDIVDKYKGGKVDLYGAYGYQCA
SED : LENTLLYKAF--LLINFNSAEMAQHFKSKNVDDVYAIRYAAAC--
SEH : IFRNQGDSG--NDRVKFATADLAQKFKKNKNVDIYGASFYKCE

SEAE18: GGTPNKTACMYGGVTLHDNRLTEKKVPINLWIDGKQTVPIDKVKTSK
SEA : GGTPNKTACMYGGVTLHDNRLTEKKVPINLWLDGKQNTVPLEFTVKTNK
SED : --R--TACTYGGVTPHAGNALKARKKIPINLWIIGVQKEVSLDKVQTDK
SEH : KI|SE|N|S|E|C|L|Y|G|G|T|L|N|S|E|K|L|A|Q|E|R|V|I|G|A|N|V|W|D|G|I|Q|K|E|T|E|--L|I|R|T|N|K

SEAE18: KEVTVQELDLQARHYLHGKFGLYNSDSFGGKVQVQGLIVFHSSEGSTVSYD
SEA : K|N|V|T|V|Q|E|L|D|L|Q|A|R|R|Y|L|Q|E|K|Y|N|L|Y|N|S|D|V|D|G|K|V|Q|R|G|L|I|V|F|H|T|S|T|E|P|S|V|N|Y|D
SED : K|N|V|T|V|Q|E|L|D|A|Q|A|R|R|Y|L|Q|K|D|L|K|L|Y|N|---A|I|Q|R|G|K|L|E|F|D|S|A|A|S|K|V|S|Y|D
SEH : K|N|V|T|L|Q|E|L|D|I|K|I|R|K|I|L|S|D|K|Y|K|I|Y|Y|---K|D|S|E|I|S|K|G|L|I|E|F|D|M|K|T|P|R|D|Y|S|E|D

SEAE18: LFDAQGQYPTLLRIYRDNKTINSEN-LHIALIYITT
SEA : L|F|G|A|Q|G|Q|Y|S|N|T|L|L|R|I|Y|R|D|N|K|T|I|N|S|E|N|---H|I|D|I|Y|L|Y|T|S
SED : L|F|D|V|A|G|D|F|P|E|K|Q|L|R|I|Y|S|D|N|K|T|L|S|T|E|H|---L|H|I|D|I|Y|L|Y|E|A
SEH : L|Y|D|L|K|G|E|N|D|Y|E|I|D|K|I|Y|E|D|N|K|T|L|K|S|D|D|I|S|H|I|D|V|N|L|Y|T|K|K|K|V

FIG. 3

<p>SEC ID N° 2 SEA/E-120</p> <p>SEC ID N° 3 SEA/E-18</p> <p>SEC ID N° 7 SEE</p> <p>SEC ID N° 4 SEA</p>	<p style="text-align: center;"><u>A</u></p> <p>SEKSEEINEKDLRKKSELOQTALGNLKQIYYNSKAI TSSEKSADQFLTNTLLFKGFFTG 60</p> <p>SEKSEEINEKDLRKKSELOQTALGNLKQIYYNEKAI TENKESDDQFLENTLLFKGFFTG 60</p> <p>SEKSEEINEKDLRKKSELOQTALGNLKQIYYNEKAI TENKESDDQFLENTLLFKGFFTG 60</p> <p>SEKSEEINEKDLRKKSELOQTALGNLKQIYYNEKAKTENKESHQFLQHTILFKGFFTD 60</p> <p>***** .**.*:**:*****.** * .**:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:*</p>	<p style="text-align: center;"><u>B</u></p> <p>HPWYNDLLVDLGS TAATSEYEGSSVDLYGAYGYQACAGTTPNKTA CMYGGVTLHDNNRLT 120</p> <p>HPWYNDLLVDLGS KDATNKYKGGKVDLYGAYGYQACAGTTPNKTA CMYGGVTLHDNNRLT 120</p> <p>HPWYNDLLVDLGS KDATNKYKGGKVDLYGAYGYQACAGTTPNKTA CMYGGVTLHDNNRLT 120</p> <p>HSWYNDLLVDFDSKDI VDKYKGGKVDLYGAYGYQACAGTTPNKTA CMYGGVTLHDNNRLT 120</p> <p>* .*****:**:*** **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:*</p>
<p>SEA/E-120</p> <p>SEA/E-18</p> <p>SEE</p> <p>SEA</p>	<p style="text-align: center;"><u>C</u></p> <p>EEKKVPINLWIDGKQTTVP IDKVKTSKKEVTVQELDLQARHYLHGKFGLYNSDSFSGKVQ 180</p> <p>EEKKVPINLWIDGKQTTVP IDKVKTSKKEVTVQELDLQARHYLHGKFGLYNSDSFSGKVQ 180</p> <p>EEKKVPINLWIDGKQTTVP IDKVKTSKKEVTVQELDLQARHYLHGKFGLYNSDSFSGKVQ 180</p> <p>EEKKVPINLWIDGKQTTVP LLETVKTKNKNVTVQELDLQARRYLQEKYNLYNSDDVFDGKVQ 180</p> <p>*****:**:*** **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:*</p>	<p style="text-align: center;"><u>D</u></p> <p>RGLIVFHSSEGSTVSYDLFDAQGGQYPTLLRRIYRDNTTISSTLSLSLLYTT 233</p> <p>RGLIVFHSSEGSTVSYDLFDAQGGQYPTLLRRIYRDNKTINSENHIALYLYTT 233</p> <p>RGLIVFHSSEGSTVSYDLFDAQGGQYPTLLRRIYRDNKTINSENHIDLILYLYTT 233</p> <p>RGLIVFHTSTEPSVNYDLFGAQQGQYSNTLLRRIYRDNKTINSENMMHIDIYLYTS 233</p> <p>*****:**:*** **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:*</p>
<p>SEA/E-120</p> <p>SEA/E-18</p> <p>SEE</p> <p>SEA</p>	<p style="text-align: center;"><u>E</u></p> <p>RGLIVFHSSEGSTVSYDLFDAQGGQYPTLLRRIYRDNTTISSTLSLSLLYTT 233</p> <p>RGLIVFHSSEGSTVSYDLFDAQGGQYPTLLRRIYRDNKTINSENHIALYLYTT 233</p> <p>RGLIVFHSSEGSTVSYDLFDAQGGQYPTLLRRIYRDNKTINSENHIDLILYLYTT 233</p> <p>RGLIVFHTSTEPSVNYDLFGAQQGQYSNTLLRRIYRDNKTINSENMMHIDIYLYTS 233</p> <p>*****:**:*** **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:*</p>	<p style="text-align: center;"><u>E</u></p> <p>RGLIVFHSSEGSTVSYDLFDAQGGQYPTLLRRIYRDNTTISSTLSLSLLYTT 233</p> <p>RGLIVFHSSEGSTVSYDLFDAQGGQYPTLLRRIYRDNKTINSENHIALYLYTT 233</p> <p>RGLIVFHSSEGSTVSYDLFDAQGGQYPTLLRRIYRDNKTINSENHIDLILYLYTT 233</p> <p>RGLIVFHTSTEPSVNYDLFGAQQGQYSNTLLRRIYRDNKTINSENMMHIDIYLYTS 233</p> <p>*****:**:*** **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:*</p>

