

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 565 344**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.04.2011** **E 11719347 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.12.2015** **EP 2556089**

54 Título: **Semianticuerpos con auto-ensamblaje**

30 Prioridad:

09.04.2010 FR 1001516

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

04.04.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**UGOLIN, NICOLAS;
FALCK, CAROLINE;
LEFEVRE, EMILIE;
CHEVILLARD, SYLVIE y
TISNE-VICROBECK, CARINE**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 565 344 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

Semianticuerpos con auto-ensamblaje

5 La invención se refiere a nuevas moléculas quiméricas, denominadas "semianticuerpos" capaces de autoensamblarse para formar un sitio de reconocimiento de un epítipo. Un semianticuerpo está constituido de al menos dos moléculas quiméricas A y B, que comprenden cada una un dominio polipeptídico característico de un dominio variable (o DV) de una cadena pesada o de una cadena ligera de un anticuerpo, y un dominio nucleotídico, siendo el dominio nucleotídico de A y el de B capaces de emparejarse en una estructura bicatenaria, por ejemplo en medio hídrico. En estas moléculas quiméricas se pueden injertar unas secuencias nucleicas biológicamente activas que permiten por ejemplo impedir la expresión de genes diana en el interior de una célula de mamífero humano o no humano.

15 La invención se refiere también a diversas aplicaciones de estos semianticuerpos, y en particular a la utilización de estos semianticuerpos para aplicaciones de tratamiento terapéutico o de diagnóstico *in vitro* y más generalmente de detección de moléculas biológicas.

Estos semianticuerpos presentan un potencial importante, por un lado, para el tratamiento de enfermedades genéticas o de cánceres y, por otro lado, para el tratamiento de enfermedades infecciosas. En el ámbito de algunas enfermedades genéticas, tales como la miopatía, la utilización de tal molécula quimérica puede permitir impedir la expresión de genes mutados a nivel de la traducción, a fin de disminuir la presencia de proteínas defectuosas, en el origen de la enfermedad. En el campo de la lucha contra los cánceres, esta molécula quimérica puede permitir inactivar las proteínas intracelulares. A nivel de enfermedades infecciosas (en particular las enfermedades virales y las infecciones bacterianas), esta molécula quimérica puede también permitir bloquear de la expresión de genes del agente patógeno que condiciona específicamente bien unas actividades primordiales del agente patógeno (por ejemplo, la retro-transcripción en un retrovirus), o bien resistencias a los tratamientos existentes (por ejemplo, la resistencia de las bacterias a los antibióticos).

Los ácidos nucleicos, o análogos de ácidos nucleicos, antisentidos o que poseen una actividad ribo- o desoxirribonucleasa, se utilizan para bloquear la expresión de genes, ya sea a nivel de la replicación, de la transcripción, o de la traducción. Dado que pueden actuar directamente en una secuencia diana, estas secuencias presentan un potencial importante para el tratamiento de enfermedades genéticas, de enfermedades infecciosas, y en la lucha contra los mecanismos de resistencia (por ejemplo la resistencia de las bacterias a los antibióticos).

35 Sin embargo, la utilización de secuencias nucleotídicas o de análogos como medicamento se ve muy ampliamente limitada, por un lado, por la necesidad de dirigir específicamente estas secuencias a la célula diana y, por otro lado, por la baja eficacia del paso de estas secuencias a través de la membrana celular.

Con el fin de mejorar su eficacia de paso a través de la membrana celular, estas secuencias nucleotídicas o análogas pueden ser modificadas por la adición, en 5' o en 3', de funciones o grupos químicos lipófilos (Manoharan *et al.*, 1995; Pfeiffer y Höök, 2004) o de péptidos cortos, constituidos generalmente de 1 a 5 restos de aminoácidos beta (es decir unos aminoácidos en los que el grupo amina está en posición beta (β) con respecto al grupo carboxilato). Esta modificación permite facilitar el paso de los ácidos nucleicos a través de la membrana plásmica, como ya se ha demostrado en los cultivos celulares (Tripathi *et al.*, 2005).

A pesar de que facilita el paso de la membrana plásmica, la simple adición de un grupo hidrófobo en el extremo de las secuencias nucleicas no permite sin embargo utilizar estas últimas en el ámbito de tratamientos terapéuticos, debido al carácter no específico de los grupos hidrófobos. En efecto, las secuencias de ácido nucleico así modificadas pueden encontrarse, en su gran mayoría, absorbidas de manera específica por diversas células antes de alcanzar la diana, disminuyendo así el efecto del tratamiento.

Por lo tanto, es necesario un direccionamiento específico de estas moléculas hacia la diana.

Para paliar estos problemas de direccionamiento, sean cuales sean las condiciones del medio, los inventores han elaborado unas moléculas quiméricas que comprenden un dominio nucleico, por ejemplo ADN, y un dominio polipeptídico característico de un fragmento de anticuerpo que comprende un sitio de reconocimiento de un epítipo.

Estas moléculas quiméricas ácido nucleico/anticuerpos (por ejemplo ADN/anticuerpos o ADN/AC) pueden ser utilizadas para marcar y amplificar los marcajes de proteínas, por ejemplo en la superficie de una célula, o también para funcionalizar una superficie por unos anticuerpos en el ámbito de la realización de biochips.

Existe, en la técnica anterior, unas moléculas quiméricas anticuerpo/ácido nucleico (FR286006: FR2882563; FR2882564), que presentan no obstante unos inconvenientes:

65 a) el mecanismo de penetración en el interior de una célula se basa en la endocitosis o pinocitosis celular, lo que implica una interacción no covalente entre el ácido nucleico y el anticuerpo, de manera que el cambio de pH

después de la fusión de las vesículas de endocitosis con unas vesículas básicas o ácidos intra-celulares, rompe las interacciones no covalentes y separa los ácidos nucleicos de los anticuerpos. Este modo de direccionamiento y de absorción hace intervenir una actividad celular y por lo tanto no es independiente del estado de la célula. Este modo de realización será poco o nada eficaz en modelos celulares que realizan poco o nada la endocitosis.

5 b) las secuencias de ácido nucleico que son ya utilizadas en las moléculas anticuerpo/ácido nucleico son generalmente de tipo antisentido y eventualmente micro ARN (Mi-ARN) con destino a los sistemas proteosómicos; no tienen actividad enzimática propia (Baulcombe, 2002).

10 c) además, el injerto de secuencias nucleotídicas en anticuerpos ya constituidos está limitado, por un lado, por la baja reproducibilidad del sitio de injerto en el anticuerpo (Fan *et al.*, 2008) y, por otro lado por el mantenimiento del sitio de reconocimiento del anticuerpo; en efecto, existe una probabilidad importante para que la funcionalización por el ácido nucleico se realice en el sitio activo del anticuerpo, influyendo así negativamente en su actividad.

15 d) la fabricación de anticuerpos a partir de secuencias clonadas sigue siendo difícil de obtener. Un anticuerpo es un ensamblaje complejo de cadenas polipeptídicas unidas por puentes disulfuros. Es también una proteína relativamente pesada (de 150 kDa de media) y cuya fabricación mediante métodos de clonación y de expresión recombinante *in vitro* sigue siendo difícil. En efecto, una vez producidas las cadenas, la etapa de reconstitución por emparejamiento entre estas cadenas ligeras y pesadas y el establecimiento de los puentes disulfuros correctos
20 siguen siendo limitantes. Se forma una gran diversidad de emparejamientos incorrectos entre las cadenas y, entre las combinaciones de cadenas pesadas/ligeras obtenidas, una gran parte no es funcional, debido a un mal repliegue de estas cadenas.

25 Vornlocher *et al.* (Trends in Molecular Medicine, 2006, 12(1), 1-3) han descrito unos complejos de fragmentos Fab de anticuerpos-protamina asociados a un siARN, en los que la protamina está genéticamente fusionada a la cadena pesada de un fragmento Fab de anticuerpos (F105) dirigido contra la proteína gp160 del VIH y el siARN está unido al complejo F105-protamina con una estequiometría de 1:6.

30 La solicitud internacional WO 00/67697 describe unos conjugados para la transferencia de una molécula de ácido nucleico extraño en una célula que comprende una molécula de ácido nucleico, un dominio de translocación y un anticuerpo específico de un antígeno de superficie celular.

35 Murtola *et al.* (Org. Biomol. Chem., 2008, 6, 3837-3842) han descrito unas nucleasas artificiales basadas en PNAs (PNAzimas) que comprenden 2 PNAs unidos entre sí por una molécula de ácido diaminopropiónico (Dap) capaces de escindir un ARN diana.

40 Para paliar estos diferentes inconvenientes, los inventores han elaborado unas moléculas quiméricas particulares, denominadas "semianticuerpos" (o "HAC"), que comprenden unos polipéptidos característicos de fragmentos de las partes variables de anticuerpos, y ácidos nucleicos (o análogos) capaces de auto-ensamblarse para reformar un sitio de reconocimiento de un anticuerpo funcional en medio hídrico, incluso en medio reductor.

45 El suministro de secuencia nucleicas de interés (en particular de secuencias nucleicas biológicamente activas) en el interior de células diana, a través de las moléculas quiméricas elaboradas por los inventores, es en parte independiente del mecanismo de endocitosis y/o de pinocitosis y permite por lo tanto dirigirse a cualquier célula independientemente de su metabolismo.

Así, la invención tiene por objeto una molécula quimérica denominada "semianticuerpo", caracterizado por que comprende o consiste en dos moléculas quiméricas A y B, que comprenden o que consisten cada una en:

50 (i) un dominio polipeptídico característico de un dominio variable (o DV) de una cadena pesada o de una cadena ligera de un anticuerpo, estando este dominio polipeptídico posicionado en un extremo en las moléculas quiméricas A y B, siendo el dominio polipeptídico (i) de una de las dos moléculas quiméricas, A o B, característico de un DV de una cadena ligera de un anticuerpo, y siendo el dominio polipeptídico (i) de la otra molécula quimérica, respectivamente B o A, característico de un DV de una cadena pesada de un anticuerpo (el mismo anticuerpo o un
55 anticuerpo distinto); y

(ii) un dominio nucleotídico (o dominio estructural) que comprende o que consiste en un polinucleótido, en particular un ADN o un ARN, o un análogo de un polinucleótido, en particular un ácido nucleico peptídico (ANP), un ácido nucleico bloqueado (o LNA; Locked Nucleic Acid), un ácido nucleico metilfosfonato, o un ácido nucleico tioato (en particular un ácido nucleico fosforotioato o fosforoditioato), siendo el dominio nucleotídico de A y el de B capaces de emparejarse en una estructura bicatenaria, por ejemplo en medio hídrico, en particular en medio reductor; y

(iii) llegado el caso, una o varias molécula(s) de unión (o enlazadora(s)) en particular un enlazador que une los dominios (i) y (ii) de una molécula quimérica A o B, comprendiendo dicho o dichos enlazador(es) o consistiendo en dichos enlazadores una cadena hidrógeno-carbonada (o esqueleto) que comprende preferentemente de 1 a 20 carbonos, estando los dominios (i) y (ii) de cada una de las moléculas quiméricas A y B unidos por una unión

covalente, por ejemplo por medio de grupo NH_2 , en particular un grupo NH_2 y un enlazador.

Salvo que se indique lo contrario, cada modo de realización particular presentado en la presente solicitud puede ser combinado independientemente con uno o varios otros modos de realización particulares, presentados en la solicitud.

El semianticuerpo de la invención es capaz de auto-ensamblarse, en particular en medio hídrico o acuoso, incluso en medio reductor, por medio del dominio (ii) de la molécula quimérica A y del de la molécula quimérica B, que se emparejan en una estructura bicatenaria.

El término "quimérico" designa aquí una molécula que asocia varios dominios, de al menos dos tipos diferentes por su función y/o por su naturaleza, siendo al menos dos de estos dominios de naturaleza distinta, siendo uno de naturaleza polipeptídica y siendo el otro de naturaleza nucleotídica.

El término "varios" tal como se utiliza en la presente solicitud significa dos o más de dos (por ejemplo tres, cuatro, cinco, seis o siete).

Por "semianticuerpos" se entiende aquí una molécula quimérica particular, que comprende o que consiste en:

- al menos un componente peptídico característico de un anticuerpo, que comprende o que consiste en un sitio de reconocimiento (o paratopo) de un epítipo, es decir capaz de unirse a un epítipo; y

- un componente nucleotídico (por ejemplo una estructura nucleotídica bicatenaria), que estabiliza la molécula quimérica.

Por "dominio variable" (o "DV") se entiende, en el sentido de la presente solicitud, un polipéptido que constituye una parte del sitio de reconocimiento de un epítipo, es decir un polipéptido implicado en el reconocimiento de un epítipo y en la interacción con dicho epítipo. En un modo de realización particular de la invención, dicho DV comprende o consiste en:

- el dominio variable V_H llevado por la cadena pesada de un anticuerpo (es decir un dominio variable codificado por un gen que comprende unos segmentos V (variables), J (de unión) y D (de diversidad)); o

- el dominio variable V_L llevado por la cadena ligera de un anticuerpo (es decir un dominio variable codificado por un gen que comprende unos segmentos V y J pero ningún segmento D); o

- una o varias porciones de V_H o V_L , en particular una o varias porciones de V_H o V_L capaces de unirse a dicho epítipo, conservando dicho DV la capacidad de V_H o V_L de interaccionar con dicho epítipo.

A título de ejemplo, en un modo de realización particular de la invención, por "porciones" de V_H o V_L se entiende una o varias (en particular dos, tres, incluso cuatro) regiones hipervariables, también denominadas regiones que determinan la complementariedad o CDRs (del inglés "complementary determining regions") y en particular todos los CDRs, de un dominio V_H o V_L . Dichas regiones CDRs son, llegado el caso, utilizadas en combinación con los fragmentos no variables (frameworks 1, 2, etc.) presentes en los dominios variables nativos de los anticuerpos.

Por dominio polipeptídico "característico de un DV" se entiende aquí un dominio polipeptídico que presenta las propiedades de un dominio DV, es decir un dominio polipeptídico implicado en el reconocimiento de un epítipo y en la unión a dicho epítipo. Dicho dominio polipeptídico puede ser de origen sintético o proceder o derivar de un DV de un anticuerpo dado (por ejemplo un anticuerpo humano o humanizado), en particular dicho dominio polipeptídico puede comprender o consistir en un DV de un anticuerpo dado (por ejemplo un anticuerpo humano o humanizado), o consistir en una secuencia obtenida por inserción, delección o sustitución de restos de aminoácidos, por ejemplo uno, dos, tres, cuatro o cinco restos, en la secuencia de un DV de un anticuerpo dado.

Según un modo de realización particular, dicho dominio polipeptídico derivado de un DV obtenido por sustitución de restos de aminoácidos, por ejemplo uno, dos, tres, cuatro o cinco restos, por un resto monomérico de un ANP o de un aminoácido beta (por ejemplo una beta-alanina). Esto permite en particular aumentar las posibilidades de reconocimiento de dicho DV.

Cuando las moléculas quiméricas A y B de un semianticuerpo están ensambladas (por medio de su dominio nucleotídico (ii) respectivo), el dominio polipeptídico (i) de A y el de B constituyen un sitio de reconocimiento de un epítipo, capaz de interactuar (preferentemente de manera específica) con un epítipo.

Un semianticuerpo de la invención puede ser obtenido recombinando unos fragmentos de diferentes anticuerpos y en particular de los dominios DV, o sus partes activas en el reconocimiento de un epítipo, procedentes o derivadas de diferentes anticuerpos, pudiendo dichos diferentes anticuerpos provenir o no de la misma especie de mamífero humano o no humano. En un modo de realización particular de la invención, un semianticuerpo comprende al menos

dos DV procedentes o derivados de anticuerpos dados (de un solo y mismo anticuerpo o de anticuerpos distintos), en particular un DV situado en la posición N-terminal de la molécula quimérica A y un DV situado en la posición N-terminal de la molécula quimérica B, que ensamblándose y estructurándose forman un sitio de reconocimiento de un epítipo.

En un modo de realización particular de la invención, el dominio (i) de la molécula quimérica A o B de un semianticuerpo de la invención comprende o consiste en el dominio variable V_H de un anticuerpo o una o varias porciones del dominio V_H de un anticuerpo y el dominio (i) de la otra molécula quimérica de dicho semianticuerpo (respectivamente B o A) comprende o consiste en el dominio variable V_L del mismo anticuerpo o de un anticuerpo distinto, o una o varias porciones de este dominio V_L (siendo dichas porciones de V_H o V_L tales como se definen en la solicitud).