FIG. 4

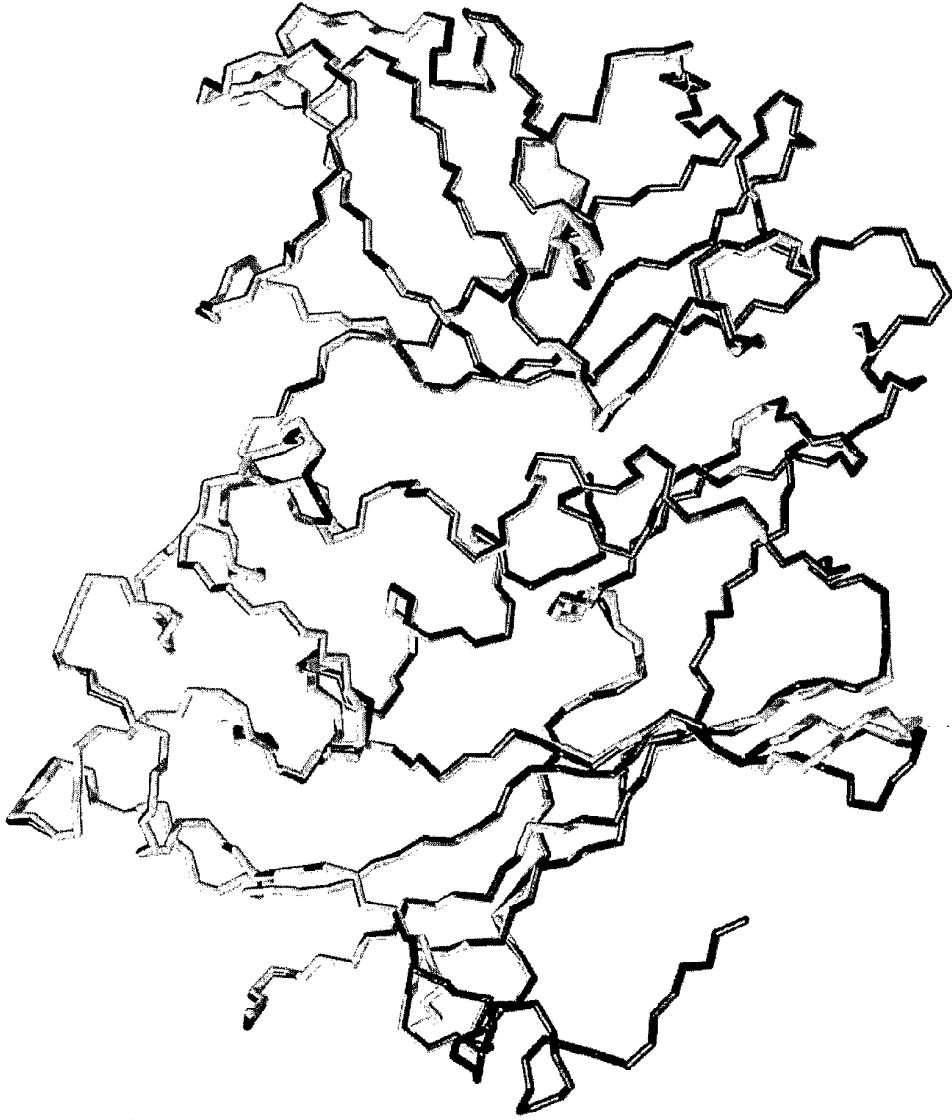


FIG. 5

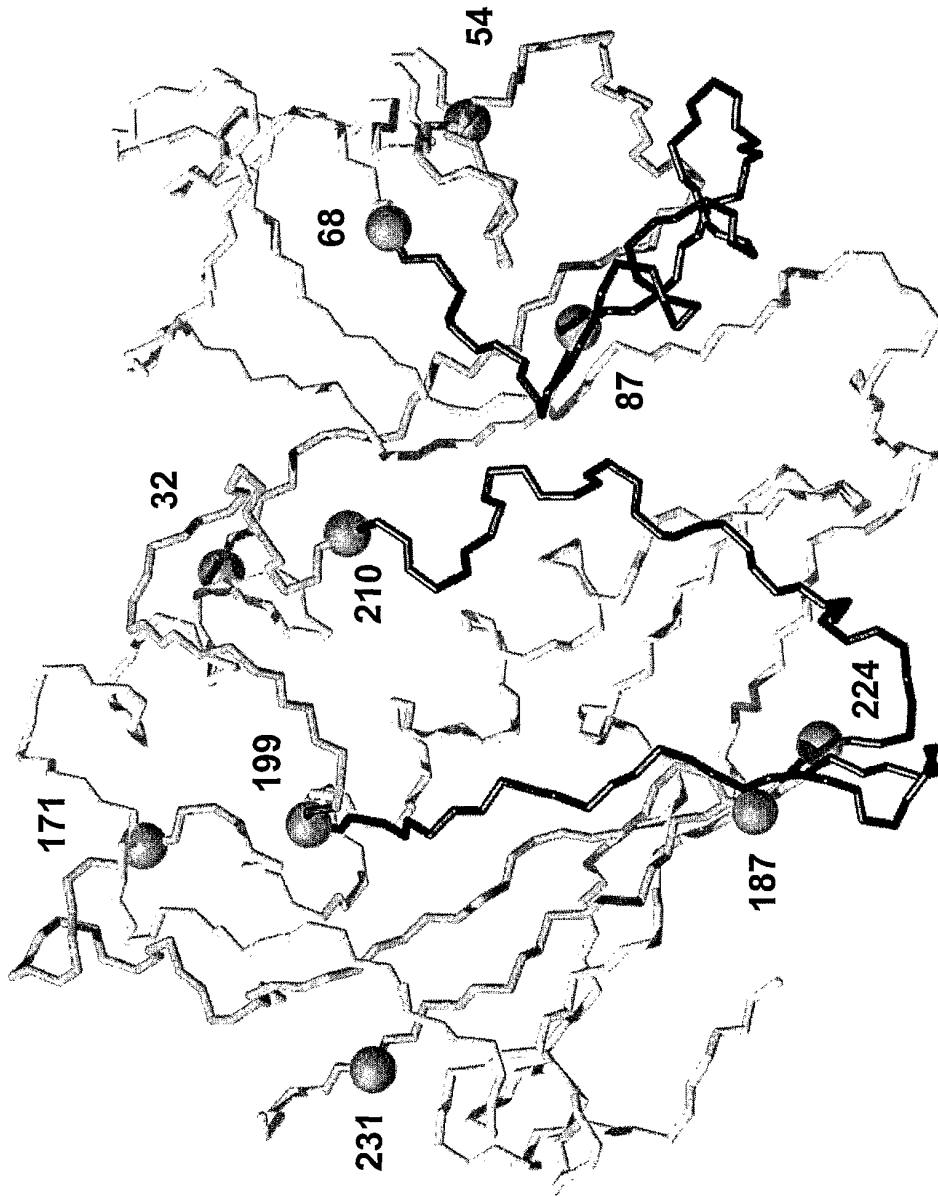


FIG. 6

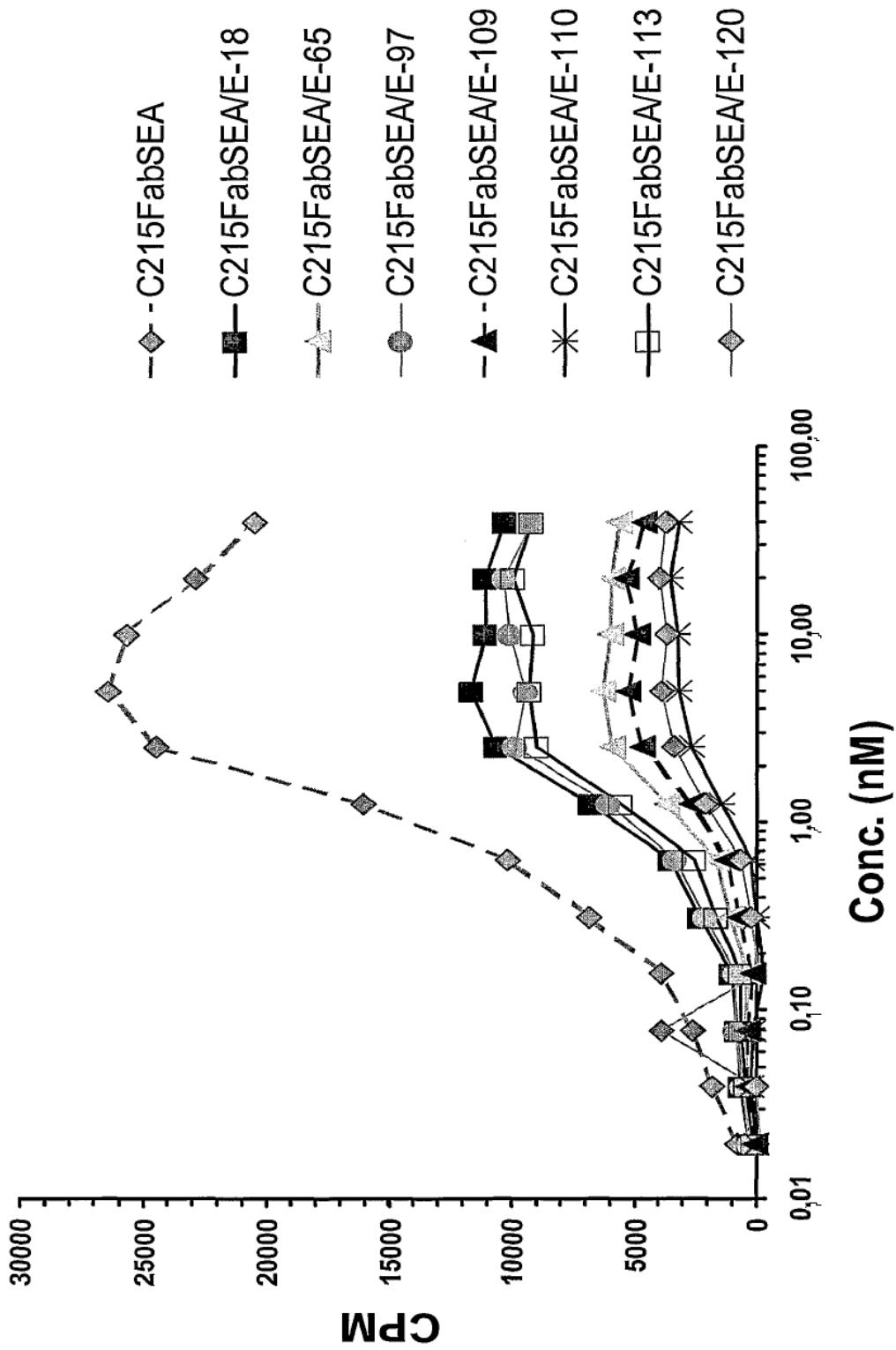


FIG. 7

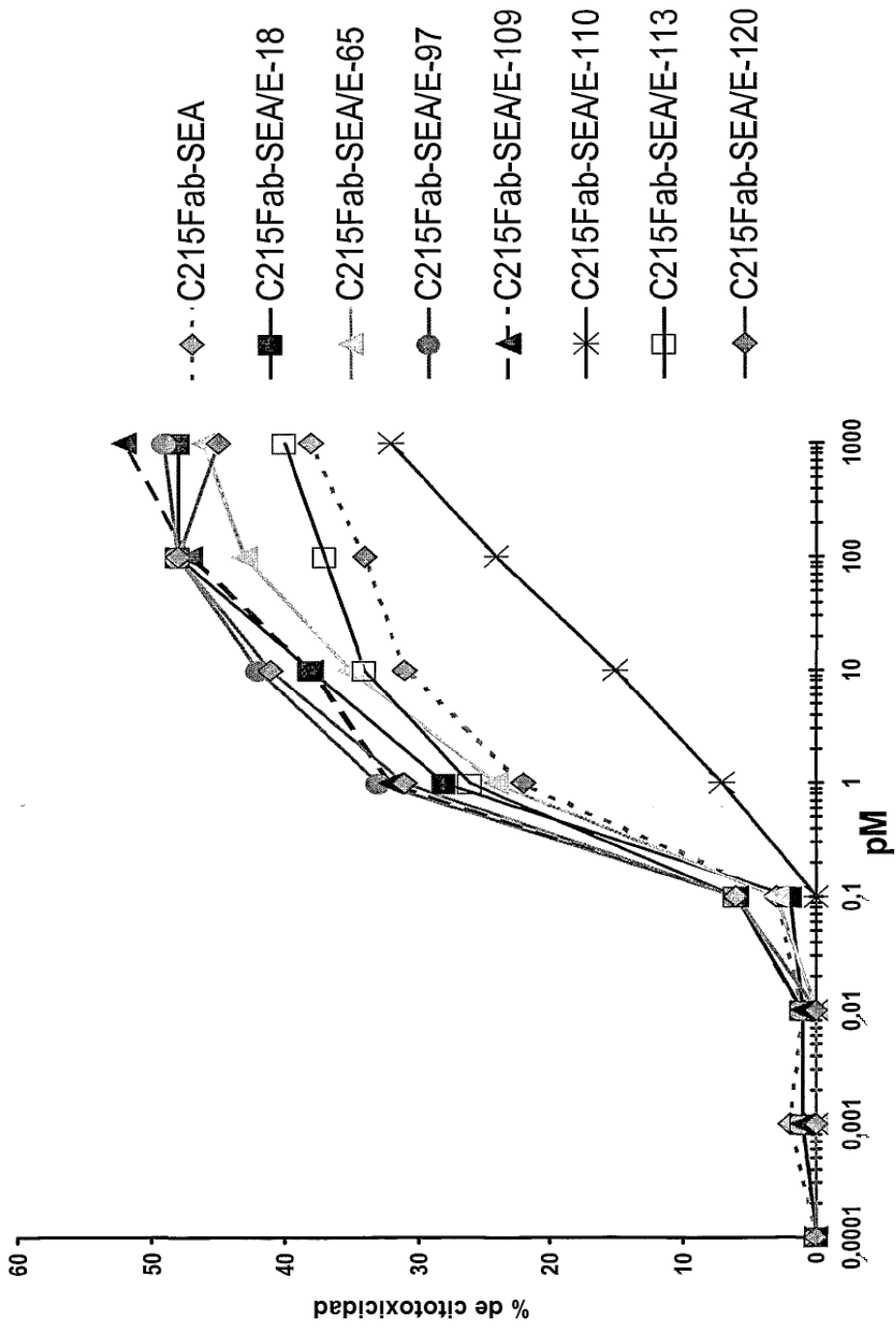


FIG. 8A

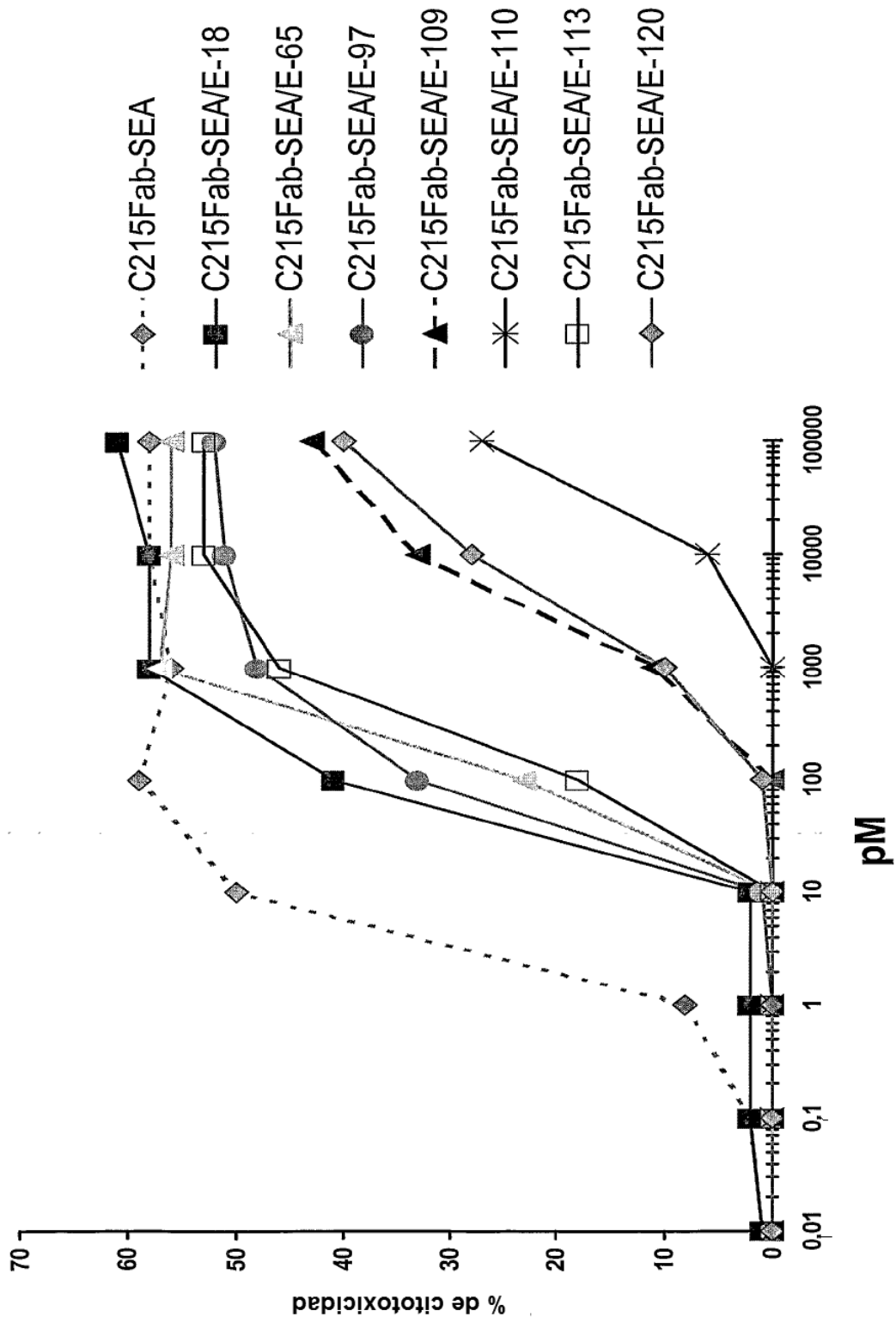


FIG. 8B



FIG. 9

Cadena pesada variable 5T4

SEC ID N° 1 1-50 EVQLQ QSGPD LVKPG ASVKI SCKAS GYSFT GYYMH WVKQS PGKGL EWIGR

51-100 INPNN GVTLY NQKFK DKATL TVDKS STTAY MELRS LTSED SAVY CARST

101-150 MITNY VMDYW GQGT VTVSS AKTTP PSVYP LAPGS AAQTN SMVTL GCLVK

151-200 GYFPE PVTVT WNSGS LSSGV HTFPA VLQSD LYTLS SSVTV PSSTW PSETV

201-250 TCNVA HPASS TKVDK KIVPR DSGGP SEKSE EINEK DLKKK SELQG TALGN

251-300 LKQIY YNSK AITSS EKSAD QFLTN TLLFK GFFTG HPWYN DLLVD LGSTA

301-350 ATSEY EGSSV DLYGA YGYQ CAGGT PNKTA CMYGG VTLHD NNRLT EEKVV

351-400 PINLW IDGKQ TTVPI DKVKT SKKEV TVQEL DLQAR HYLHG KFGLY NSDSF

401-450 GGKVQ RGLIV FHSSE GSTVS YDLFD AQQY PDLTL RIYRD NTTIS STSLS

451-500 ISLYL YTTSI VMTQT PTSLL VSAGD RVTIT CKASQ SVSND VAWYQ QKPGQ

501-550 SPKLL ISYTS SRYAG VPDRF SGGY GTDFT LTISS VOAE AAVYF CQQDY

551-600 NSPPT FGGGT KLEIK RADAA PTVSI FPPSS EQLTS GGASV VCFLN NFPYK

601-650 DINVK WKIDG SERQN GVLNS WTDQD SKDST YSMSS TLLIT KDEYE RHNSY

651-672 TCEAT HKTST SPIVK SFNRN ES

Cadena pesada constante C242

SEA/E-120

Cadena ligera variable 5T4 1

Cadena ligera constante C242

FIG. 10

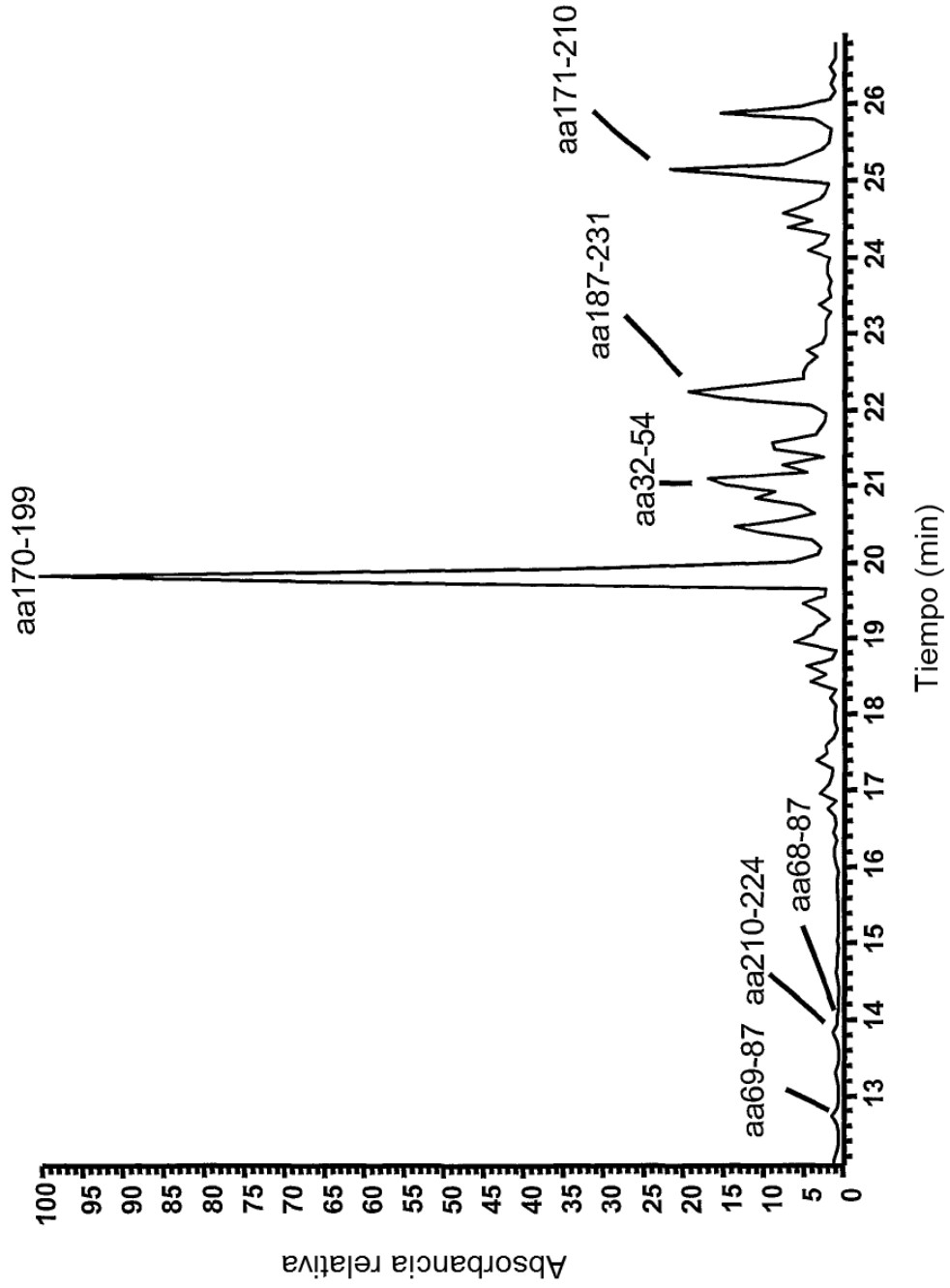


FIG. 1

SEC ID N° 2	1	6	11	16	21	26	31	36	41	46
	1-50 SEKSEEINEKDLRKKSELQGTALGNLKQIYYYNKAITSSSEKSAADQFLTN									
	51-100 TLLFKGFFTGHPWYNDLIVDLIGSTAATSEYEGSSVDLYGAYYGYQCAGGT									
	101-150 PNKTACMYGGVTLHDNRLTEKKVPINLWIDGKQTTVPIDKVKTSKKEV									
	151-200 TVQELDLQARHYLHGKFGLYNSDSFSGGKVQRGLIVFHSSEGSTVSYDLFD									
	201-233 AQQQPDLLRIYRDNITISSLSLSISLYLYTT									

FIG. 2