En un modo de realización particular de la invención, los dominios (i) de las moléculas A y B de un semianticuerpo están humanizados.

El término "al menos x" elementos significa, en la presente solicitud, x elementos o más de x elementos, por ejemplo dos, tres o cuatro elementos.

Por "ácido nucleico fosfonato" o "ácido nucleico tioato" se entiende aquí unos ácidos nucleicos modificados, en los que unos fósforos están bloqueados (es decir esterificados por metanol) o sustituidos por azufre.

Un dominio polipeptídico (i) puede ser característico de un DV de una cadena pesada o de una cadena ligera de cualquier anticuerpo.

En un modo de realización particular de la invención, el dominio polipeptídico (i) de la molécula quimérica A y el de B son característicos de un DV de un mismo anticuerpo o, por el contrario, de anticuerpos distintos.

En un modo de realización particular de la invención, los dominios polipeptídicos (i) de A y de B comprenden al menos una cisteína que permite establecer un puente disulfuro entre el dominio polipeptídico (i) de A y el de B, y en particular al menos una cisteína que permite establecer un puente disulfuro entre el DV de A y el de B.

En un modo de realización particular de la invención, los dominios polipeptídicos (i) de A y de B son característicos de un DV de un anticuerpo que reconoce (preferentemente de manera específica) un epítipo de un antígeno intra y/o extracelular, más particularmente de un antígeno de superficie, por ejemplo de un antígeno expresado en la superficie de orgánulos o un antígeno de superficie celular o intracelular. Estos antígenos pueden ser en particular de origen celular, viral, bacteriano o tumoral.

En un modo de realización particular de la invención, los dominios polipeptídicos (i) de A y de B y en particular sus dominios polipeptídicos (i) N-terminales, son característicos de DV de uno o varios anticuerpos dirigidos contra (es decir que reconoce, preferentemente de manera específica) un antígeno presente en la superficie de células de mamífero, por ejemplo contra la proteína CD4, o contra un antígeno viral, en particular contra una proteína de un revestimiento viral, por ejemplo la proteína de revestimiento externo de un virus VIH (virus de la inmunodeficiencia humana) o contra un antígeno bacteriano, en particular contra una proteína de un revestimiento bacteriano, o contra una retrotranscriptasa, en particular una retrotranscriptasa de VIH-1 o VIH-2.

Un dominio polipeptídico (i) consiste preferentemente en de 10 a 300 restos de aminoácidos y más preferiblemente de 20 a 200 o de 40 a 200 restos de aminoácidos (estando incluidos los límites inferiores y superiores de estos intervalos de valores incluidos).

En un modo de realización particular de la invención, los dominios nucleotídicos (ii) tales como se han definido en la presente solicitud son unos ácidos nucleicos monocatenarios.

En un modo de realización particular de la invención, el dominio nucleotídico (ii) de la molécula quimérica A y de el de la molécula quimérica B de un semianticuerpo, que son unas estructuras monocatenarias, se emparejan en medio híbrido y en particular en medio reductor, en una estructura bicatenario.

En un modo de realización particular de la invención, los dominios nucleotídicos (ii) de A y B se seleccionan entre un polinucleótido, un ANP o un LNP y son capaces de formar una estructura estable bicatenario, en particular una hélice alfa.

En un modo de realización particular de la invención, las secuencias de los dominios nucleotídicos (ii) de las dos moléculas quiméricas A y B son complementarios y antiparalelos, y en particular son capaces de hibridarse, preferentemente sobre toda su longitud. La hibridación de estos dos dominios nucleotídicos permite reconstituir una molécula de semianticuerpo, en particular en medio hídrico (incluso en medio reductor). Debido a esta hibridación, los dominios peptídicos (i) de las moléculas A y B de un semianticuerpo así auto-ensamblado (estando dichos dominios peptídicos, llegado el caso, unidos el uno al otro por un enlace lábil en medio reductor, por ejemplo un

puente disulfuro) se encuentran próximos el uno del otro en el espacio, lo que permite estructurar y estabilizar el sitio de reconocimiento del epítipo, en particular en medio reductor. Así, incluso en medio reductor, el sitio de unión al antígeno es funcional en el semianticuerpo de la invención.

- 5 En un modo de realización particular de la invención, el tamaño del dominio (ii) varía de 3 a 100 nucleótidos y más preferiblemente de 5 a 60 nucleótidos (estando incluidos los límites inferiores y superiores de estos intervalos de valores).

En un modo de realización particular de la invención,

- 10 - el dominio nucleotídico (ii) de la molécula química A o B de un semianticuerpo de la invención comprende o consiste en la secuencia siguiente: ATGGTAGAG; y

- 15 - el dominio nucleotídico (ii) de la otra molécula química del semianticuerpo de la invención, respectivamente B o A, comprende o consiste en la secuencia siguiente: CTCTACCAT.

En un modo de realización particular de la invención,

- 20 - el dominio nucleotídico (ii) de la molécula química A o B de un semianticuerpo de la invención comprende o consiste en la secuencia siguiente: CCAGCT; y

- el dominio nucleotídico (ii) de la otra molécula química del semianticuerpo de la invención, respectivamente B o A, comprende o consiste en la secuencia siguiente: AGCTGG.

- 25 En un modo de realización particular de la invención, un "enlazador" en el sentido de la presente invención, es un espaciador, es decir que permite alejar en el espacio los dos dominios que une, de manera que estos dos dominios puedan ejercer su(s) función(es) de manera óptima.

- 30 En un modo de realización particular de la invención, un "enlazador" en el sentido de la presente invención comprende preferentemente de 1 a 20 carbonos y comprende o consiste en uno o varios elemento(s) (por ejemplo un elemento) seleccionado(s) entre un péptido (o un polipéptido), un polinucleótido en particular un polinucleótido tal como se ha definido en la presente solicitud (o un análogo, en particular tal como se ha definido en la presente solicitud), una cadena policarbonada, etilendiamina, polilisina, beta-alanina, y un azúcar.

- 35 En un modo de realización particular de la invención, dicho enlazador es un péptido o un polipéptido que comprende o que consiste en, por ejemplo, una o varias lisinas. Este enlazador se denominará en la presente solicitud "enlazador peptídico".

- 40 En un modo de realización particular de la invención, un enlazador comprende o consiste en un ácido nucleico, en particular un ADN o un ARN y consiste, por ejemplo, en una secuencia de 5 a 50 nucleótidos (estando incluidos los límites inferiores y superiores de este intervalo de valores). Este enlazador se denominará en la presente solicitud "enlazador nucleico".

- 45 En un modo de realización particular de la invención, este enlazador que une, llegado el caso, los dominios (i) y (ii) de una molécula química A y uniendo el enlazador, llegado el caso, los dominios (i) y (ii) de una molécula química B son unos enlazadores peptídicos.

- 50 En un modo de realización particular de la invención, los dominios (i) y (ii) están unidos por medio de un enlazador (por ejemplo un enlazador peptídico) en las dos moléculas químicas A y B de un semianticuerpo, siendo el enlazador presente en A preferentemente del mismo tamaño que el enlazador presente en B. Por ejemplo, el mismo enlazador puede unir los dominios (i) y (ii) en A y en B.

- 55 En un modo de realización particular de la invención, un "enlazador" en el sentido de la presente invención, por ejemplo un enlazador peptídico o nucleico, comprende una unión lábil en medio reductor (por ejemplo un puente disulfuro) o comprende en uno de sus extremos, uno o varios aminoácidos o nucleótidos que permiten formar, con una de las dos moléculas que une, tal unión.

- 60 En un modo de realización particular de la invención, una "unión lábil en medio reductor" significa una unión lábil en medio reductor y persistente en medio no reductor, pudiendo dicha unión ser covalente (por ejemplo un puente disulfuro) o no covalente.

- 65 Según un modo de realización particular de la invención, en la molécula química A, el extremo C-terminal del dominio polipeptídico (i) (por ejemplo un dominio V_H o V_L o una porción de un dominio V_H o V_L) está unido de manera covalente al extremo 3' de un ácido nucleico (ii) (por ejemplo un LNA, un ácido nucleico metilfosfonato o un ácido nucleico tioato) o al extremo C-termina de un ANP, por ejemplo el intermedio del grupo NH_2 de la cadena lateral de una lisina unida al extremo C termina de dicho ANP por una unión peptídica.

Alternativa o acumulativamente, según un modo de realización particular en la molécula quimérica B, el extremo C-terminal del dominio polipeptídico (i) (por ejemplo un dominio V_H o V_L o una porción de un dominio V_H o V_L) está unido de manera covalente al extremo 5' del ácido nucleico (ii) (por ejemplo un LNA, un ácido nucleico metilfosfonato o un ácido nucleico tioato) o al extremo N-terminal de un ANP, por ejemplo el intermedio de una unión peptídica o amida con uno de los grupos NH_2 de una lisina, estando dicha lisina unida, por su grupo $COOH$, al extremo N-terminal de dicho ANP.

En un modo de realización particular de la invención, la molécula quimérica A y/o la molécula quimérica B comprenden además un dominio marcador y/o un dominio biológicamente activo, estando dicho dominio unido bien al extremo libre del dominio nucleotídico (ii) de la molécula quimérica A o B, o bien al extremo libre de un enlazador unido al dominio nucleotídico (ii) de la molécula quimérica A o B. La unión de dicho dominio marcador o dicho enlazador se efectúa preferentemente por medio de una unión lábil en medio reductor, por ejemplo un puente disulfuro, o por el contrario, por medio de una unión persistente en medio reductor, por ejemplo por medio de una unión establecida con un ácido maleimida.

En un modo de realización particular de la invención, este enlazador tiene una longitud suficiente para pasar a través de una membrana (por ejemplo una membrana plasmática o una membrana intracelular).

En un modo de realización particular de la invención, este enlazador es un enlazador nucleico.

Así, en este modo de realización particular, el semianticuerpo de la invención permite suministrar, en una célula diana (en particular una célula de mamífero humano o no humano), un dominio biológicamente activo, que permite inhibir (completa o parcialmente) la expresión de genes en dicha célula diana, independientemente de los mecanismos funcionales intrínsecos a dicha célula. En el modo de realización particular que utiliza una unión lábil en medio reductor, el dominio marcador y/o el dominio biológicamente activo es liberado en el interior de la célula después de la reducción de los puentes disulfuro.

En un modo de realización particular, el dominio marcador y/o el dominio biológicamente activo comprende o consiste en un polinucleótido o un análogo que comprende o que consiste en una secuencia marcadora (o secuencia TAG y/o una secuencia biológicamente activa que permite bloquear (completa o parcialmente) la expresión de genes diana (en particular a nivel de la replicación, de la transcripción, o de la traducción), en particular en el interior de una célula, por ejemplo un polinucleótido o un análogo seleccionado entre los elementos siguientes:

- un ácido nucleico, en particular un ácido nucleico antisentido o un ácido nucleico que tiene una actividad endonucleasa por ejemplo una actividad ribonucleasa (RNAsa) o desoxirribonucleasa (DNAsa);

- un ANP, en particular un ANP antisentido o un ANP que tiene una actividad endonucleasa (ANPzima), por ejemplo una actividad ribo- o desoxiribo-nucleasa,

- un LNA, un ácido nucleico metilfosfonato, un ácido nucleico metilsulfonato, un ácido nucleico o desoxinucleico modificado, una ADNzima, una ARNzima o una ANPzima, un micro ARN (miRNA), una secuencia mixta ANP/ácido nucleico o ANP/péptido, un dímero DNA/ANPzima; y

- una combinación de al menos dos de estos elementos.

Alternativa o acumulativamente, en un modo de realización particular, el dominio marcador y/o el dominio biológicamente activo comprende o consiste en una cadena de varios (al menos dos) restos de aminoácidos sucesivos, que forma la estructura de un péptido o de un polipéptido. A título de ejemplo, dicho dominio marcador y/o dicho dominio biológicamente activo puede comprender al menos 4 o 6 restos de aminoácidos, por ejemplo de 4 a 200, de 6 a 100 o de 6 a 50 restos de aminoácidos.

Un péptido designa, en la presente solicitud, una cadena de 2 a 20 restos sucesivos (en particular 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 restos), en particular una cadena de 5 a 10, de 10 a 15 o de 15 a 20 restos de aminoácidos sucesivos.

En el ámbito de la invención, un polipéptido, que designa también una proteína o un fragmento de una proteína, es una cadena de más de 20 (al menos 21) restos sucesivos, en particular una cadena de 21 a 1000 restos sucesivos, preferentemente de 21 a 500, 21 a 250 o 21 a 150 restos sucesivos, y más preferiblemente de 21 a 50 o 21 a 100 restos de aminoácidos sucesivos.

Acumulativa o alternativamente a la presencia del dominio marcador y/o del dominio biológicamente activo en la molécula quimérica A y/o B, según un modo de realización particular de la invención, la molécula quimérica A y/o la molécula quimérica B comprenden además un elemento lipófilo (o hidrófobo), en particular una secuencia, un grupo químico o un compuesto químico lipófilo, que comprende preferentemente uno o varios grupos y/o compuestos aromáticos, por ejemplo uno o varios restos triptófano, estando dicho elemento lipófilo preferentemente situado en la

posición del extremo libre de la molécula quimérica A o B. Este elemento lipófilo está, llegado el caso, unido a la molécula quimérica A o B por medio de una unión lábil en medio reductor, por ejemplo un puente disulfuro.

Según un modo de realización particular de la invención, dicho o dichos o uno de dichos elementos lipófilos pueden ser sustituidos con un dominio beta-peptídico, es decir un dominio que consiste en o que comprende uno o varios (por ejemplo 2, 3, 4, 5 o 6) restos de aminoácidos beta, por ejemplo de 1 a 5 restos de aminoácidos beta. Dicho dominio beta-peptídico puede, por ejemplo, comprender o consistir en una cadena de 2, 3, 4, 5 o 6 restos de aminoácidos beta sucesivos. A título de ejemplo de aminoácido beta, se citará la beta-alanina.

Según un modo de realización particular, un semianticuerpo de la invención es tal que:

* la primera molécula quimérica, A o B, comprende o consiste en:

- un dominio polipeptídico (i) tal como se ha definido en la presente solicitud, y los dominios siguientes, posicionados sucesivamente en el orden siguiente, a partir del extremo C-terminal del dominio polipeptídico (i):

- llegado el caso, un enlazador (por ejemplo un enlazador peptídico) tal como se define en la presente solicitud,

- un dominio nucleotídico (ii) tal como se define en la presente solicitud,

- llegado el caso, un enlazador (por ejemplo un enlazador nucleico) unido, preferentemente, por medio de una unión lábil en medio reductor, por ejemplo un puente disulfuro o por medio de una unión persistente en medio reductor, por ejemplo por medio de una unión establecida con un ácido maleimida, a

- un dominio marcador o un dominio biológicamente activo tal como se define en la presente solicitud, y

- llegado el caso, un elemento lipófilo tal como se define en la presente solicitud, estando dicho elemento lipófilo, llegado el caso, unido al dominio marcador o al dominio biológicamente activo por medio de una unión lábil en medio reductor, por ejemplo un puente disulfuro o por medio de un enlazador (por ejemplo un enlazador peptídico o nucleico) tal como se define en la presente solicitud; y

* la segunda molécula quimérica, respectivamente B o A, comprende o consiste en:

- un dominio polipeptídico (i) tal como se define en la presente solicitud, siendo este dominio y el dominio polipeptídico (i) de la primera molécula quimérica, preferentemente característico de DV de un mismo anticuerpo, siendo uno de estos dominios característico de un DV de la cadena ligera de un anticuerpo dado y siendo el otro característico de un DV de la cadena pesada del mismo anticuerpo,

y los dominios siguientes, posicionados sucesivamente en el orden siguiente, a partir del extremo C-terminal del dominio polipeptídico (i):

- llegado el caso, un enlazador (por ejemplo un enlazador peptídico) tal como se define en la presente solicitud, y

- un dominio nucleotídico (ii) tal como se define en la presente solicitud.

En un modo de realización particular de la invención, por "los dominios siguientes, posicionados sucesivamente en el orden siguiente", se entiende "dominios siguientes, unidos sucesivamente en el orden siguiente".

En un modo de realización particular de la invención, un semianticuerpo de la invención, denominado HAC_1, es tal que:

* la primera molécula quimérica, A o B, comprende o consiste en:

- un dominio polipeptídico (i) tal como se define en la presente solicitud, y los dominios siguientes, posicionados sucesivamente en el orden siguiente, a partir del extremo C-terminal del dominio polipeptídico (i):

- llegado el caso, un enlazador (por ejemplo un enlazador peptídico) tal como se define en la presente solicitud,

- un dominio nucleotídico (ii) tal como se define en la presente solicitud, denominado S1,

- llegado el caso, un enlazador (por ejemplo un enlazador nucleico) tal como se define en la presente solicitud, unido, preferentemente mediante un doble enlace lábil en medio reductor, por ejemplo un puente disulfuro, a

- llegado el caso, un dominio marcador o un dominio biológicamente activo tal como se define en la presente solicitud, unido, llegado el caso, por ejemplo, por medio de un enlace covalente, a

- llegado el caso, un enlazador (por ejemplo un enlazador nucleico o peptídico) tal como se define en la presente solicitud,

5 - un segundo dominio nucleotídico, denominado S3, preferentemente unido por medio de un enlace lábil, que comprende o consiste en un polinucleótido, en particular un ADN o un ARN, o un análogo de un polinucleótido, en particular un ANP, un LNA, un ácido nucleico metilfosfonato, o un ácido nucleico tioato, y que es capaz de emparejarse en una estructura bicatenaria con un dominio nucleotídico complementario denominado S4, por ejemplo en medio hídrico, en particular en medio reductor; y

10 - llegado el caso, un enlazador (por ejemplo un enlazador peptídico) tal como se define en la presente solicitud,

- estando el dominio S3 o dicho enlazador unido al extremo C-terminal de un segundo dominio polipeptídico, denominado DV2a, que es característico de un DV de una cadena pesada o de una cadena ligera de un anticuerpo, siendo DV2a y el dominio polipeptídico (i) de esta primera molécula quimérica (A o B) preferentemente
15 característicos de DV anticuerpos distintos, y

- llegado el caso, un elemento lipófilo tal como se define en la presente solicitud, estando dicho elemento lipófilo unido a DV2a por medio de un enlace lábil en medio reductor, por ejemplo un puente disulfuro o por medio de un enlazador (por ejemplo un enlazador nucleico) tal como se define en la presente solicitud, comprendiendo dicho
20 enlazador una unión lábil en medio reductor, por ejemplo un puente disulfuro o estando unido a DV2a por medio de un enlace lábil en medio reductor, por ejemplo un puente disulfuro, y

* la segunda molécula quimérica, respectivamente B o A, comprende o consiste en:

25 - un dominio polipeptídico (i) tal como se define en la presente solicitud, siendo este dominio y el dominio polipeptídico (i) de la primera molécula quimérica (de HAC_1) preferentemente característicos de DV de un mismo anticuerpo, siendo uno de estos dominios característico de un DV de la cadena ligera de un anticuerpo dado y siendo el otro característico de un DV de la cadena pesada del mismo anticuerpo,

30 y los dominios siguientes, posicionados sucesivamente en el orden siguiente, a partir del extremo C-terminal del dominio polipeptídico (i):

- llegado el caso, un enlazador (por ejemplo un enlazador peptídico) tal como se define en la presente solicitud, y

35 - un dominio nucleotídico (ii) tal como se define en la presente solicitud, denominado S2, capaz de emparejarse en una estructura bicatenaria con S1 en medio hídrico, en particular en medio reductor.

En un modo de realización particular, un semianticuerpo de la invención, denominado HAC_2 es tal que:

40 * la primera molécula quimérica, A o B, comprende o consiste en:

- un dominio polipeptídico (i) tal como se define en la presente solicitud, y los dominios siguientes, posicionados sucesivamente en el orden siguiente, a partir del extremo C-terminal del dominio polipeptídico (i):

45 - llegado el caso, un enlazador (por ejemplo un enlazador peptídico) tal como se define en la presente solicitud,

- un dominio nucleotídico (ii) tal como se define en la presente solicitud, denominado S5,

50 - llegado el caso, un enlazador (por ejemplo un enlazador nucleico o peptídico) tal como se define en la presente solicitud, comprendiendo dicho enlazador, llegado el caso, una unión lábil en medio reductor (por ejemplo un puente disulfuro), o estando unido por medio de una unión lábil en medio reductor (por ejemplo un puente disulfuro) a:

55 - un segundo dominio nucleotídico, denominado S4, preferentemente unido por medio de un enlace lábil, que comprende o consiste en un polinucleótido, en particular un ADN o un ARN, o un análogo de un polinucleótido, en particular un ANP, un LNA, un ácido nucleico metilfosfonato, o un ácido nucleico tioato, y que es capaz de emparejarse en una estructura bicatenaria con un dominio nucleotídico complementario denominado S3, por ejemplo en medio hídrico, en particular en medio reductor; y

60 - llegado el caso, un enlazador (por ejemplo un enlazador peptídico) tal como se define en la presente solicitud,

- estando el dominio S4 o dicho enlazador unido al extremo C-terminal de un segundo dominio polipeptídico, denominado DV2b, que es característico de un DV de una cadena pesada o de una cadena ligera de un anticuerpo, siendo DV2b y el dominio polipeptídico (i) de esta primera molécula quimérica (A o B) característicos de DV de anticuerpos distintos, y

65 - llegado el caso, un elemento lipófilo tal como se define en la presente solicitud, estando dicho elemento lipófilo

unido a DV2b por medio de un enlace lábil en medio reductor, por ejemplo un puente disulfuro o por medio de un enlazador (por ejemplo un enlazador nucleico) tal como se define en la presente solicitud, comprendiendo dicho enlazador una unión lábil en medio reductor (por ejemplo un puente disulfuro) o estando unido a DV2a por medio de un enlace lábil en medio reductor (por ejemplo un puente disulfuro), y

* la segunda molécula quimérica, respectivamente B o A, comprende o consiste en:

- un dominio polipeptídico (i) tal como se define en la presente solicitud, siendo este dominio y el dominio polipeptídico (i) de la primera molécula quimérica (de HAC_2) preferentemente característicos de DV de un mismo anticuerpo, siendo uno de estos dominios característico de un DV de la cadena ligera de un anticuerpo dado y siendo el otro característico de un DV de la cadena pesada del mismo anticuerpo,

y los dominios siguientes, posicionados sucesivamente en el orden siguiente, a partir del extremo C-terminal del dominio polipeptídico (i):

- llegado el caso, un enlazador (por ejemplo un enlazador peptídico) tal como se define en la presente solicitud, y

- un dominio nucleotídico (ii) tal como se define en la presente solicitud, denominado S6, capaz de emparejarse en una estructura bicatenaria con S5 en medio hídrico, en particular en medio reductor.

- según un modo de realización particular, en HAC_1 y en HAC_2,

- un enlace lábil en medio reductor (por ejemplo un puente disulfuro) está presente entre el dominio (ii) y el dominio S3 (o S4); pero

- ningún enlace lábil en medio reductor está presente entre los dominios S3 (o S4) y DV2a (o DV2b).

Se puede utilizar HAC_2 en conjunción con HAC_1, por ejemplo administrado a un mismo hospedante, en particular a un mamífero humano o no humano, siendo HAC_1 y HAC_2 administrados separadamente (estando HAC_1 y HAC_2 presentes en composiciones, vesículas o partículas virales de la invención distintas, simultánea o separadamente en el tiempo).

Diferentes tipos de HAC_1 y/o diferentes tipos de HAC_2 pueden ser administrados a un mismo hospedante, en particular a un mamífero humano o no humano.

Los HAC_1 y HAC_2 administrados (simultánea o separadamente en el tiempo) a un mismo hospedante (en particular un mamífero humano o no humano), pueden también ser administrados en forma injertada por medio de unión lábil en medio reductor en nanopartículas no tóxicas, por ejemplo nanopartículas de diamante (véase en particular el ejemplo de la figura 10). HAC_1 y HAC_2 pueden, en efecto, estar unidos (o injertados) en una misma nanopartícula o sobre dos nanopartículas distintas. Este injerto se realiza por medio de uno o varios enlace(s) lábil(es) en medio reductor, por ejemplo uno o varios enlaces disulfuro, a partir del extremo C-terminal de la molécula quimérica (A o B) que comprende el dominio DV2a o DV2b, y en particular (cuando DV2a o DV2b se encuentran en la posición C-terminal en HAC_1 o HAC_2) a partir del extremo N-terminal de la parte DV2a o DV2b de HAC_1 o de HAC_2, llegado el caso por medio de un enlazador.

Así, los sistemas S3-DV2a y S4/DV2b pueden ser proporcionados (a través de HAC_1 y HAC_2 respectivamente) en una misma célula cuando HAC_1 y HAC_2 o la o las nanopartículas en las que HAC_1 y/o HAC_2 están injertadas, están internalizadas y que las uniones lábiles (por ejemplo los puentes disulfuro) están escindidas.

Los semianticuerpos HAC_1 y HAC_2 injertados en una misma nanopartícula pueden ser idénticos o diferentes, y en particular diferir por sus dominios S3/DV2a (o S4-DV2b) y/o por sus dominios (i)/(ii). Así, los HAC_1 y/o HAC_2 injertados en una misma nanopartícula pueden comprender:

- un solo tipo de dominios S3/DV2a (o S4-DV2b) y un solo tipo de dominios (i)/(ii);

- diferentes tipos de dominios S3/DV2a (o S4-DV2b) y un solo tipo de dominios (i)/(ii);

- un solo tipo de dominios S3/DV2a (o S4-DV2b) y diferentes tipos de dominios (i)/(ii); o

- diferentes tipos de dominios S3/DV2a (o S4-DV2b) y diferentes tipos de dominios (i)/(ii).

Unos dominios x/y son denominados "de diferentes tipos" en el sentido de la presente solicitud, cuando difieren en su dominio x y/o en su dominio y. Según un modo de realización, al mismo tiempo x e y difieren entre dos dominios x/y "de diferentes tipos".

Una nanopartícula en la que se injertan HAC_1 y/o HAC_2 que comprende diferentes tipos de dominios (i)/(ii)

permite determinar unos epítomos diferentes y permitir por lo tanto generalmente determinar diferentes tipos de células. Sin embargo, una nanopartícula en la que se injertan HAC_1 y/o HAC_2 que comprende un solo tipo de dominios (i)/(ii) permite determinar un solo tipo de epítomo y por lo tanto generalmente un solo tipo de células.

5 En un modo de realización particular, las nanopartículas utilizadas tienen un tamaño medio comprendido entre 1 y 100 nanómetros, preferentemente entre 1 y 50 nanómetros. Por ejemplo, su tamaño medio puede ser de 10 nanómetros o inferior a 10 nanómetros.

10 Así, en las células del hospedante que ha integrado al mismo tiempo HAC_1 y HAC_2, podrá formarse un tercer tipo de semianticuerpo, constituido de una parte de HAC_1 y de una parte de HAC_2.

A título de ejemplo, en un modo de realización particular, este semianticuerpo, denominado HAC_3, es tal que:

* la primera molécula quimérica, A o B, comprende o consiste en:

15 - el dominio polipeptídico DV2a, y los dominios siguientes, posicionados sucesivamente en el orden siguiente, a partir del extremo C-terminal del dominio DV2a:

20 - llegado el caso, un enlazador (por ejemplo un enlazador peptídico) tal como se define en la presente solicitud,

- el dominio nucleotídico S3,

25 - llegado el caso, un enlazador (por ejemplo un enlazador nucleico o peptídico) tal como se define en la presente solicitud, y

- el dominio marcador o el dominio biológicamente activo presente en HAC_1; y

* la segunda molécula quimérica, respectivamente B o A, comprende o consiste en:

30 - el dominio polipeptídico DV2b, y los dominios siguientes, posicionados sucesivamente en el orden siguiente, a partir del extremo C-terminal del dominio DV2b:

- llegado el caso, un enlazador (por ejemplo un enlazador peptídico) tal como se define en la presente solicitud, y

35 - el dominio nucleotídico S4.

40 En un modo de realización particular de la invención, uno de los dominios DV2a y DV2b tales como se definen en la presente solicitud, es característico de un DV de la cadena ligera de un anticuerpo dado y el otro de estos dominios es característico de un DV de la cadena pesada del mismo anticuerpo.

45 Cuando se utilizan unos semianticuerpos HAC_1 y unos semianticuerpos HAC_2 y en particular cuando están presentes en una misma partícula (en particular una misma nanopartícula), puede ser ventajoso proteger (temporalmente) las partes S3 y S4, por ejemplo hibridando estos dominios con un ARN. Esto permite impedir (temporalmente) una eventual asociación entre S3 y S4, de tal manera que estos dos dominios no puedan asociarse antes de alcanzar la célula diana (en particular esto permite evitar una asociación prematura de S3 y S4 cuando HAC_1 y HAC_2 están injertados en una misma partícula) los ARN son después deshibridados o digeridos, lo que hace entonces posible una asociación entre S3 y S4.

50 Cuando se desea determinar un antígeno de interés que es soluble, y en particular que circula en un hospedante (es decir que no está expresado en la superficie de una célula), puede ser interesante utilizar un (o varios) semianticuerpo HAC_1 en conjunto con un (o varios) semianticuerpo HAC_2, y concebir estos semianticuerpos de tal manera que el paratopo de HAC_1 y el paratopo HAC_2 (es decir el sitio de reconocimiento presente en su extremo N-terminal) sean específicos del mismo antígeno soluble o, más específicamente, de un mismo epítomo de este antígeno soluble.

55 Según un modo de realización particular, un semianticuerpo HAC_1 y un semianticuerpo HAC_2 se asocian con el fin de reconstituir un anticuerpo completo (que presenta dos sitios de reconocimiento de un epítomo). Tales anticuerpos reconstituidos pueden ser utilizados en particular con fines terapéuticos y/o de diagnósticos y en particular cuando el o los antígenos de interés son solubles. A título de ejemplo, se pueden utilizar unos HAC_1 y HAC_2 cuyos paratopos son específicos del mismo antígeno soluble o, más específicamente, de un mismo epítomo de este antígeno soluble.

La invención tiene también por objeto una molécula quimérica A o B, tal como se define en la presente solicitud.

65 La invención tiene también por objeto una vesícula, en particular un liposoma, y más particularmente un liposoma constituido de membrana viral, por ejemplo de membrana de partículas del virus del VIH-1 o VIH-2, o una partícula

viral, comprendiendo dicha vesícula o dicha partícula viral uno o varios semianticuerpos tales como se definen en la presente solicitud, y/o una o varias moléculas quiméricas A y/o B tales como se definen en la presente solicitud.

5 La invención tiene también por objeto unas nanopartículas (en particular unas nanopartículas tales como se definen en la presente solicitud), en las que uno o varios semianticuerpos tales como se definen en la presente solicitud, y en particular uno o varios semianticuerpos HAC_1 y/o uno o varios semianticuerpos HAC_2 y/o uno o varios semianticuerpos HAC_4 (véase a continuación) están unidos (o injertados) por medio de uniones lábiles en medio reductor, por ejemplo un puente disulfuro (véase la figura 11).

10 A título de ejemplo, en un modo de realización particular, la vesícula o dicha partícula viral, la partícula o la nanopartícula tal como se define en la presente solicitud comprende un semianticuerpo HAC_1 o un semianticuerpo HAC_2 tales como se han definido anteriormente, y en particular:

* un semianticuerpo HAC_1, en el que:

15 - el dominio polipeptídico (i) de las moléculas quiméricas A y B es preferentemente característico de un mismo anticuerpo dirigido contra un primer antígeno presente en la superficie de células de mamífero o dirigido contra un antígeno viral, por ejemplo contra la proteína de recubrimiento externo de un virus de VIH; y

20 - el dominio polipeptídico DV2a es preferentemente característico de un anticuerpo anti retro-transcriptasa, en particular anti-retrotranscriptasa de VIH-1 o VIH-2; o

* un semianticuerpo HAC_2, en el que

25 - el dominio polipeptídico (i) de las moléculas quiméricas A y B es preferentemente característico de un DV de un mismo anticuerpo dirigido contra un segundo antígeno presente en la superficie de células de mamífero, por ejemplo contra la proteína CD4, o dirigido contra un antígeno viral; y

30 - el dominio polipeptídico DV2b es preferentemente característico de un DV del mismo anticuerpo que el DV de dominio DV2a, siendo DV2a o DV2b característico de un DV de la cadena ligera de un anticuerpo dado, por ejemplo un anticuerpo anti retrotranscriptasa y siendo el otro dominio, respectivamente DV2b o DV2a, característico de un DV de una cadena pesada del mismo anticuerpo.