SEC ID N° 3 **SEAE18:** SEKSEINEKDLRKKSELQGTALGNLKQIYYN--EKAITENKESDDQF
SEC ID N° 4 **SEA :** SEKSEINEKDLRKKSELQGTALGNLKQIYYN--EKAKTENKESHQF
SEC ID N° 5 **SED :** ALHKKSELSTALNNMKHSYADA--NPIIGANKSTGDQF
SEC ID N° 6 **SEH :** EDLHDKSELTDLALANAYGQYNHPPFIKENIKSDEISGEKDL

SEAE18: LENTLLFKGFFTHPWYNDLLVLDLGSKDATNKYKGGKVVLDLYGAYGYQCA
SEA : LQHTILFKGFFTHSWYNDLLVDFDSKDIVDKYKGGKVVLDLYGAYGYQCA
SED : LENTLLYKAF--LLINFNSAEMAQHFKSKNVVDVYAIRYAAAC--
SEH : IFRNQGDSG--NDRVKFATADLAQKFKKNKNVDIYGASFYKCE

SEAE18: GGTPNKTACMYGGVTLHDNNRLTEKKVPINLWIDGKQTVPIDKVKTSK
SEA : GGTPNKTACMYGGVTLHDNNRLTEKKVPINLWLDGKQNTVPLEFTVKTNK
SED : --R--TACTYGGVTPHAGNALKARKKIPINLWIIGVQKEVSLDKVQTDK
SEH : KI|SE|N|S|E|C|L|Y|G|T|L|N|S|E|K|L|A|Q|E|R|V|I|G|A|N|V|W|D|G|I|Q|K|E|T|E|--L|I|R|T|N|K

SEAE18: KEVTVQELDLQARHYLHGKFGLYNSDSFGGKQVORGLIVFHSSEGSTVSYD
SEA : K|N|V|T|V|Q|E|L|D|L|Q|A|R|R|Y|L|Q|E|K|Y|N|L|Y|N|S|D|V|D|G|K|V|Q|R|G|L|I|V|F|H|T|S|T|E|P|S|V|N|Y|D
SED : K|N|V|T|V|Q|E|L|D|A|Q|A|R|R|Y|L|Q|K|D|L|K|L|Y|N|---A|I|Q|R|G|K|L|E|F|D|S|A|A|S|K|V|S|Y|D
SEH : K|N|V|T|L|Q|E|L|D|I|K|I|R|K|I|L|S|D|K|Y|K|I|Y|Y|---K|D|S|E|I|S|K|G|L|I|E|F|D|M|K|T|P|R|D|Y|S|E|D

SEAE18: LFDAQGQYPTLLRIYRDNKTINSEN-LHIALYIYTT
SEA : L|F|G|A|Q|G|Q|Y|S|N|T|L|L|R|I|Y|R|D|N|K|T|I|N|S|E|N|---H|I|D|I|Y|L|Y|T|S
SED : L|F|D|V|A|G|D|F|P|E|K|Q|L|R|I|Y|S|D|N|K|T|L|S|T|E|H|---L|H|I|D|I|Y|L|Y|E|A
SEH : L|Y|D|L|K|G|E|N|D|Y|E|I|D|K|I|Y|E|D|N|K|T|L|K|S|D|D|I|S|H|I|D|V|N|L|Y|T|K|K|K|V

FIG. 3

SEC ID N° 2 SEA/E-120 A B
SEC ID N° 3 SEA/E-18 SEKSEINEKDLRKKSELOQTALGNLKQIYYNSKAITSEKESADQFLTNTLLFKGFFTG 60
SEC ID N° 7 SEE SEKSEINEKDLRKKSELOQTALGNLKQIYYNEKAI TENKESDDQFLENTLLFKGFFTG 60
SEC ID N° 4 SEA SEKSEINEKDLRKKSELOQTALGNLKQIYYNEKAI TENKESDDQFLENTLLFKGFFTG 60
 SEKSEINEKDLRKKSELOQTALGNLKQIYYNEKAKTENKESHQFLQHTILFKGFFTD 60
 ***** . ** . ** : ***** . ** * . . : * * * * * : * : ***** .