35 En un modo de realización particular de la invención, se utilizan dos semianticuerpos, por ejemplo un semianticuerpo HAC_1 y un semianticuerpo HAC_2 tales como se definen en la presente solicitud. Uno de estos semianticuerpos, por ejemplo HAC_2, puede estar presente en una forma incorporada en una vesícula, una partícula viral o fijada sobre una o varias partículas o nanopartículas tales como se definen en la presente solicitud, estando el otro semianticuerpo, por ejemplo HAC_1, presente en solución. HAC_1 y HAC_2 pueden ser en particular dirigidos respectivamente contra un epítipo de un VIH-1 o VIH-2 y un epítipo expresado en la superficie de células de mamíferos en particular de las células T, por ejemplo un epítipo de la proteína CD4 de las células CD4⁺.

La invención tiene también como objetivo una composición, en particular una composición farmacéutica o terapéutica, inmunológica o vacínica, que comprende, que consiste en o que consiste esencialmente en:

45 - uno o varios semianticuerpos tales como se definen en la presente solicitud y/o una o varias moléculas quiméricas A y/o B tales como se definen en la presente solicitud, o una o varias vesículas o partículas virales de la invención, o una o varias partículas o nanopartículas tales como se definen en la presente solicitud, y

50 - llegado el caso, un soporte, un diluyente y/o un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La expresión "consiste esencialmente en" significa que además de los elementos expresados enumerados, otros ingredientes o moléculas menores pueden estar presentes en la composición de la invención, sin afectar por ello a la actividad de los elementos expresamente enumerados.

55 Una sustancia o una combinación de sustancias se denominan "farmacéuticamente aceptable" cuando es apropiada para una administración a un hospedante con fines terapéuticos o profilácticos. Por lo tanto, es preferiblemente no tóxica para el hospedante al que se administra.

60 Un "hospedante" en el sentido de la presente invención designa en particular un hospedante humano (o paciente) o un animal no humano, por ejemplo un mamífero humano o no humano.

En un modo de realización particular, la composición de la invención comprende, consiste en o consiste esencialmente en el semianticuerpo HAC_1 y/o el semianticuerpo HAC_2 tales como se definen en la presente solicitud. La invención tiene también por objeto un kit (o equipo) que comprende:

65 - uno o varios elementos seleccionados entre: un semianticuerpo de la invención, una molécula quimérica A o B de

la invención, una vesícula de la invención, una partícula viral de la invención, una partícula o nanopartícula tal como se define en la presente solicitud y una composición de la invención,

- y llegado el caso, un prospecto,

En un modo de realización particular, el kit de la invención comprende el semianticuerpo HAC_1 y/o el semianticuerpo HAC_2 tales como se definen en la presente solicitud.

La invención tiene también por objeto uno o varios elementos seleccionados entre: un semianticuerpo de la invención, una molécula quimérica A o B de la invención, una vesícula de la invención, o una partícula o nanopartícula tal como se define en la presente solicitud, una partícula viral de la invención, una composición de la invención o un kit de la invención, para su utilización como medicamento. Dichos elementos pueden ser utilizados en particular en un hospedante, por ejemplo un ser humano o un mamífero no humano, para la prevención o el tratamiento de una enfermedad genética, por ejemplo una miopatía y/o una enfermedad infecciosa, en particular una enfermedad viral y más particularmente una infección por un lentivirus, por ejemplo VIH-1 o VIH-2, y/o de una infección bacteriana, por ejemplo una infección por una bacteria resistente a antibióticos y/o para la prevención o el tratamiento de un cáncer.

La invención tiene también por objeto la utilización de uno o varios elementos seleccionados entre los indicados anteriormente, para la fabricación de un medicamento destinado a prevenir o tratar las enfermedades o infecciones antes mencionadas, en un hospedante, por ejemplo un ser humano o un mamífero no humano.

La presente solicitud describe también un método para prevenir o tratar las enfermedades o infecciones antes mencionadas en un hospedante que lo necesita, comprendiendo dicho método o consistiendo en una etapa de administración a dicho hospedante de uno o varios elementos seleccionados entre los indicados antes.

Con el fin de aumentar los efectos beneficiosos de estos elementos, se puede considerar proceder a una administración en forma de varias administraciones sucesivas, repetidas a una o varias ocasiones, después de un intervalo de tiempo particular.

La presente solicitud describe también la utilización de uno o varios elementos seleccionados entre los indicados antes, para marcar y/o amplificar los marcados de proteínas, por ejemplo en la superficie de una célula *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo*.

La presente solicitud describe también un procedimiento de síntesis de un semianticuerpo tal como se define en la presente solicitud. Este procedimiento puede comprender una etapa en la que el injerto o la unión, en el extremo C-terminal del dominio polipeptídico (i) (por ejemplo el extremo C-terminal de un dominio V_H o V_L o de una porción de un dominio V_H o V_L), de un dominio nucleotídico (ii), por ejemplo un ANP modificado en N- o en C-terminal por una lisina, o un ácido nucleico modificado en 5' o en 3' por un NH₂, se realiza por la acción del ácido 2 mercapto-etanosulfónico o del ácido 3-mercaptopropiónico, en una cisteína de dicho dominio polipeptídico (i). La lisina o el ácido nucleico modificado pueden ser sustituidos por una beta-alanina, una etil-di-amina, un NH-CH(CONH₂)-(CH₂)₄NH₂, o un NH₂(CH₂)₄(NH₂)CH(COOH).

Alternativa o acumulativamente, el procedimiento de síntesis de un semianticuerpo tal como se describe en la presente solicitud puede comprender una etapa en la que los dominios polipeptídicos (i) de dicho semianticuerpo, que son unos DV de anticuerpos (por ejemplo los dominios V_H o V_L de anticuerpos o que comprenden una o varias parte(s) de un dominio V_H o V_L de anticuerpo), son obtenidos o bien por digestión de uno o varios anticuerpos por una enzima, por ejemplo la pepsina, la papaína, la tripsina, o bien por la expresión de polinucleótidos que codifican estos DV, en unos sistemas tales como bacterias, levaduras, células de insectos, células de mamíferos, o por síntesis *in vitro*, después por purificación.

Alternativa o acumulativamente, para clonar los dominios polipeptídicos, por ejemplo los DV tales como se definen en la presente solicitud, estos dominios (o su secuencia nucleica a clonar), son fusionados en su extremo C-terminal (respectivamente 3' de la secuencia a clonar) con una secuencia peptídica LPXTAAAA (leucina - prolina - X- treonina - (Alanina)₄, en la que X es un aminoácido cualquiera) respectivamente la secuencia nucleica que codifica para la LPXTAAAA. El dominio nucleotídico a injertar, en particular el ácido nucleico o el ANP a injertar, puede estar por su parte funcionalizado en uno de sus extremos por una poli-G (poli-glicina), eventualmente por medio de una lisina, permaneciendo libre el extremo N-terminal de la poli-G. Un dominio polipeptídico (i) (por ejemplo un DV tal como se define en la presente solicitud) y un dominio nucleotídico (ii) (por ejemplo un ácido nucleico (o polinucleótido) o un ANP, tales como se definen en la presente solicitud), se fusionan entonces bajo la acción de una sortasa A.

La secuencia LPXTAAAA puede ser ventajosamente sustituida por la secuencia LPXTG (leucina - prolina - X - treonina - glicina, en la que X es un aminoácido cualquiera; SEC ID nº 7).

Alternativa o acumulativamente, la fusión entre el DV y el ANP se puede obtener por catálisis di-metil-SiCl₂¹-dimetilediclorosilano, que permite el injerto de una función amina en el extremo C-terminal de un péptido.

La presente solicitud describe también la capacidad de amplificación de la secuencia por PCR a nivel de la etiqueta de una quimera una vez que ha reconocido un AG fijado en un soporte que permite identificar y cuantificar el AG incluso presente en un solo ejemplar.

La invención tiene también por objeto un método para detectar y, llegado el caso, cuantificar uno o varios antígenos de interés (más generalmente una o varias proteínas de interés) eventualmente presentes en una muestra, en particular una muestra biológica, comprendiendo dicho método o consistiendo en las etapas siguientes:

- la puesta en contacto de los antígenos de la muestra con uno o varios semianticuerpos tal(es) como se define(n) en la presente solicitud y en particular con unos semianticuerpos HAC_1 y/o HAC_2;

- la detección, por ejemplo por PCR, de los complejos eventualmente formados entre dicho o dichos semianticuerpos y uno o varios antígenos de la muestra;

- llegado el caso, la cuantificación del o de los antígenos así detectados.

Un complejo entre un semianticuerpo y un antígeno de interés de la muestra se forma por reconocimiento de un epítipo del antígeno de interés por el sitio de reconocimiento del semianticuerpo.

En un modo de realización particular de la invención, los antígenos (o más generalmente las proteínas) eventualmente presentes en la muestra biológica se han fijado previamente sobre un soporte sólido, una partícula o cualquier otro elemento que permita aislar un complejo formado entre un semianticuerpo utilizado y un antígeno de la muestra del resto de la muestra analizada. Alternativamente, el método puede incluir una primera etapa que consiste en la fijación de los antígenos (o más generalmente de las proteínas) eventualmente presentes en la muestra biológica sobre un soporte sólido, una partícula o cualquier otro elemento que permita aislar dicho complejo.

En un modo de realización particular de la invención, la detección y, llegado el caso, la cuantificación de antígenos presentes en la muestra se realizan detectando una secuencia particular presente en el semianticuerpo utilizado. En particular, la detección y, llegado el caso, la cuantificación de antígenos presentes en la muestra pueden ser realizadas amplificando, por ejemplo por PCR, una secuencia nucleotídica particular presente en el semianticuerpo o uno de los semianticuerpos utilizados (por ejemplo una secuencia nucleotídica particular presente en un dominio marcador de dicho semianticuerpo). Así, siempre que se utilice una cantidad suficiente de semianticuerpo y hayan sido eliminados los semianticuerpos no hibridados antes de realizar la amplificación, la amplificación media será proporcional al número de moléculas de semianticuerpos complejados de un antígeno dado (y por lo tanto proporcional al número de moléculas de un antígeno dado).

Por "muestra biológica" se entiende en la presente solicitud una muestra de sangre, de plasma, de suero, de orina o cualquier otro fluido susceptible de proceder de un hospedante (en particular de un mamífero) humano o no humano, o una muestra de tejido o de célula (incluso una única célula).

La invención tiene también por objeto la utilización de uno (o varios) semianticuerpos de la invención, para la puesta en práctica de un método de análisis realizado a partir de un chip (o biochip) de ácido(s) nucleico(s) (en particular de ADN y/o ARN y/o ANP y/o ALN, etc.) para realizar unos chips de anticuerpo o un chip mixto anticuerpo/ácidos nucleicos.

Así, la invención tiene también por objeto un segundo método para detectar y, llegado el caso, cuantificar, uno o varios antígeno(s) de interés (más generalmente una o varias proteínas de interés) eventualmente presente(s) en una muestra (en particular una muestra biológica), comprendiendo dicho método o consistiendo en las etapas siguientes:

a) la puesta en contacto de una o varias unidades de hibridación (o manchas) de un chip de ácido nucleico con un (o varios) semianticuerpos tales como se definen en la presente solicitud, y en particular con un semianticuerpo HAC_1, HAC_2 o HAC_4, siendo el semianticuerpo capaz de fijarse (en particular de hibridarse) a una o varias unidades de hibridación de dicho chip;

b) la puesta en contacto de las unidades de hibridación del chip (o al menos de las unidades de hibridación que se han puesto en contacto con el semianticuerpo en la etapa a) con las proteínas o los antígenos de la muestra (o más generalmente con la muestra);

c) la detección de los complejos eventualmente formados entre el semianticuerpo fijado sobre el chip al final de la etapa b) y uno o varios antígenos de la muestra;

d) llegado el caso, la cuantificación del o de los antígeno(s) así detectado(s).

En un modo de realización particular de la invención, la etapa a) se suprime en el método descrito anteriormente,

siendo el chip utilizado en el ámbito de este método un chip de anticuerpo o un chip mixto anticuerpo/ácidos nucleicos, tal como se define a continuación.

5 En un modo de realización particular de la invención, dicho método de análisis por biochip comprende o consiste en las etapas siguientes:

a) la etapa a) tal como se ha definido anteriormente;

10 b) la puesta en contacto de las unidades de hibridación del chip (o al menos de las unidades de hibridación que se han puesto en contacto con el semianticuerpo en la etapa a) con la muestra;

c) la detección de los complejos eventualmente formados entre el semianticuerpo fijado en el chip al final de la etapa b) y uno o varios antígeno(s) de la muestra;

15 d) la detección de los complejos eventualmente formados entre, por un lado, unos ácidos nucleicos o unos ANP presentes en una o varias unidad(es) de hibridación del chip y, por otro lado, unos ácidos nucleicos complementarios presentes en la muestra;

20 e) llegado el caso, la cuantificación del o de los antígenos de la muestra detectado(s) en la etapa c) y/o del o de los ácido(s) nucleico(s) de la muestra detectado(s) en la etapa d).

La etapa d) se puede realizar después o antes de la etapa c) o simultáneamente a la etapa c). En un modo de realización particular de la invención, las etapas de detección y/o de cuantificación, o algunas etapas de detección y/o de cuantificación, se realizan por amplificación por PCR y/o por microscopía confocal.

25 En un modo de realización particular de la invención, las etapas a) y b) están sustituidas por las etapas siguientes:

30 a) un (o varios) semianticuerpo tal como el definido en la presente solicitud y en particular un semianticuerpo HAC_1, HAC_2 o HAC_4, se pone en contacto con las proteínas o los antígenos de la muestra (o más generalmente con la muestra) en unas condiciones que permiten la formación de complejos proteína / HAC; después

b) el semianticuerpo de la etapa a) se pone en contacto con una o varias unidades de hibridación (o manchas) de un chip de ácido nucleico en el que el semianticuerpo es capaz de fijarse (en particular de hibridarse).

35 En un modo de realización particular, en la etapa b), los semianticuerpos puestos en contacto con las unidades de hibridación son los semianticuerpos presentes en forma de complejos proteína / HAC.

En un modo de realización particular, los chips utilizados en el ámbito de la invención son unos chips de impedancia, y en particular unos chips tales como los divulgados en las solicitudes WO 2005/036170 y WO 2006/090073.

40 En un modo de realización particular de la invención, el(los) semianticuerpo(s) o uno de los semianticuerpos utilizados en el método de análisis por biochip según la invención es(son) tal(es) que comprende(n) un dominio nucleotídico (por ejemplo un dominio marcador) complementario de una secuencia nucleotídica presente en una o varias unidad(es) de hibridación del chip utilizado (véase la figura 12).

45 A título de ejemplo, en un modo de realización particular de la invención, el semianticuerpo utilizado en el método de análisis por biochip según la invención es un semianticuerpo HAC_1 tal que:

* la primera molécula quimérica, A o B, de este semianticuerpo comprende o consiste en:

50 - un dominio polipeptídico (i) tal como se define en la presente solicitud, y los dominios siguientes, posicionados sucesivamente en el orden siguiente, a partir del extremo C-terminal del dominio polipeptídico (i):

- llegado el caso, un enlazador (por ejemplo un enlazador peptídico) tal como se define en la presente solicitud,

55 - un dominio nucleotídico (ii) tal como se define en la presente solicitud,

- llegado el caso, un enlazador (por ejemplo un enlazador nucleico) unido, preferentemente por medio de una unión lábil en medio reductor (por ejemplo un puente disulfuro) o por medio de una unión persistente en medio reductor (por ejemplo por medio de una unión establecida con un ácido maleimida), a un dominio marcador complementario de una secuencia nucleotídica de una unidad de hibridación en dicho chip (esto permite la fijación de la molécula quimérica en la unidad de hibridación específica del chip, transformando por lo tanto la unidad de hibridación en una unidad de complejación para la fijación de un objetivo por reconocimiento anticuerpo-antígeno; y

60 * la segunda molécula quimérica, respectivamente B o A, de este semianticuerpo, comprende o consiste en:

65

- un dominio polipeptídico (i) tal como se define en la presente solicitud, siendo este dominio y el dominio polipeptídico (i) de la primera molécula quimérica, preferentemente característicos de DV de un mismo anticuerpo, siendo uno de estos dominios característicos de un DV de la cadena ligera de un anticuerpo dado y siendo el otro característico de un DV de la cadena pesada del mismo anticuerpo,

y los dominios siguientes, posicionados sucesivamente en el orden siguiente, a partir del extremo C-terminal del dominio polipeptídico (i):

- llegado el caso, un enlazador (por ejemplo un enlazador peptídico) tal como se define en la presente solicitud, y

- un dominio nucleotídico (ii) tal como se define en la presente solicitud, capaz de emparejarse en medio hídrico (en particular en medio reductor) en una estructura bicatenaria con el dominio nucleotídico (ii) de la primera molécula quimérica, respectivamente A o B.