C
 HPWYNDLLVLDLGS TAATSEYEGSSVDLYGAYGYQACAGTTPNKTCMYGGVTLHDNNRLT 120
 HPWYNDLLVLDLGS KDATNKYKGGKVDLYGAYGYQACAGTTPNKTCMYGGVTLHDNNRLT 120
 HPWYNDLLVLDLGS KDATNKYKGGKVDLYGAYGYQACAGTTPNKTCMYGGVTLHDNNRLT 120
 HSWYNDLLVDFDSKDI VDKYKGGKVDLYGAYGYQACAGTTPNKTCMYGGVTLHDNNRLT 120
 * . ***** : * . . : * . . ***** : * . . ***** : * . . *****

EEKKVPINLWIDGKQTTVP IDKVKTSKKEVTVQELDLQARHYLHGKFGLYNSDSFGGKVQ 180
 EEKKVPINLWIDGKQTTVP IDKVKTSKKEVTVQELDLQARHYLHGKFGLYNSDSFGGKVQ 180
 EEKKVPINLWIDGKQTTVP IDKVKTSKKEVTVQELDLQARHYLHGKFGLYNSDSFGGKVQ 180
 EEKKVPINLWIDGKQNTVPLETVKTKNKNVTVQELDLQARRYLQEKYNLYNSDDVFDGKVQ 180
 ***** : ***** . ***** : ***** : ***** : * . . ***** * . *****

D E
 RGLIVFHSSEGSTVSYDLFDAQGQYPTLLRIYRDNTTISSTLSLSLLYTT 233
 RGLIVFHSSEGSTVSYDLFDAQGQYPTLLRIYRDNKTINSENHLIALYLYTT 233
 RGLIVFHSSEGSTVSYDLFDAQGQYPTLLRIYRDNKTINSENHLIDLILYLYTT 233
 RGLIVFHTSTEPSVNYDLFDAQGQYSNTLLRIYRDNKTINSENMMHIDIYLYTS 233
 ***** : * . . : ***** . ***** : ***** : * . . : * : ***** :