La invención tiene también por objeto un chip (o biochip) tal como se define en la presente solicitud, que comprende una o varias unidades de hibridación en las que un (o varios) semianticuerpo tal como se define en la presente solicitud está complejoado (o unido). Dicho chip es denominado por lo tanto "chip (o biochip) de anticuerpo" (cuando todas las unidades de hibridación de dicho chip están hibridadas con un semi-anticuerpo) o un "chip mixto anticuerpo/ácidos nucleicos" (cuando una o varias unidades de hibridación de dicho chip no están hibridadas con un semianticuerpo, sino con un ácido nucleico).

La invención tiene también por objeto un kit, en particular un kit apropiado para una utilización para detectar y, llegado el caso, cuantificar, uno o varios antígeno(s) de interés eventualmente presente(s) en una muestra, comprendiendo o consistiendo dicho kit en:

a)

- un chip de ácido(s) nucleico(s); y

- uno o varios semianticuerpo(s) tal(es) como se define(n) en la presente solicitud o una o varias composición(es) que comprende(n) uno o varios semianticuerpo(s) según la invención; y

- llegado el caso, un prospecto; o

b)

- un chip de anticuerpo o un chip mixto anticuerpo/ácidos nucleicos según la invención; y

- llegado el caso, un prospecto.

La presente invención puede por lo tanto permitir funcionalizar unas unidades de complejación de un chip de ácido nucleico, con el fin de conferir a dichas unidades de complejación la capacidad de reconocer unos antígenos y en particular unos epítomos.

De manera similar, es posible funcionalizar cualquier otro elemento que presenta una superficie, en particular unas partículas por unos semianticuerpos según la invención, por medio por ejemplo de ANP o de ácidos nucleicos complementarios de un dominio marcador presente en dichos semianticuerpos (véase la figura 13).

Así, la invención tiene también por objeto una partícula (por ejemplo una nanopartícula) y en particular una partícula fluorescente o no fluorescente, caracterizada por que uno o varios semianticuerpo(s) tal(es) como se define(n) en la presente solicitud y en particular uno o varios semianticuerpo(s) HAC_1 y/o uno o varios semianticuerpo(s) HAC_4 están unidos a la superficie de dicha partícula. La unión semianticuerpo/partícula puede llevarse a cabo por medio de un ANP o de un ácido nucleico que comprende una secuencia complementaria de una secuencia nucleica de dicho semianticuerpo (por ejemplo complementaria del dominio marcador del semianticuerpo).

Dicha partícula puede ser, por ejemplo, un punto cuántico (quantum dot (o Q-dot)).

dicha partícula se puede utilizar en particular para marcar (*in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*) unas células diana, es decir unas células en la superficie de las cuales está presente un epítipo reconocido por el sitio de reconocimiento de un semianticuerpo según la invención.

La presente solicitud describe también el direccionamiento (*in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*) de una o varias (en particular 2) ANPzima hacia unas células diana.

El ANP catalítico (denominado ANPzima en la presente solicitud) utilizado en la presente solicitud, presenta la capacidad de cortar específicamente un ADN. Esta ANPzima comprende o consiste en una o varias unidad(es) HD

(histidina - ácido aspártico), o DH (ácido aspártico - histidina), EH (ácido glutámico - histidina) o HE (histidina - ácido glutámico). La utilización de una sola ANPzima permite realizar unos cortes en el ADN mientras que la utilización de dos ANPzimas, de tal manera que dos secuencias contiguas y no complementarias situadas en las dos hebras de un ADN complementario estén cortadas, permite cortar las dos hebras, a la manera de una enzima de restricción que conlleva un corte bicatenario desplazado; la utilización del sistema de ANPzimas contiguos permite introducir unas deleciones en el ADN.

El o los sistemas ANPzimas pueden ser aportados a una célula diana mediante cualquier medio y en particular utilizando uno o varios semianticuerpos de la invención.

La invención se refiere por lo tanto en particular a un semianticuerpo de la invención, en el que el dominio marcador y/o el dominio biológicamente activo comprende o consiste en una o varias ANPzimas (en particular una o varias ANPzimas que comprenden una unidad HD o DH). Cuando se utilizan dos ANPzimas en el ámbito de la invención, son llevadas preferiblemente por el mismo semianticuerpo, que puede ser injertado en una nanopartícula no tóxica (como se describe en la presente solicitud).

En un modo de realización particular, la invención se refiere a un semianticuerpo tal como se define en la presente solicitud, en el que el dominio marcador y/o el dominio biológicamente activo comprende o consiste en dos ANPzimas, en particular dos ANPzimas con unidad HD o DH, que son tales que las dos ANPzimas estén unidas por sus extremos N-terminal o eventualmente por sus extremos C-terminal por medio de un mismo enlazador (estas dos ANPzimas son denominadas en la presente solicitud "doble anzima de cabeza con cola" o "DAZcc", de manera que estas ANPzimas reconozcan dos secuencias contiguas y no complementarias situadas en las dos hebras de un ADN complementario (véase la figura 14). DAZcc, hibridándose con el ADN, permite realizar un corte bicatenario desplazado entre las dos hebras de una molécula ADN. El direccionamiento de dos DAZcc por dos moléculas quiméricas, fijadas por ejemplo a una misma nanopartícula, y que comprenden el mismo dominio de DV pero dos DAZcc diferentes (por lo tanto que definen unos sitios de cortes desplazados), encuadra una región dada de una molécula de ADN, que permite realizar la deleción de esta región.

Esta herramienta se puede utilizar, en particular para realizar la deleción de la región de la secuencia nucleotídica de un virus, por ejemplo de un virus VIH y en particular del virus de VIH-1, que confiere la resistencia a dicho virus (véase la figura 15) o la deleción de una región de la secuencia nucleotídica de una bacteria que confiere la resistencia a uno o varios antibiótico(s); a título de ejemplo, se puede citar la secuencia PBS o unas secuencias responsables de la penetración en el núcleo.

La presente solicitud describe también una enzima o PNAzima como tal, formada por una estructura que comprende o que consiste en:

- una secuencia PNA, unida a

- una secuencia peptídica, unida a

- otra secuencia PNA,

pudiendo ser las dos secuencias PNA idénticas o diferentes.

Tal como se describen en la presente solicitud, las secuencias PNA se determinan para dirigir una secuencia de ácido nucleico particular (por ejemplo una secuencia de ADN particular) y emparejarse.

La presente solicitud describe dos estructuras PNAzima tales como se definen anteriormente (pudiendo estas dos PNAzima tener unas secuencias idénticas o diferentes), unidas de tal manera que estén cabeza con cola, es decir unidas por sus extremos C-terminales, o (preferiblemente) por sus extremos N-terminales, preferentemente por medio de un mismo enlazador. Tal doble estructura PNAzima se denomina "doble PNAzima cabeza con cola".

Por "secuencia peptídica" se entiende aquí una cadena de al menos dos (es decir dos o más de dos) aminoácidos.

Tal como se describe en la presente solicitud, la secuencia peptídica presente en una PNAzima constituye un dominio catalítico de una enzima y en particular de una nucleasa, preferiblemente de una ADNsa.

Tal como se describe en la presente solicitud, dicha secuencia peptídica comprende o consiste en una o varias unidades DH (ácido aspártico - histidina), HD (histidina - ácido aspártico), EH (ácido glutámico - histidina) o HE (histidina - ácido glutámico).

Una PNAzima y en particular una doble PNAzima cabeza con cola permite realizar, como con una enzima de restricción, un corte monocatenario o bicatenario en un ADN. Además, la utilización de dos dobles PNAzimas cabeza con cola (por lo tanto 4 PNAzimas) permite la creación de deleciones en un ADN bicatenario, llegado el caso, mediante cortes contiguos sobre dos hebras de ADN complementarias.

Otros modos de realización particulares, características y ventajas de la invención aparecerán en los ejemplos siguientes, así como en las figuras, y en particular en la figura 12.

5 Descripción de los dibujos

Figura 1: Ejemplo de síntesis realizado. 1: anticuerpo nativo; 2: puente disulfuro (o puente S-S); 3: dominios variables (DV) de cadena ligera y de cadena pesada; 4: dominios nucleotídicos estructurales (ANP estructural o Zipper); 5: semianticuerpo; 5a: sitio activo (DV1a+DV1b; sitio que comprende un sitio de reconocimiento de un epítipo) de semianticuerpo estructurado; 5b: ácidos nucleicos estructurales emparejados que forman una estructura de tipo Zipper; 6-8: secuencia nucleotídica marcadora que comprende una secuencia biológicamente activa; 6: secuencia del enlazador/espaciador; 7: puente disulfuro lábil; 8: secuencia biológicamente activa (ANP, LNA, etc.); 9: elemento lipófilo (por ejemplo: triptófano).

Figura 2. Reactor. 10: electrodo o electrodo y gel unidos a los bornes de un generador; 11: Tubo de latón que contiene la solución a reducir; 12: Gel duracryl & billes SH; 13: Tubo de material plástico (Tycon) aislante eléctrico; 14: Guía de electrodo; 15: Espiral de enfriamiento, Radiador en el que circula agua a una temperatura inferior a 10°C.

Figura 3: 16: Análisis por transferencia Western, anticuerpos nativos; 17: Análisis por transferencia western, anticuerpos desnaturalizados; 18: Análisis por transferencia Western, anticuerpo electrorreducidos en el reactor de latón/Tycon a 100V, 2mA, 10s.

Figura 4. 19: antisentido ácidos nucleicos bloqueantes; 22: Interacción, puesta en evidencia por RMN, entre un ANP w-GTCCCGUCCCCGCCA-c; SEC ID nº 1 (w: triptófano; c: cisteína); 23: bucle de la actividad ARNsa o ADNsa de una ADNzima ANP/ADNzima; 24: unidad DH o HD de un bucle enzimático de una ANPzima.

Figura 5. 6: secuencia de enlazador/espaciador; 7: puente disulfuro lábil; 8: secuencia biológicamente activa (ANP, LNA...); 25: HAC_tag (1); 26: ANP estructural 1 (S3); 27: DV2a); 28: DV2b); 29: ANP estructural 1 (S4); 30: HAC_tag (2); 31: HAC_tag (3)

Figura 6: 20: interacción, puesta en evidencia por RMN, entre un ANP w-CGCCA-c (w: triptófano y c: cisteína con N-terminal 5' y C-terminal 3'); 21: Interacción, puesta en evidencia por RMN, entre un ANP w-GTCCC-c (w: triptófano y c: cisteína con N-terminal 5' y C-terminal 3'); 22: Interacción, puesta en evidencia por RMN, entre un ANP w-GTCCCGUCCCCGCCA-c; SEC ID nº 1 (w: triptófano; c: cisteína).

Figura 7: reconocimiento anticuerpo/antígeno sobre membrana de nitrocelulosa. A. Anticuerpos electrorreducidos + BSA. B. Quimera + BSA.

Figura 8: Resultados de la fluorescencia por marcado sobre membrana de nitrocelulosa. (1) Fluorescencia del sobrenadante quimera/BSA sobre nitrocelulosa; (2) control negativo (sonda fluorescente sobre BSA).

Figura 9: Resultados de la fluorescencia sobre las trampas magnéticas. (1) sobrenadante de las trampas magnéticas / quimeras marcadas; (2) control negativo (sonda fluorescente con trampas magnéticas).

Figura 10: Quimera libre y quimera injertada sobre partículas. 7: puente disulfuro lábil; 25: HAC_tag (1); 26: ANP estructural 1 (S3); 27: DV2a); 28: DV2b); 29: ANP estructural 1 (S4); 30: HAC_tag (2); 31: HAC_tag (3); 32: partícula.

Figura 11: quimera injertada sobre partículas. 7: puente disulfuro lábil; 25: HAC_tag (1); 26: ANP estructural 1 (S3); 27: DV2a); 28: DV2b); 29: ANP estructural 1 (S4); 30: HAC_tag (2); 31: HAC_tag (3); 32: partícula.

Figura 12: chip ácido nucleico mixto proteína/ácido nucleico. 8': secuencia marcadora tag (ANP, LNA. etc.); 25: HAC_tag; 35: chip (ANP, LNA, ácidos nucleicos, etc.); 34 Puntos ANP Anti-secuencia marcadora; 36: Mancha ANP Anti-secuencia ADN/ARN. 37: ácido nucleico diana.

Figura 13: Funcionalización partícula fluorescente. 8': secuencia marcadora tag (ANP, LNA, etc.); 25: HAC_tag; 38: partícula fluorescente; 39 secuencia complementaria de la etiqueta tag.

Figura 14. 24: unidad enzimática DH o HD de una ANPzima; 40: parte ANP de la APNzima; 41: sitio de corte enlazadores NN o CC entre ANP, LNA, etc. complementarios; 42: enlazador que une las partes C-terminales de dos ANPZimas cabeza con cola; 43: DNA diana a suprimir.

Figura 16. 6: secuencia enlazador/espaciador; 44: ANP estructural S1; 45: DVA; 46: DVB; 47: ANP estructural (S2).

Figura 17: Resultados de dot blots de la purificación de las moléculas SP1 & SP2. 48: Sobrenadante 1 / Moléculas SP(1/2) → solución que comprende la proteína HS-LPGTG + la enzima sortasa A + ANP SP(1/2); 49: Elución enz

AcTev/ Moléculas SP(1/2) → solución que comprende la proteína HS-LPGTG + la enzima sortasa A + ANP SP(1/2);
50: Elución imidazol/moléculas SP(1/2) → solución que comprende la proteína HS-LPGTG + la enzima sortasa A +
ANP SP(1/2); 51: Sobrenadante 1 /CNI → control negativo 1 solución que comprende la proteína HS-LPGTG + La
enzima sortasa A; 52: Elución enz AcTev/CNI → control negativo 1 solución que comprende la proteína HS-LPGTG
+ La enzima sortasa A; 53: Elution imidazole/CNI → control negativo 1 solución que comprende la proteína HS-
LPGTG + La enzima sortasa A; 54: Sobrenadante 1 / CNII → Control negativo II, solución que comprende la proteína
HS-LPGTG + ANP SP1; 55: Elución enz AcTev/ CNII → Control negativo II, solución que comprende la proteína HS-
LPGTG + ANP SP1; 56: Elution imidazol/ CNII → Control negativo II, solución que comprende la proteína HS-
LPGTG + ANP SP1;

Sobrenadante 1: solución proteica no retenida sobre las perlas NI-NTA

Elución enz Actev: 1ª elución de las proteínas retenidas sobre las perlas NI-NTA por la enzima AcTev

Elución imidazol: 2ª elución de las proteínas retenidas sobre las perlas NI-NTA por imidazol 400mM.

Figura 18: Reconocimiento Dot blotting antígeno(HEL_DL488)/Anticuerpo comprimido. 56: Ac nativos anti-HEL no
diluido, depositados sobre nitrocelulosa (1x2ul a 650uM) + HEL_DL488 en solución; 57: Ac nativos anti-HEL diluido
(5*x2uL a aproximadamente 10uM) + HEL_DL488 en solución; 58: Moléculas SP1&SP2 emparejadas (parte variable
del anticuerpo comprimido) (5x2uL a aproximadamente 10uM) + HEL_DL488 en solución.

Figura 19: Resultado de la digestión de PBS de VIH-I por la ANPzima PZ1; 59: PBS ARN no cortado; 60: PBS ARN
cortado; 61: Gel nativo 20% acrilamida; 62: Gel desnaturalizante 20% acrilamida; 63: Dúplex PBS/ANPZIMA; 64:
PBS solo; 65: PBS + PZ1 a T0; 66 PBS + PZ1 a T6h, desaparición del PBS; PB: marcador de pesos moleculares; A:
PBS (ARN) solo; B: PBS (ARN) + PZ1 (6H a 37°C); C: PBS (ARN) + PZ1 (0H a 37°C); D: PBS (ARN) + PZ1 (6H a
37°C).

Ejemplos

Se sintetizan nuevas moléculas químicas denominadas "semianticuerpos", capaces de autoensamblarse en un
medio apropiado. Comprenden una parte de naturaleza polipeptídica y una parte constituida de una secuencia
nucleotídica o de un análogo.

Preferiblemente, la parte polipeptídica está constituida de partes de anticuerpos, y más precisamente de los
dominios variables de uno o varios anticuerpos que proceden de las cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo y
que, estructurándose forman específicamente un sitio de reconocimiento del epítipo. La segunda parte está
constituida de un ácido nucleico o de un análogo tal como un ANP o un LNA.

Un primer tipo de HAC consiste en dos dominios DV (un dominio procedente de una cadena pesada de un
anticuerpo y un dominio procedente de una cadena ligera del mismo anticuerpo, que reconocen específicamente el
antígeno) y de dos secuencias nucleicas.

Uno de los dominios DV (figura 1.3) está acoplado de manera covalente (figura 1.4) en el extremo C-terminal, bien
en el extremo 5' de un ácido nucleico (LNA, ácido nucleico metilfosfonato, ácido nucleico tioato, etc.), o bien en el
extremo N-terminal de un ANP.

El otro dominio DV está acoplado de manera covalente en su extremo C-terminal, bien en el extremo extremo 3' de
un ácido nucleico (LNA, ácido nucleico metilfosfonato, ácido nucleico tioato, etc.), o bien en el extremo C-terminal de
un ANP.

Las dos secuencias nucleotídicas complementarias y orientadas de manera anti-paralela se emparejan creando una
hélice alfa que permite a las dos partes proteicas adquirir una forma funcional. En otras palabras, las secuencias
ANP y/o ácido nucleico injertadas detrás de los péptidos del dominio DV actúan como una estructura de tipo "Zipper"
(ANP "zipper" o estructurales) y los dos dominios DV se disponen enfrente para reformar el sitio activo de un
semianticuerpo (figura 1.5a), capaz de dirigir un antígeno intra y/o extra-celular.

Este auto-ensamblaje se puede utilizar para asociar, según ensamblajes nuevos, unos dominios DV nuevos o unos
dominios DV procedentes de dominios DV existentes no asociados a fin de buscar nuevas afinidades. Esta
invención describe también un procedimiento de síntesis para las quimeras HAC y finalmente unos ejemplos
particulares de utilización de HAC específicos, en particular para luchar contra el VIH-1 y 2.

Espaciadores/enlazadores peptídicos: polímero de 1 a 20 carbonos:

En un modo de realización particular, los dominios DV utilizados conservan al menos una cisteína que permite
establecer unos puentes disulfuros entre los dominios DV. Los ácidos nucleicos y/o los ANP se injertan entonces
después de dichas cisteínas, de manera que hibridándose, los ácidos nucleicos y/o ANP injertados disponen

juiciosamente las cisteínas permitiendo la formación de los puentes disulfuros entre las dos cadenas DV que formarán el sitio activo del semianticuerpo. El emparejamiento de las secuencias nucleicas de tipo zipper permite la formación de una molécula estable, con un puente disulfuro que tiene un potencial redox modificado. Este puente disulfuro se mantiene en medio intracelular, lo que aumenta la posibilidad de tener un sitio semianticuerpo funcional.

En algunos modos de realización, unas moléculas espaciadoras enlazadoras, tales como la lisina, la etil-diamina, la beta-alanina, etc., o cualquier otra cadena hidrógeno-carbonada, pueden ser intercaladas entre el ácido nucleico y/o el ANP estructural del dominio DV, de manera que una vez que los nucleótidos estén hibridados entre sí, el desplazamiento introducido por los espaciadores enlazadores entre los dos dominios DV permiten la optimización de la formación del sitio activo del semianticuerpo.

Injerto:

Según un modo de realización preferido, un ANP (a) se injerta en el extremo C-terminal de un dominio DV, por medio del NH₂ de la cadena lateral de una lisina unida al extremo C-terminal de dicho ANP (a) por una unión peptídica. El ANP (a) es por lo tanto de orientación C hacia N, opuesta a la orientación N hacia C del DV, y la lisina tiene el papel de espaciador enlazador. El segundo dominio DV está unido por su extremo C-terminal al extremo N-terminal de otro ANP (b), gracias a una unión peptídica o amida con uno de los NH₂ de una lisina, estando dicha lisina unida, por su grupo COOH, al extremo N-terminal del ANP (b) complementario del ANP (a). El ANP (b) está por lo tanto orientado N hacia C, al igual que DV.

En un modo de realización particular, el injerto, de un ANP modificado en N- o en C-terminal por una lisina o de un ácido nucleico modificado en 5' o en 3' por un NH₂, sobre el extremo C-terminal de los dominios DV se realiza por la acción del ácido 2-mercapto-etanosulfónico o por la acción del ácido 3-mercaptopropiónico en la cisteína de los DV implicada en la formación del puente disulfuro que une la cadena pesada y la cadena ligera de un anticuerpo.

Dominios peptídicos DV utilizados:

Los dominios DV utilizados para realizar las quimeras pueden provenir bien de la digestión de los anticuerpos por la pepsina, la papaína, la tripsina (o cualquier otra enzima), o bien de la expresión de los genes que codifican estos péptidos en unos sistemas celulares tales como bacterias, levaduras, células de insectos, síntesis *in vitro* (kits), etc., después de la purificación. El tamaño de estos dominios puede variar por ejemplo de 10 a 300, de 20 a 200 o de 40 a 200 restos de aminoácidos.

Ácidos nucleicos estructurales "zipper" (o dominios nucleotídicos (ii); figura 1.4; 1.5b):

Los ácidos nucleicos utilizados para estructurar el semianticuerpo son unas secuencias complementarias, cuyo tamaño puede variar, por ejemplo, de 3 a 100 o de 5 a 60 nucleótidos. Estas secuencias pueden ser simples secuencias nucleotídicas, ANP, LNA, etc.

Clonación:

En el caso de la clonación de los dominios DV, el dominio DV puede ser fusionado en su extremo C con una secuencia peptídica LPXTAAAA (leucina-prolina-X-treonina-alanina(4) (X = un aminoácido cualquiera); SEC ID nº 2). El ácido nucleico o el ANP a injertar, por su parte, está funcionalizado en uno de sus extremos por una poli-G, eventualmente por medio de una lisina, permaneciendo libre el extremo N-terminal de la poli-G. El dominio DV y el ácido nucleico o el ANP son entonces fusionados bajo la acción de sortasa A.

La secuencia LPXTAAAA puede estar ventajosamente sustituida con la secuencia LPXTG (leucina-prolina-X-treonina-glicina, en la que X es un aminoácido cualquiera; SEC ID nº 7).

En un modo de realización particular, es posible combinar unos DV de anticuerpos diferentes complejándolos gracias a ANP estructurales complementarios para obtener nuevos anticuerpos dirigidos contra nuevos antígenos. Es así posible efectuar unos cribados de antígenos para la búsqueda de nuevos anticuerpos.

En un modo de realización particular, los semianticuerpos ADN/AC descritos tienen al mismo tiempo la capacidad de alcanzar específicamente la célula diana (propiedad de reconocimiento conferida por la parte anticuerpo) y la de proporcionar al interior de la célula un dominio biológicamente activo (propiedad conferida por la secuencia hidrófoba adicionada). Así, la molécula quimérica asegura el direccionamiento del ácido nucleico a la célula pero también su penetración en el interior de la célula.

La invención se refiere también a un HAC que puede ser utilizado para dirigirse a unas células específicas a fin de introducir en ellas, por ejemplo, un dominio nucleico biológicamente activo (por ejemplo: ANP) dirigida contra una diana particular. Este dominio biológicamente activo está injertado por una unión covalente detrás una de las secuencias nucleicas zipper descritas anteriormente. En este caso, el sitio activo o de reconocimiento anticuerpo de HAC está dirigido hacia unos antígenos de superficie. Esto permite por un lado reconocer específicamente las

células diana y, por otro lado, favorecer la penetración de un dominio biológicamente activo acercándolo a la membrana.

En otras palabras, la molécula quimérica está constituida de las partes variables de un semianticuerpo DV1a/DV1b (figura 1.5a). Sobre cada péptido DV se injerta un ácido nucleico estructural (zipper), de tal manera que este ácido nucleico injertado en un péptido DV1a sea complementario y antiparalelo al ácido nucleico estructural (zipper) injertado en el segundo péptido DV1b. Los dos péptidos DV forman entonces un semianticuerpo con su sitio activo o de reconocimiento. Uno de los dos ácidos nucleicos estructurales está seguido de una secuencia nucleotídica (tag) (figura 1.6 a 1.8) que comprende un dominio biológicamente activo.

En un modo aún más particular, el semianticuerpo permite dirigirse a unos orgánulos o unas moléculas intracelulares.

Dominio biológicamente activo (o dominio Tag; figuras 1.6 a 1.9)

El dominio biológicamente activo puede ser un ácido nucleico, un ANP, una secuencia mixta ANP/ácido nucleico, ANP/péptido y más generalmente una secuencia nucleotídica o un análogo (ANP, LNA, metilfosfonatos, metilsulfonatos, ácidos nucleicos o desoxinucleicos modificados, o una mezcla de estas diferentes moléculas, etc.) una ADNzima, una ANPzima, o una MiRNA, eventualmente un antisentido, que entrando en la célula diana impedirá la expresión de una secuencia diana o la degradará, o presentará una actividad ADNasa o ARNasa, o una combinación de estas dos propiedades (figura 4.19).

En un modo de realización particular, el dominio biológicamente activo es una secuencia antisentido que comprende todo o parte del ARNt^{Lys3}, por ejemplo GTCCC o GUCCC, complementario de una parte del ARB viral VIH-1.

En la figura 6.21, se presenta la interacción, puesta en evidencia por RMN, entre ANP w-GTCCC-c (w triptófano y c cisteína con N-terminal 5' y C-terminal 3') y las secuencias Primer Binding Site (PBS) de VIH-1. La secuencia forma un complejo extremadamente estable con el PBS de VIH-1, capaz de desplazar el complejo ARNt^{ARNtLys3}/PBS de VIH-1.

En otro modo de realización, el dominio biológicamente activo es una secuencia antisentido que comprende todo o parte de la secuencia terminal de tRNA_{Lys3}, por ejemplo CGCCA, complementaria de una parte del ARN viral VIH-1.

En la figura 6.20 se presenta la interacción, puesta en evidencia por RMN, entre un ANP w-CGCCA-c (W triptófano y c cisteína con N-terminal 5' y C-terminal 3') y las secuencias PBS de VIH-1. La secuencia forma un complejo extremadamente estable con PBS de VIH-1, capaz de desplazar el complejo ARNtARNtLys3/PBS VIH-1.

En un modo de realización aún más particular, el dominio biológicamente activo propiamente dicho es una combinación de las dos secuencias GTCCC o GUCCC y CGCCA (figura 6.22) (N' ATGGTAGAG-cisteína C' y N' cisteína-CTCTACCAT C').

En un modo de realización particular, la secuencia antisentido propiamente dicha es una secuencia complementaria de toda o parte de la región PBS o de la región TAR del ARN viral de VIH-1 o VIH-2.

En un modo de realización particular, el dominio biológicamente activo antisentido comprende unos ANP (figura 6.22).

En un modo de realización particular, el dominio biológicamente activo es una secuencia de actividad enzimática de tipo ADNzima y unas secuencias de reconocimiento complementarias de toda o parte de la secuencia PBS.

En un modo de realización aún más particular, el dominio biológicamente activo está constituido de un dímero DNA/ANPzima. La parte ANP (que flanquea a ambos lados el bucle ADNzima) es complementaria de una secuencia diana de interés que puede ser toda o parte de la secuencia PBS o TAR del VIH-1 o del VIH-2 (figura 4.22) y la parte ADNzima, formada de 2 a 23 restos, presenta una estructura en bucle (figura 4.23) y conllevará la degradación de la secuencia diana debido a su actividad ARNsa o ADNsa.

En un modo de realización particular, la totalidad de la secuencia enzimática es un ANP, formando así una ANPzima.

En un modo de realización particular, el bucle enzimático de ANPzima está completa o parcialmente sustituido por una unidad que comprende al menos un aminoácido tal como DH (ácido aspártico - histidina), HD (histidina - ácido aspártico), EH (ácido glutámico - histidina) o HE (histidina - ácido glutámico) (figura 4.24).

En un modo de realización particular, la secuencia ANPzima, antisentido, ANP/ADNzima propiamente dicha se utiliza sola o en combinación de cualquier parte de HAC:Tag (HAC, secuencia espaciador, extremo lipófilo o

aromático).

El sistema de secuencia biológicamente activa puede ser adaptado a cualquier tipo de virus, de bacterias, en particular que tienen como objetivo los genes de resistencia a los antibióticos a fin de inhibir la resistencia y hacer las bacterias sensibles al antibiótico correspondiente.

En un modo de realización particular, la secuencia antisentido propiamente dicha comprende toda o parte de la secuencia ARN o ADN de los genes bacterianos de resistencia a los antibióticos o una secuencia antisentido complementaria de toda o parte de esta secuencia.

Espaciadores/enlazadores nucleicos (figura 1.6):

La secuencia injertada puede comprender una secuencia espaciadora de 5 a 50 nucleótidos que tienen como objetivo optimizar la distancia entre el dominio nucleico ii) y el dominio biológicamente activo que debe penetrar en la célula.

En un modo de realización preferido, la secuencia tag comprende una parte ácido desoxirribonucleico que actúa como espaciador (figura 1.6). El espaciador está unido a una secuencia ANP (o a otro ácido nucleico, modificado o no) que constituye el dominio biológicamente activo propiamente dicho (figura 1.8).

El dominio biológicamente activo está, por ejemplo, unido por uno de sus extremos a la secuencia espaciadora por una secuencia lábil en medio reductor, por ejemplo un puente disulfuro SS (figura 1.7).

En un modo de realización particular, la secuencia espaciadora está ausente y el dominio biológicamente activo está unido al semianticuerpo por una unión covalente.

En un modo de realización particular, una función tiol está presente en el otro extremo libre de la secuencia espaciadora. Esta función permite injertar otra molécula en la secuencia espaciadora por el establecimiento, por ejemplo, de una unión SS. Esta unión SS es lábil en medio reductor tal como el medio del citoplasma celular. Esta unión, después de la reducción del puente SS, permite la separación del HAC y del dominio biológicamente activo. Según un modo de realización particular de la invención, la función tiol está introducida en el extremo de la secuencia espaciadora por fusión, con dicha secuencia, de una secuencia que comprende una función tiol en uno de los extremos. La fusión de la secuencia espaciadora y de la secuencia que comprende una función tiol en su extremo libre puede ser obtenida gracias a una ligasa.

El dominio biológicamente activo puede, por ejemplo, comprender una función tiol en uno de sus extremos para el establecimiento de un puente disulfuro entre el dominio biológicamente activo y la secuencia espaciadora. Esta función tiol puede estar sustituida por un ácido maleimida a fin de que la unión entre la secuencia espaciadora y el dominio biológicamente activo sea persistente en un medio reductor.

Paso transmembranario:

El objetivo de este HAC puede ser extra o intracelular, lo que implica, en este último caso, el paso del ácido nucleico a través de la membrana plásmica. Este paso se hace posible por la adición de una secuencia hidrófoba en el extremo libre del ácido nucleico (dominio biológicamente activo) a transferir. Este grupo lipófilo (figura 1.9) permite al dominio biológicamente activo atravesar la membrana celular más fácilmente. En un modo de realización aún más preferido, el grupo lipófilo es aromático, con el fin de intercalarse en una hélice mixta ANP/ácido nucleico a fin de estabilizar esta estructura formada entre el antisentido ANP y la diana ácido nucleico.

El sitio de reconocimiento de la estructura HAC_tag se fija específicamente en las células que comprenden los antígenos diana; la función lipófila injertada en el dominio biológicamente activo (ANP antisentido, ADNzima, etc.) permite al brazo nucleotídico atravesar la membrana, y más particular, al dominio biológicamente activo. Al ser el medio intracelular un medio reductor, los puentes SS que unen el dominio biológicamente activo a la secuencia espaciadora son reducidos, liberando así el dominio biológicamente activo en el interior de la célula diana.