FIG. 4

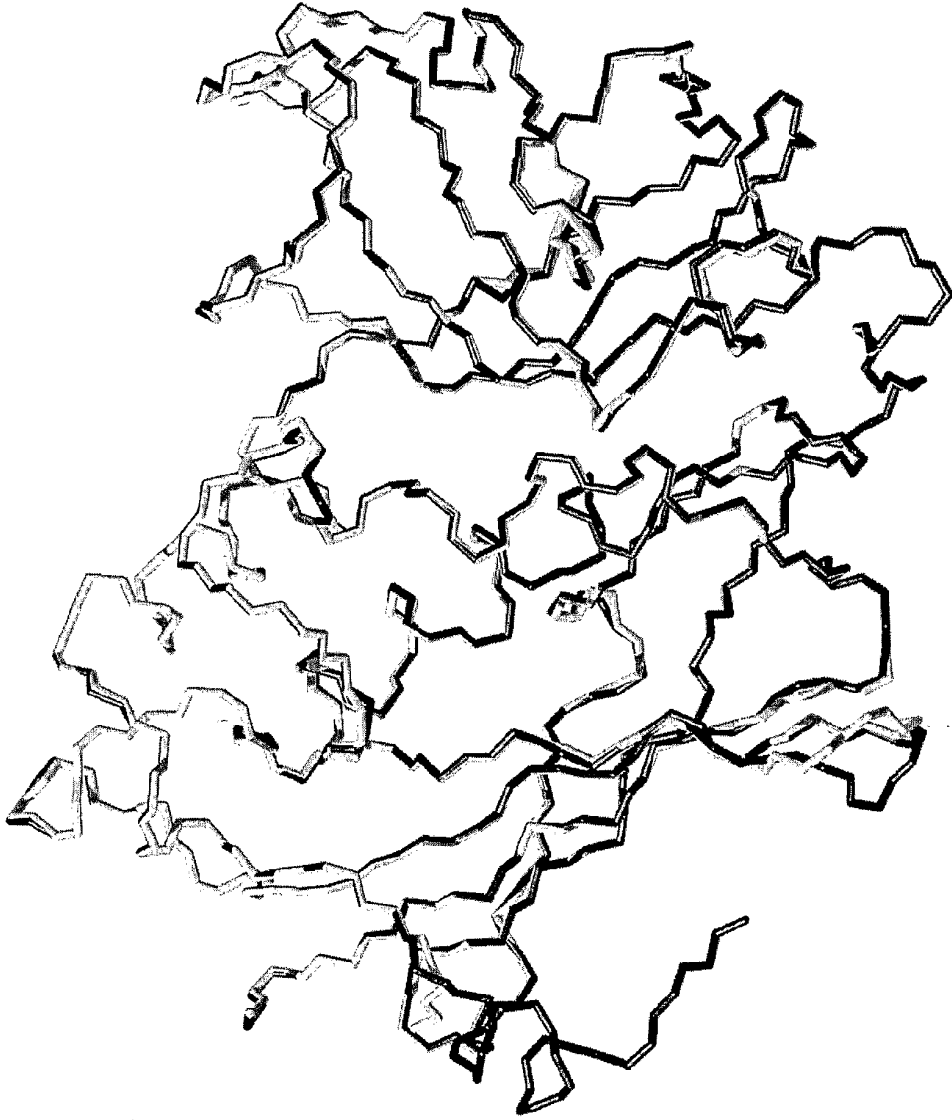


FIG. 5

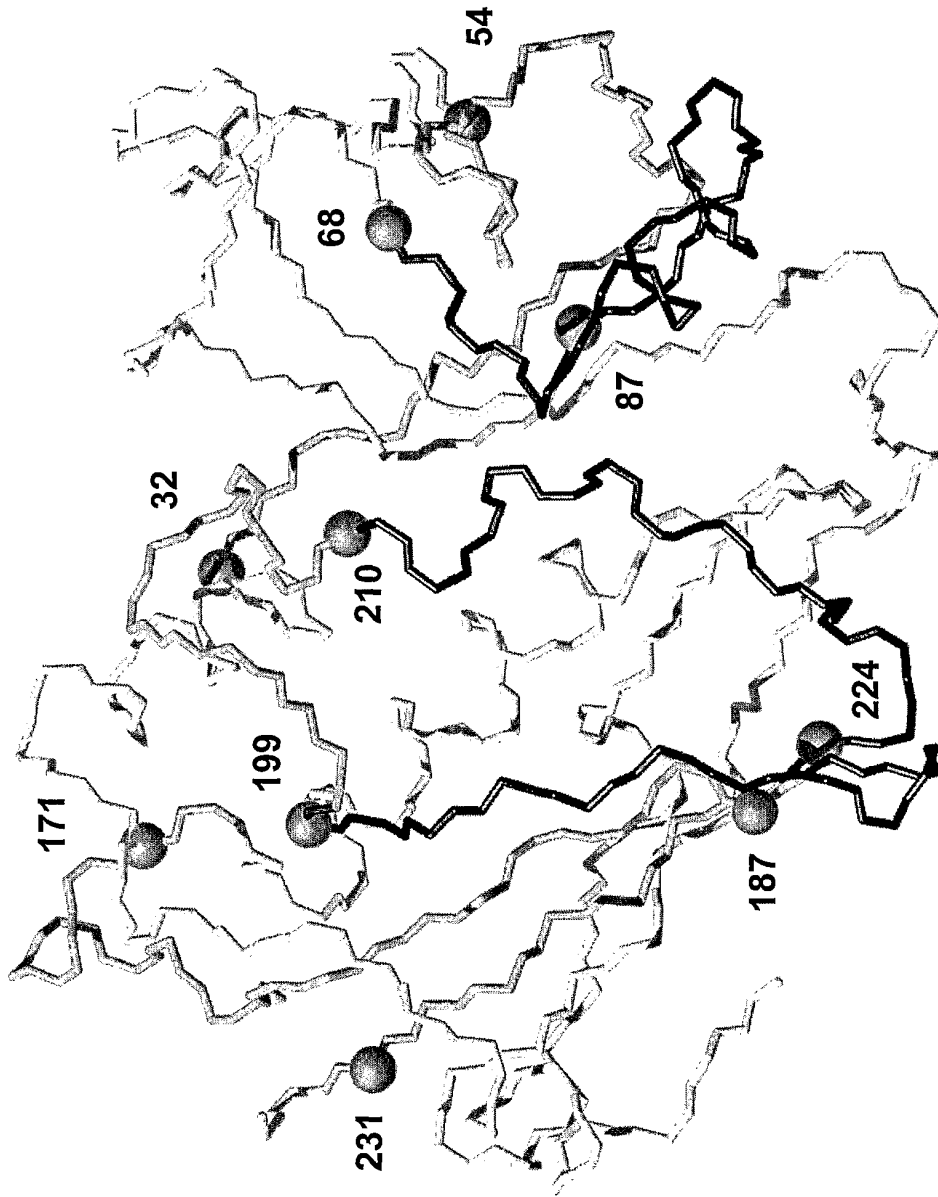


FIG. 6

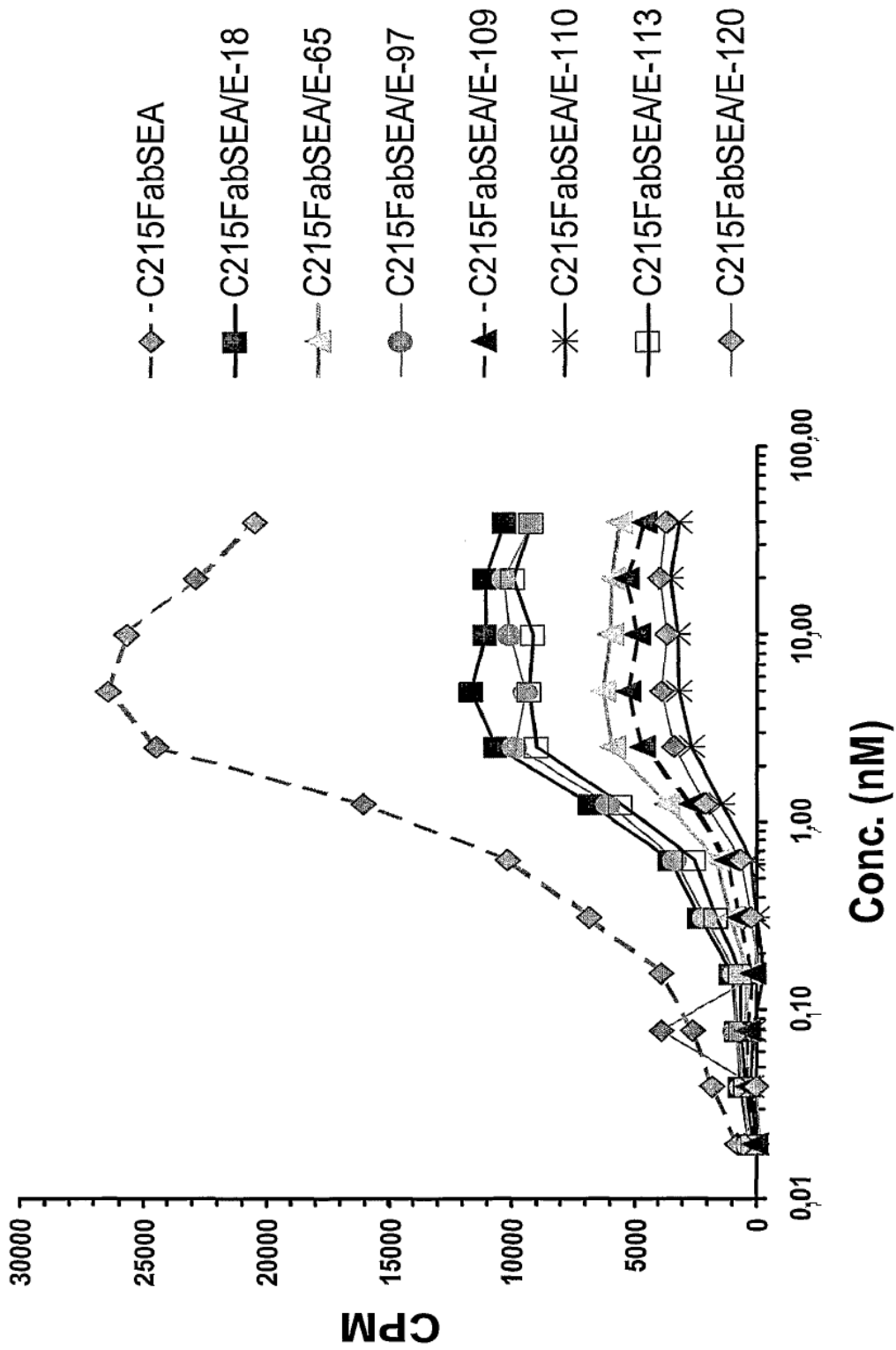


FIG. 7

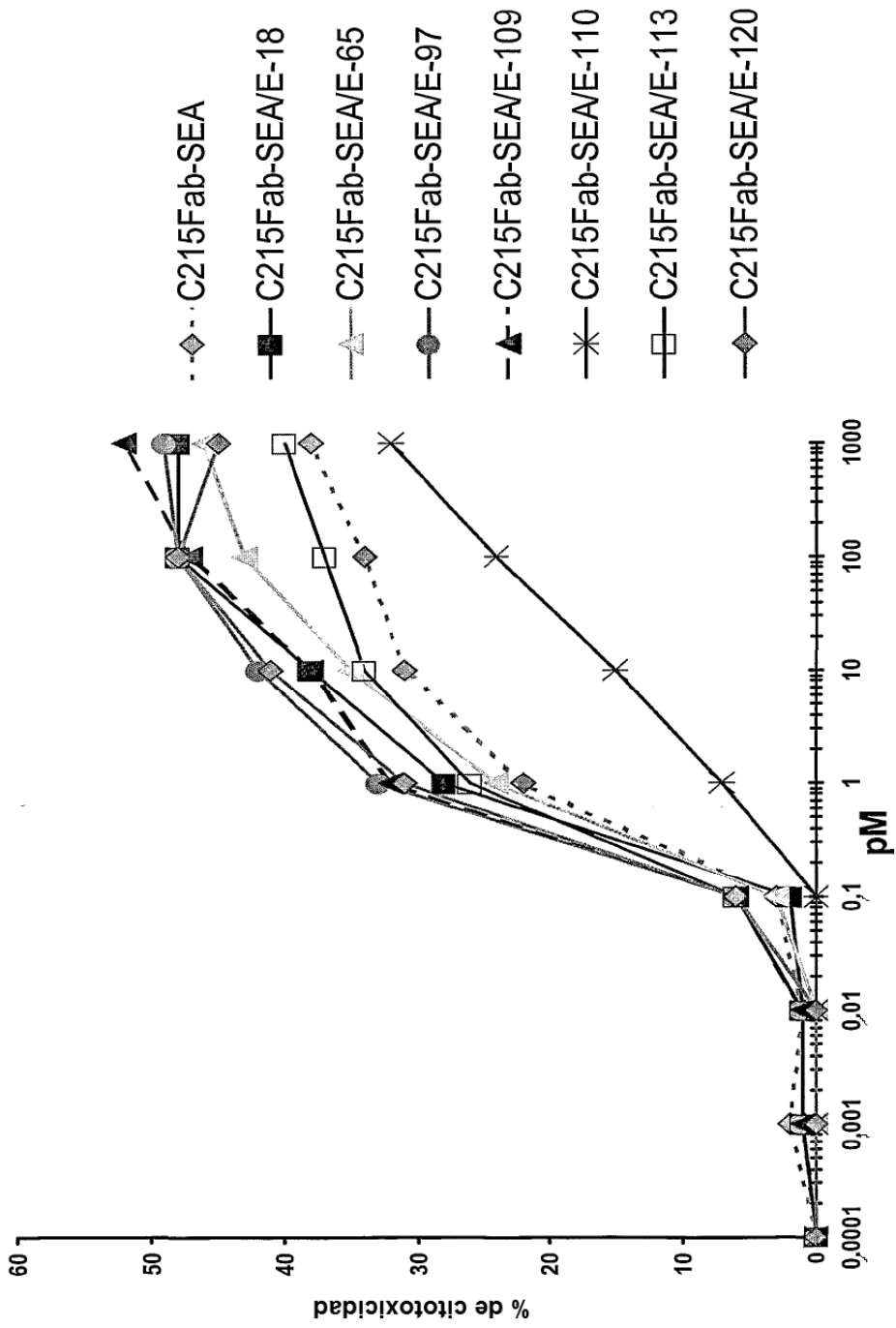


FIG. 8A

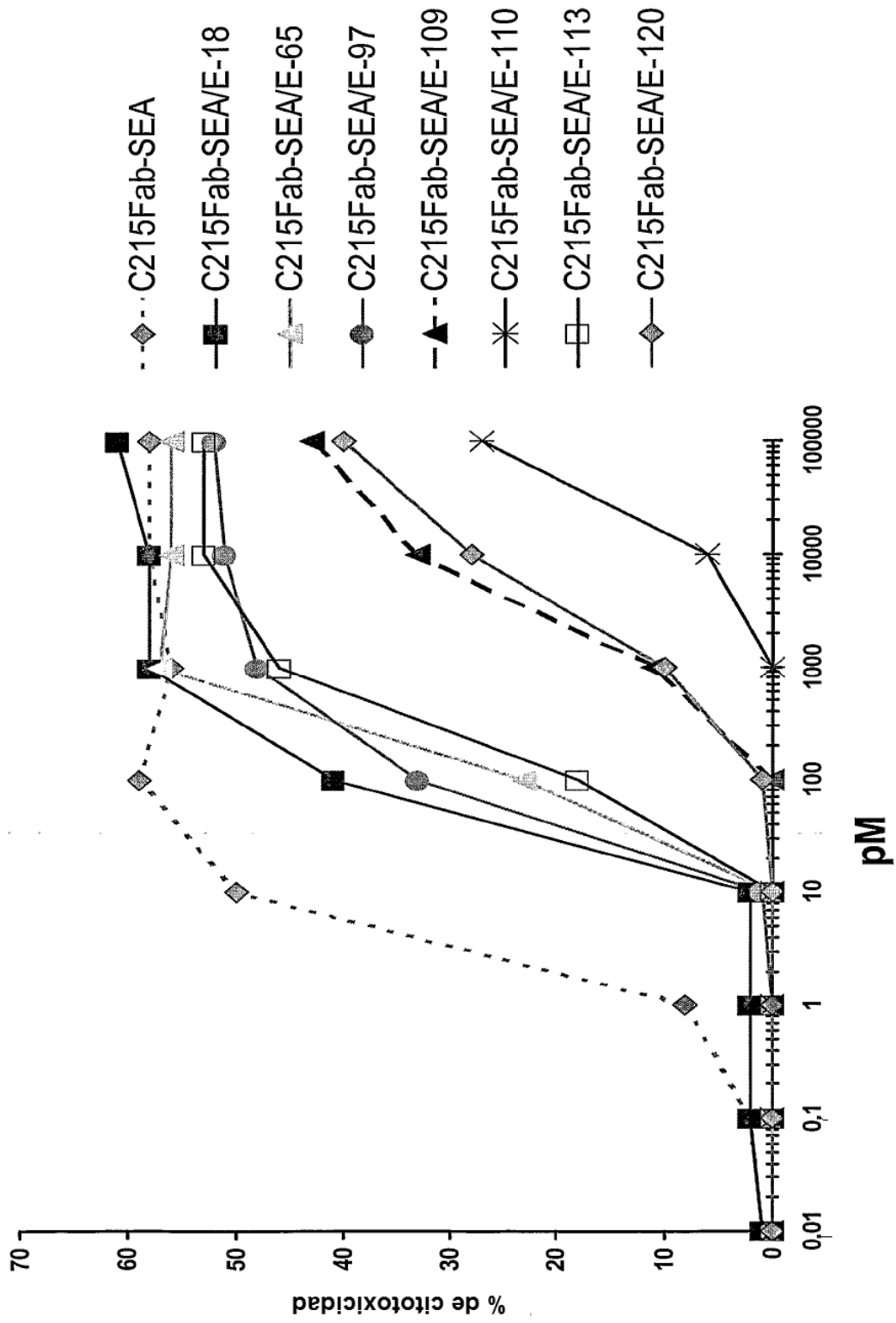


FIG. 8B



FIG. 9

	Cadena pesada variable 5T4	
SEC ID N° 1	EVQLQ QSGPD LVKPG ASVKI SCKAS GYSFT GYMH WVKQS PGKGL EWIGR	1-50
	INPNN GVTLY NQKFK DKATL TVDKS STTAY MELRS ITSED SAVYY CARST	51-100
	Cadena pesada constante C242	
	MITNY VMDYW GQTS VTVSS AKTTP PSVYP LAPGS AAQTN SMVTL GCLVK	101-150
	GYFPE PVTVT WNSGS LSSGV HTFPA VLQSD LYTLS SSVTV PSSTW PSETV	151-200
	SE/E-120	
	TCNVA HPASS TKVDK KIVPR DSGGP SEKSE EINEK DLRKK SELQG TALGN	201-250
	LKQIY YNSK AITSS EKSAD QFLTN TLLFK GFFTG HPWYN DLLVD LGSTA	251-300
	ATSEY EGSSV DLYGA YGYQ CAGGT PNKTA CMYGG VTLHD NNRLT EEKKV	301-350
	PINLW IDGKQ TTVPI DKVKT SKKEV TVQEL DLQAR HYLHG KFGLY NSDSF	351-400
	GGKVQ RGLIV FHSSE GSTVS YDLFD AQQQY PDTLL RIYRD NTTIS STSLS	401-450
	Cadena ligera variable 5T4 1	
	ISLYL YTTSI VMTQT PTSLL VSAGD RVTIT CKASQ SVSND VAWYQ QKPGQ	451-500
	SPKLL ISYTS SRYAG VPDRF SGSGY GTDFT LTISS VOARD AAVYF CQQDY	501-550
	Cadena ligera constante C242₁	
	NSPPT FGGGT KLEIK RADAA PTVSI FPPSS EQLTS GGASV VCFLN NFYPK	551-600
	DINVK WKIDG SERQN GVLNS WTDQD SKDST YSMSS TLLTLT KDEYE RHNSY	601-650
	TCEAT HKTST SPIVK SFNRN ES	651-672

FIG. 10