Por ejemplo, el ANP antisentido se compleja entonces con las secuencias sentido dianas (ARN en el citoplasma o ADN en el núcleo) y bloquea las posibilidades de expresión de la secuencia diana (a nivel de la transcripción, retrotranscripción, replicación y/o traducción). La molécula aromática, tal como el triptófano introducido en el extremo del ANP antisentido, estabiliza el dúplex ANP/ADN o ARN que se forma, y mejora así la eficacia de bloqueo por el ANP.

Anticuerpos o dominios peptídicos DV

En un modo de realización particular, el anticuerpo utilizado para realizar el HAC_tag es un anticuerpo que reconoce una proteína de una cubierta viral o bacteriana.

En un modo de realización particular, el anticuerpo utilizado para realizar HAC_tag es capaz de fijarse sobre la partícula viral.

En un modo de realización particular, el anticuerpo utilizado para realizar HAC_tag es el anticuerpo anti gp 120-17b. El HAC_tag-gp120-17b puede fijarse sobre las partículas virales y es llevado por ellas hasta las células diana del virus gracias a las interacciones CD4/gp120. Después de la fijación de los viriones en los objetivos, el brazo nucleico de HAC-tag puede atravesar la membrana celular gracias a la función lipófila injertada en el extremo del dominio biológicamente activo. Después del paso a través de la membrana celular, el puente SS, que une la secuencia espaciadora y el dominio biológicamente activo, se reduce en el citosol, liberando el dominio biológicamente activo en la célula. La secuencia biológicamente activa bloquea o degrada la secuencia viral, según si el dominio biológicamente activo es un antisentido o un antisentido/ANPzima.

Según un modo de realización particular, el anticuerpo utilizado para la síntesis del semianticuerpo está constituido de un anticuerpo anti-retrotranscriptasa, en particular anti-retrotranscriptasa VIH-1 o VIH2. En esta configuración, el semianticuerpo está unido al dominio biológicamente activo por medio de una unión persistente en medio reductor, por ejemplo por medio de un ácido maleimida. Una secuencia espaciadora puede eventualmente ser intercalada entre el semianticuerpo y el dominio biológicamente activo, siendo las uniones que unen HAC, secuencia espaciadora y dominio biológicamente activo, persistentes en medio reductor. El dominio biológicamente activo es preferiblemente una secuencia ANPzima, ADNzima o ANP antisentido. El HAC-tag así constituido se compleja con la transcriptasa inversa mientras que el dominio biológicamente activo degrada y/o bloquea el ARN viral.

Los HAC_tag pueden también ser incluidos (en particular encapsulados) en microesferas o liposomas, más particularmente los HAC_tag estarán incluidos en liposomas constituidos de membrana viral.

La invención se refiere también a un sistema que comprende (véase la figura 5):

1) un primer HAC (HAC_1; figura 5.25), dirigido por ejemplo contra un antígeno presente en la superficie de las células o un antígeno viral y que comprende o que está constituido de:

* dos dominios DV (DV1a y DV1b), unidos respectivamente a

* dos secuencias zipper (S1 y S2) complementarias, antiparalelas

* un espaciador unido a una secuencia zipper de HAC_1, unido por uno de sus extremos y por medio de un puente SS a

* un dominio biológicamente activo (figura 5.8), unido por medio de una unión covalente a

* un ácido nucleico estructural, S3 (figura 5.26), de un tercer HAC (HAC_3),

* estando el otro extremo de la secuencia estructural (S3) unido a

* un dominio DV (DV2a; figura 5.27);

2) un segundo HAC (HAC_2), dirigido por ejemplo contra un antígeno presente también en la superficie de las células y que comprende o que está constituido de:

* dos dominios DV (DV3a y DV3b), unidos respectivamente a

* dos secuencias zipper (S5 y S6) complementarias, antiparalelas

* un espaciador que comprende un puente disulfuro o unido por medio de un puente disulfuro a

* un ácido nucleico estructural, S4 (figura 5.29), complementario, antiparalelo a S3, unido a

* un dominio DV (DV2b; figura 5.28).

3) En una célula que comprende HAC_1 y HAC_2, se forma un tercer HAC, HAC_3. Éste comprende:

* dos DV (DV2a y DV2b), unidos a los

* dos ácidos nucleicos estructurales, S3 y S4, complementarios, antiparalelos (derivados respectivamente de HAC_1 y HAC_2),

* estando S3 unido por medio de una unión covalente al

* dominio biológicamente activo derivado de HAC_1 (figura 5.8).

Según un modo de realización particular, HAC_1 está dirigido contra la proteína gp120, HAC_2 está dirigido contra la proteína CD4.

Según un modo de realización particular, DV2a y DV2b forman un sitio de reconocimiento HAC_3 (figura 5.31) anti retro-transcriptasa cuando los dos ácidos nucleicos estructurales S3 y S4 se hibridan.

Este sistema puede ser declinado de diversas maneras para proporcionar, en el interior de una célula, las dos partes de un semianticuerpo, que pueden así autoensamblarse en la célula. Se pueden utilizar en particular unas partículas virales para proporcionar específicamente los semianticuerpos y su dominio biológicamente activo en la célula.

Preparación de las moléculas quiméricas por fusión de puentes disulfuros.

a) reactor

El anticuerpo sufre una reducción electroquímica llevado a cabo en un reactor enfriado. El reactor se compone de un tubo vertical de latón de 2 mm de diámetro y de 1,5 cm de longitud que contiene la solución del anticuerpo a electro-reducir. El extremo inferior del tubo está unido al borne positivo de un generador por un electrodo mixto compuesto de una aguja rellena y rodeada de un gel duracryl 20% (124 µl de duracryl (*Sigma*) 30% + 30 µl de Tris 1,5M pH 8,9 + 43,6 µl H₂O + 50 µl de tampón de electro-reducción + 5 µl APS 10% + 2 µl de Temed) contenido en un tubo Tycon (*Norton*) de 1,5 cm, cerrado por un lado con la ayuda de la llama de un mechero Bunsen. El electrodo de gel permite el paso de los electrolitos, pero limita la difusión de los anticuerpos o de sus formas reducidas. El extremo superior del reactor está unido al polo negativo del generador por una aguja, a fin de impedir cualquier contacto entre las paredes del reactor y el electrodo gracias a un cono de pipeta que guía la aguja en el interior del reactor. El reactor está rodeado por un sistema de enfriamiento constituido de otro tubo de latón trenzado para formar una espiral en la que circula agua a temperatura de fusión del hielo, bajo la acción de una bomba peristáltica. Los parámetros utilizados para la reducción del anticuerpo en semianticuerpo son: +100V, 2mA, 10s.

b) funcionalización de los semianticuerpos por oxidación de las funciones tioles

Se utiliza una solución de 4 µl de anticuerpos anti-BSA a 0,5 µg/µl, 4 µL de tampón 0,12% β-mercaptoetanol y de 6 µl de la secuencia Tag_C a 500 ng/µl (⁵HS-TCAAGTAGCTTCAGAATCTTTTCCCCC³; SEC ID n° 3), para funcionalizar las funciones tioles (SH) liberadas en los anticuerpos después de la reducción por electro-oxidación a -100V, 2mA, durante 10 segundos.

Puesta en evidencia por fluorescencia

El marcaje de las secuencias TAG_C de las quimeras se realiza gracias a una secuencia nucleotídica (tag_D = ⁵CTGAAGCT³_cisteína) complementaria de la secuencia tag_C y funcionalizada en 3' por un fluoróforo cianina 3. Se añaden 15 µl de secuencia tag_D (0,3 µg/µl) a 10 µl de una solución de quimeras funcionalizadas por una secuencia tag_C y diluida (1/1000) en leche/TBS1X. En esta solución, un depósito de antígeno BSA sobre membrana nitrocelulosa se incuba durante la noche a 4°C. Después de tres lavados con TBS 1X durante 5 minutos para eliminar los enganches específicos, la membrana se desnaturaliza por 50 µl de β-mercaptoetanol 2,5%, a una temperatura de 95°C, durante 20 minutos. Se depositan 2 µl de sobrenadante sobre una lámina de vidrio. El depósito se seca durante 20 minutos al aire libre y protegido de la luz, y después se escanea la lámina (*Packard Bioscience*) a 455 nm.

Un control negativo se efectúa en paralelo: una membrana que comprende un depósito de antígeno es incubada con 15 µl de tag-D y 1 ml de leche/TBS 1X a 4°C toda la noche con agitación. La membrana sufre el mismo protocolo que anteriormente. Se depositan también 2 µl que proceden de su desnaturalización en lámina de vidrio y se escanean para evaluar el enganche específico.

c) fusión de los dominios (i) DV y (ii) Zipper por un protocolo de transpeptidación enzimática por sortasa A (figura 16)

c.1) sortasa A

El plásmido pLLC092 (<http://isisbiolab.dabbledb.com/publish/laboratorystocks/ff0e3c28-ca9a-4280-95ce-f170e7f7a39a/allentries.txt>) que contiene la secuencia de la sortasa contigua a un Tag Histidina, se ha transfectado en las células competentes BL21(DE3) (biolabs) bajo el control de un promotor Lac inducido por IPTG (isopropilo β-D-1-tiogalactopiranosido). La expresión de la sortasa A es entonces inducida por IPTG (1 mM). La enzima sortasa A se purifica después mediante el kit Ni-NTA Fast Start Kit (Qiagen).

c.2) Proteínas HS-LPGTG y LS-LPGTG

(I-A) HS-LPGTG :

5'CAGGTGCAGCTGAAAGAATCTGGTCCGGGTCTGGTGGCGCCGTCTCAGTC
TCTGTCTATTACCTGCACCGTGTCTGGTTTTCTCTGACCGGTTATGGTGTGA
ACTGGGTGCGTCAGCCGCCGGGTAAAGGTCTGGAATGGCTGGGTATGATTT
GGGGTGATGGTAACACCGATTATAACTCTGCGCTGAAATCTCGTCTGTCTATT
TCTAAAGATAACTCTAAATCTCAGGTGTTTCTGAAAATGAACTCTCTGCATACC
GATGATACCGCGCGTTATTATTGCGCGCGTGAACGTGATTATCGTCTGGATT
ATTGGGGTCAGGGTACCACCCTGACCGTGTCTTCTGCGTCTACCACCCCGCC
GTCTGTGTTTCCGCTGGCGCCGGGTCTGCGGCGCAGACCAACTCTATGGT
GACCCCTGGGTGCTTGGTGAAGGTTATTTCCGGAACCGGTGACCGTGACC
TGGA ACTCTGGTTCTCTGTCTTCTGGTGTGCATACCTTTCCGGCGGTGCTGC
AGTCTGATCTGTATACCCTGTCTTCTTCTGTGACCGTGCCGTCTTCTCCGCGT
CCGTCTGAAACCGTGACCTGCAACGTGGCGCATCCGGCGTCTTCTACCAAAG
TGGATAAAAAAATTGTGCCGCGTGATTGCCGCGGGTACCGGT 3' → 669
bases (SEQ ID NO. 8).

(I-B) LS-LPGTG :

5'GATATTCAGATGACCCAGTCTCCGGCGTCTCTGTCTGCGTCTGTGGGTGAA
ACCGTGACCATTACCTGCCGTGCGTCTGGTAACATTCATAACTATCTGGCGT
GGTATCAGCAGAAACAGGGTAAATCTCCGCAGCTGCTGGTGTATTATACCAC
CACCCCTGGCGGATGGTGTGCCGTCTCGTTTTCTGGTTCTGGTTCTGGTACC
CAGTATTCTCTGAAAATTA ACTCTCTGCAGCCGGAAGATTTTGGTTCTTATTAT
TGCCAGCATTTTTTGGTCTACCCCGCGTACCTTTGGTGGTGGTACCAA ACTGG
AAATTAAACGTGCGGATGCGGCGCCGACCGTGTCTATTTTCCGCCGTCTTC
TGAACAGCTGACCTCTGGTGGTGGTCTGTGGTGTGCTTTCTGAACA ACTTTT
ATCCGAAAGATATTAACGTGAAATGGAAAATTGATGGTTCTGAACGTCAGAAC
GGTGTGCTGAACTCTTGGACCGATCAGGATTCTAAAGATTCTACCTATTCTAT
GTCTTCTACCCTGACCTGACCAAAGATGAATATGAACGTCATAACTCTTATA
CCTGCGAAGCGACCCATAAAACCTCTACCTCTCCGATTGTGAAATCTTTTAAC
CGTAACGAATGCCTGCCGGGTACCGGT 3' → 657 bases (SEQ ID NO. 9).

- 5 Las dos secuencias (I-A) HS-LPGTG y (I-B) LS-LPGTG anteriores que corresponden respectivamente a la parte variable de la cadena pesada y de la cadena ligera del anticuerpo anti-HEL (Hen Egg Lysozyme) se han clonado en el vector pEXP5-NT (invitrogen) por Proteigenix. Los vectores se han transfectado separadamente en unas bacterias competentes Top10 one Shot E.coli (invitrogen). La purificación de los plásmidos se han realizado con el kit QIAfilter Plasmid Midi Kit (Qiagen). La expresión de las dos proteínas HS-LPGTG y LS-LPGTG se ha realizado gracias al kit
- 10 expressway cell-free E.coli expression system (invitrogen). Las dos proteínas sintetizadas se purificaron después mediante el kit Ni-NTA Fast Start Kit (Qiagen).

Dos ANP Zipper (dominio ii-A) SP1 y (ii-B) SP2 de secuencia respectiva

- 15 ATGGTAGAG y CTCTACCAT prolongadas por los enlaces N'GlyGlyGly(CO)NH(CH₂)₄(NH₂)CH(COO) y NH₂-CH(CONH₂)-(CH₂)₄NH(CO)GlyGlyGly N'), se sintetizaron a fin de obtener

SP1 (N'GlyGlyGly(CO)NH(CH₂)₄(NH₂)CH(CO)NHATGGTAGAGTTTTTC') y

- 20 SP2 (N' CTCTACCAT-CONH-CH(CONH₂)-(CH₂)₄NH(CO)GlyGlyGly N').

Una secuencia TTTTTC se añade en final de SP1 a fin de poder poner en evidencia la quimera formada marcándola con un ácido nucleico GAAAAA fluorescente.

SP1 y SP2 se recogen en una solución de 10% de N-metil-2-pirrolidona (NMP) para la concentración final de 100 micro M.

ensayo-I: Se preparan una solución de 50 µl de SP1 y una solución de 50 µl de SP2, a una concentración final de 20µM que contiene 20µM de HS-LPGTG (I-A), y respectivamente 20µM LS-LPGTG (I-B), la enzima SrtA a 20µM, Tris-HCL pH 7,5 a 50mM, NaCl a 150mM y CaCl2 a 5mM.

Se realizan también cuatro controles negativos (figura 17):

- CNI-sp1 (solución sin ANP) 50µl de solución que contiene HS-LPGTG (I-A) a 20µM y la enzima SrtA a 20µM.

- CNII-sp1 (solución sin srtA) 50µl de solución que contiene HS-LPGTG (I-A) a 20µM y le ANP-SP1 a 20µM.

- CNI-Sp2 (solución sin ANP) 50µl de solución que contiene LS-LPGTG (I-B) a 20µM y la enzima SrtA a 20µM.

- CNII-SP2 (solución sin srtA) 50µl de solución que contiene LS-LPGTG (I-B) a 20µM SP2 a 20µM.

Los tubos se incuban durante 24H a 37°C.

c.3 Purificación por bolas magnéticas y enzima AcTev

Se precipitan 25 µl de perlas magnéticas de agarosa Ni-NTA (Qiagen), se retira el sobrenadante. Se añaden sobre estas perlas 50µl de solución a purificar + 100µl de tampón de unión a proteínas (50mM NaH2PO4, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, pH8). Se incuba durante 1H30 sobre molino de rueda a temperatura ambiente a 7rpm. Se precipitan estas perlas y se recupera el sobrenadante n°1. Se realizan dos lavados de las perlas con 150 µl de tampón de unión a proteínas. Se recorta el marcador 6histidina por la enzima AcTev proteasa (Invitrogen) 10µl de 5X Tev Buffer, 5µl de 0,01 M de DTT, 0,5µl de enzima AcTev proteasa, 34,5µl de H2O, se incuba durante 4h a 30°C. Se precipitan las perlas, se recupera el sobrenadante n°2 (que contiene las moléculas que han sufrido la transpeptidación). Se realizan dos lavados de las perlas con 150 µl de tampón de unión a proteínas. Se eluyen las proteínas todavía presentes en las perlas por 50µl de elución de tampón de proteína (50mM NaH2PO4, 300 mM NaCl, 250 mM imidazol, pH8) durante 1h a temperatura ambiente sobre molino de rueda a 7 rpm. Se precipitan las perlas y se recupera el sobrenadante n°3.

c.4 Puesta en evidencia de la fusión (véase la figura 17).

Para SP1 y respectivamente SP2, se depositan 2 µl de cada sobrenadante (ensayo, CNI, CNII) recuperados sobre una membrana de nitrocelulosa proteica (Whatman). Se secan los depósitos durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se saturan con una solución de leche al 5%/TBS1X pH 7,6 a 4°C durante 20 minutos. Se hibrida la membrana durante la noche a 4°C bajo una ligera agitación en un tampón de leche al 5%/TBS1X pH 7,6 que contiene 50 pM de secuencias, marcadas por fluorescencia en Cy-3 y 6-FAM respectivamente, complementarias del ANP-SP1 o del ANP-SP2 respectivamente. Se realizan tres lavados de 15 minutos de la membrana con una solución de leche al 5%/TBS1X pH 7,6. Se escanea con Typhoon 8600 (Amersham Biosciences).

Se presentan los resultados, demuestran la fusión entre la molécula SP1 y SP2 con los péptidos HS-LPGTG y LS-LPGTG respectivamente para obtener SP1(I-II) y SP2(I-II).

d) Auto-ensamblaje de la quimera.

d.1) Hibridación de las moléculas SP1 (i-ii) con las moléculas SP2 (I-II)

Se ponen a hibridar durante 1h a 37°C, 12,5µl de sobrenadante n°2 producido en C.3 (véase anteriormente) de moléculas SP1(I-II) y 12,5 µl de sobrenadante n°2 producido en C.3 (véase anteriormente) de moléculas SP2 (I-II) + 25 µl de tampón neutro (200 µl de glicerol 99%, 33 µl de tris 3M pH6,8, 267µl de H2O).

d.2) Verificación de la funcionalidad de la molécula (véase la figura 18).

Se depositan 5 veces 2 µl de solución obtenida en D.1 sobre una membrana de nitrocelulosa proteica (Whatman) con un secado de 10 minutos entre cada depósito a fin de formar una zona de depósito o mancha.

Se efectúan dos controles tales que:

a) 2 µl de anticuerpos anti-HEL (Tebu-bio) a 0,1 µg/µl y b) 5 veces 2 µl de anticuerpos anti-HEL (Tebu-bio) a 10 µM (concentración comparable a la molécula emparejada) se depositan respectivamente en la misma membrana con un secado de 10 minutos entre cada depósito a temperatura ambiente a fin de formar respectivamente otras dos zonas de depósitos.

La membrana de nitrocelulosa se satura entonces por una solución de tampón de super bloqueo (Thermofisher) a 4°C durante 20 minutos, después se hibridan durante la noche a 4°C bajo una ligera agitación, con una solución que contiene 250nM de antígeno HEL (Fluka) marcado Dylight488 (Thermofisher) en tampón de super bloqueo. Se realizan tres lavados de 15 minutos de la membrana con un tampón de super bloqueo. Se escanea con Typhoon 8600 (Amersham Biosciences).

Los resultados de la figura (figura 18) demuestran que la proteína quimérica captura su antígeno y por lo tanto es funcional después de la etapa de auto-ensamblaje por hibridación.

e) Ejemplo de ANPZIMA: Escisión del PBS (HIV-1) (véase la figura 19)

Una solución de ARN "Primer Binding Sequence" (o PBS) del VIH-1 de 18 bases (5' UGGCGCCCGAACAGGGAC 3'; SEC ID nº 10) a 10 µM en H₂O se mezcla mol a mol, es decir una solución de ANPzima (N' TCCCTGHDTC C') a 10 µM en NMP 10%, es decir a una solución de NMP al 10%. Se incuban las mezclas durante 4h a 37°C. Las mezclas se depositan bien en un gel nativo al 20% de acrilamida (1,5 ml de TBE10X, 7,5 ml de acrilamida/bis 19:1 (Biorad), 6 ml de H₂O, 87,5 µl de APS 10% y 7,5 µl de temed (Sigma)); o bien en un gel desnaturalizante al 20% de acrilamida (7,2 g de urea (Sigma), 1,5 ml de TBE10X, 7,5 de acrilamida/bis 19:1 (Biorad), 6 ml de H₂O, 87,5 µl de APS 10% y 7,5 µl de temed (Sigma)). Después de la migración a 100V y 200 mA durante 1h30, los geles se muestran mediante bromuro de etidio.

El análisis de los geles muestra que la ANPZIMA se hibrida con el PBS y es capaz de escindir la molécula de PBS.

REFERENCIAS

David Baulcombe. 2002. An RNA Microcosm. Science, 297: 2002-2003.

Rong Fan, Ophir Vermesh, Alok Srivastava, Brian K H Yen, Lidong Qin, Habib Ahmad, Gabriel A Kwong, Chao-Chao Liu, Juliane Gould, Leroy Hood & James R Heath. 2008. Integrated barcode chips for rapid, multiplexed analysis of proteins in microliter quantities of blood. Nature Biotechnology. Vol. 26, nº 12: 1373 - 1378.

Muthiah Manoharan, Kathleen L. Tivel y P. Dan Cook. 1995. Lipidic nucleic acids. Tetrahedron Letters. Vol. 36, nº 21: 3651-3654.

Indriati Pfeiffer and Fredrik Höök. 2004. Bivalent Cholesterol-Based Coupling of Oligonucleotides to Lipid Membrane Assemblies. J. Am. Chem. Soc. 126 (33): 10224-10225.

Snehlata Tripathi, Binay Chaubey, Sabyasachi Ganguly, Dylan Harris, Ralph A Casale, y Virendra N. Pandey. 2005. Anti-VIH-1 activity of anti-TAR polyamide nucleic acid conjugated with various membrane transducing peptides. Nucl. Acids Res. Vol. 33, nº 13: 4345-4356.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> COMMISARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE (CEA)

<120> SEMI-ANTICUERPOS A AUTOENSAMBLAJE

<130> B08781A_AD/SL/CAL

<140> PCT/FR2011/XXXXXX

<141> 2011-04-08

<150> FR 10/01516

<151> 2010-04-09

<160> 11

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 15

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Polinucleótido (ácido nucleico peptídico)

<400> 1

gtcccguccc cgcca 15

<210> 2
 <211> 8
 <212> PRT
 5 <213> Artificial
 <220>
 <223> Péptido
 <220>
 <221> características diversas
 10 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <400> 2
 Leu Pro Xaa Thr Ala Ala Ala
 1 5
 15 <210> 3
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 20 <223> Polinucleótido
 <400> 3
 tcaagtagct tcagaatctt ttccccc 28
 25 <210> 4
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Polinucleótido
 30 <400> 4
 ggctagctac aacga 15
 35 <210> 5
 <211> 17
 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> antisentido
 <400> 5
 40 gucccugucg ggcgcca 17
 45 <210> 6
 <211> 18
 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> antisentido
 <220>
 <221> características diversas
 50 <222> (1)..(19)
 <223> Secuenci complementaria
 <400> 6
 cagggacaag cccgcggu 18
 55 <210> 7
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 60 <223> Péptido
 <220>
 <221> características diversas
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 65 <400> 7

ES 2 565 344 T3

Leu Pro Xaa Thr Gly
1 5

5
<210> 8
<211> 669
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> (I-A) HS-LPGTG: parte variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-HEL (Hen Egg Lisozima)
<400> 8
cagggtgcagc tgaagaatc tgggtccgggt ctggtggcgc cgtctcagtc tctgtctatt 60
10 acctgcaccg tgtctggttt ttctctgacc ggttatgggtg tgaactgggt gcgtcagccg 120
ccgggtaaag gtctggaatg gctgggtatg atttgggggtg atggtaacac cgattataac 180
tctgcgctga aatctcgtct gtctatttct aaagataact ctaaactctca ggtgtttctg 240
aaaatgaact ctctgcatac cgatgatacc gcgcgttatt attgcgcgcg tgaacgtgat 300
tatcgtctgg attattgggg tcagggtacc accctgaccg tgtcttctgc gtctaccacc 360
ccgccgtctg tgtttccgct ggccgggggt tctgcggcgc agaccaactc tatggtgacc 420
ctgggttgcc tgggtgaaagg ttattttccg gaaccgggtga ccgtgacctg gaactctggt 480
tctctgtctt ctggtgtgca tacctttccg gcggtgctgc agtctgatct gtataccctg 540
tcttcttctg tgaccgtgcc gtcttctccg cgtccgtctg aaaccgtgac ctgcaacgtg 600
gcgcacccgg cgtcttctac caaagtggat aaaaaattg tgccgcgtga ttgcctgccg 660
ggtaccggt 669

15
<210> 9
<211> 657
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> (I-B) LS-LPGTG: parte variable de la cadena ligera del anticuerpo anti-HEL (Hen Egg Lisozima)
<400> 9
gatattcaga tgaccagtc tccggcgtct ctgtctgct ctgtgggtga aaccgtgacc 60
attacctgcc gtgcgtctgg taacattcat aactatctgg cgtgggtatca gcagaaacag 120
ggtaaactctc cgcagctgct ggtgtattat accaccaccc tggcggtatgg tgtgccgtct 180
cgtttttctg gttctggttc tggtagccag tattctctga aaattaactc tctgcagccg 240
gaagattttg gttcttatta ttgccagcat ttttgggtcta cccgcgtac ctttgggtgg 300
ggtaccaaac tggaaattaa acgtgcggat gcggcgccga ccgtgtctat ttttccgccg 360
tcttctgaac agctgacctc tgggtggtgcg tctgtggtgt gctttctgaa caacttttat 420
ccgaaagata ttaacgtgaa atggaaaatt gatggttctg aacgtcagaa cgggtgtgctg 480
aactcttgga ccgatcagga ttctaaagat tctacctatt ctatgtcttc taccctgacc 540
ctgaccaaag atgaatatga acgtcataac tcttatacct gcgaagcgac ccataaaacc 600
20 tctacctctc cgattgtgaa atcttttaac cgtaacgaat gcctgccggg taccggt 657

25
<210> 10
<211> 18
<212> ARN
<213> Artificial
<220>
<223> ARN "Secuencia de unión del cebador" (o PBS) del VIH-1
<400> 10
uggcgccga acagggac 18

30
<210> 11
<211> 63

ES 2 565 344 T3

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> CCR5-WT (775-837)

5 <400> 11

agctctcatt ttccatacag tcagtatcaa ttctggaaga atttccagac attaaagata 60

gtc 63

REIVINDICACIONES

1. Molécula quimérica denominada "semianticuerpo" caracterizada por que comprende o consiste en dos moléculas quiméricas A y B que comprenden o que consisten en:

(i) un dominio polipeptídico característico de un dominio variable (o DV) de una cadena pesada o de una cadena ligera de un anticuerpo, estando este dominio polipeptídico posicionado en un extremo de las moléculas quiméricas A y B, siendo el dominio polipeptídico (i) de una de las dos moléculas quiméricas, A o B, característico de un DV de una cadena ligera de un anticuerpo, y siendo el dominio polipeptídico (i) de la otra molécula quimérica, respectivamente, característico de un DV de una cadena pesada de un anticuerpo; y

(ii) un dominio nucleotídico monocatenario que consiste en un polinucleótido, o un análogo de un polinucleótido, siendo el dominio nucleotídico de A y el de B capaces de emparejarse en una estructura bicatenaria en medio hídrico;

siendo el dominio polipeptídico (i) y el dominio nucleotídico (ii) de cada una de las moléculas quiméricas A y B unidos por una unión covalente, y siendo el dominio (ii) de la molécula quimérica A y el de la molécula quimérica B emparejados en una estructura bicatenaria en medio hídrico.

2. Semianticuerpo según la reivindicación 1, en el que el dominio polipeptídico (i) y el dominio nucleotídico (ii) de una molécula quimérica A o B están unidos por una o varias moléculas de unión (o enlazadores), comprendiendo dicho o dichos enlazadores o consistiendo en un péptido o un polipéptido, un polinucleótido o un análogo de un polinucleótido, una cadena policarbonada, etilendiamina, polilisina, beta-alanina, y un azúcar.

3. Semianticuerpo según la reivindicación 1 o 2 en el que:

- en la molécula quimérica A, el extremo C-terminal del dominio polipeptídico (i) está unido de manera covalente al extremo 3' de un ácido nucleico o al extremo C-terminal de un análogo de un polinucleótido constituido por un ácido nucleico peptídico (ANP); y/o

- en la molécula quimérica B, el extremo C-terminal del dominio polipeptídico (i) está unido de manera covalente al extremo 5' del ácido nucleico o al extremo N-terminal de un análogo de un polinucleótido constituido por un ácido nucleico peptídico (ANP).

4. Semianticuerpo según la reivindicación 3, en el que:

- en la molécula quimérica A, la unión covalente está establecida por medio del grupo NH_2 de la cadena lateral de una lisina unida al extremo C terminal de dicho ANP por una unión peptídica; y/o

- en la molécula quimérica B, la unión covalente está establecida por medio de una unión peptídica o amida con uno de los grupos NH_2 de una lisina, estando dicha lisina unida, por su grupo COOH , al extremo N-terminal de dicho ANP.

5. Semianticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la molécula quimérica A y/o la molécula quimérica B comprende o comprenden además uno o varios elementos seleccionados entre:

* un dominio marcador y/o un dominio biológicamente activo, que es un polinucleótido o un análogo que comprende o que consiste en una secuencia marcadora (o secuencia TAG) y/o una secuencia biológicamente activa que permite bloquear la expresión de los genes diana, siendo dicho polinucleótido o dicho análogo seleccionado entre los elementos siguientes:

- un ácido nucleico, un ácido nucleico antisentido o un ácido nucleico que tiene una actividad endonucleasa;

- un ANP, un ANP antisentido o un ANP que tiene una actividad endonucleasa (ANPzima),

- un LNA, un ácido nucleico metilfosfonato, un ácido nucleico metilsulfonato, un ácido nucleico o desoxi-nucleico modificado, una ADNzima, una ARNzima o una ANPzima, un micro ARN (miRNA), una secuencia mixta ANP/ácido nucleico o ANP/péptido, un dímero ADN/ANPzima; y

- una combinación de al menos dos de estos elementos,

estando dicho dominio marcador o el dominio biológicamente activo unido al extremo libre del dominio nucleotídico (ii) de la molécula quimérica A o B o al extremo libre de un enlazador unido al dominio nucleotídico (ii) de la molécula quimérica A o B, siendo dicho enlazador tal como se define en la reivindicación 2, y efectuándose la unión de dicho dominio marcador o dicho dominio biológicamente activo por medio de una unión lábil en medio reductor, o por medio de una unión persistente en medio reductor; y

* un elemento lipófilo seleccionado entre una secuencia, un grupo químico o un compuesto químico lipófilo, que comprende uno o varios grupo(s) y/o compuesto(s) químico(s) aromático(s), estando dicho elemento lipófilo posicionado en el extremo libre de la molécula quimérica A o B.

- 5 6. Semianticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que:
- * la primera molécula quimérica, A o B, comprende o consiste en:
- 10 - un dominio polipeptídico (i) tal como se define en la reivindicación 1, y los dominios siguientes, posicionados sucesivamente en el orden siguiente, a partir del extremo C-terminal del dominio polipeptídico (i):
- un enlazador tal como se define en la reivindicación 2,
- 15 - un dominio nucleotídico (ii) tal como se define en la reivindicación 1,
- un enlazador tal como se define en la reivindicación 2, unido por medio de una unión lábil en medio reductor o por medio de una unión persistente en medio reductor, a
- 20 - un dominio marcador o un dominio biológicamente activo tal como se define en la reivindicación 5, y
- un elemento lipófilo tal como se define en la reivindicación 5; y
- * la segunda molécula quimérica, respectivamente B o A, comprende o consiste en:
- 25 - un dominio polipeptídico (i) tal como se define en la reivindicación 1, siendo este dominio y el dominio polipeptídico (i) de la primera molécula quimérica característicos de DV de un mismo anticuerpo, siendo uno de estos dominios característico de un DV de la cadena ligera de un anticuerpo dado, y siendo el otro característico de un DV de la cadena pesada del mismo anticuerpo,
- 30 y los dominios siguientes, posicionados sucesivamente en el orden siguiente, a partir del extremo C-terminal del dominio polipeptídico (i):
- un enlazador tal como se define en la reivindicación 2, y
- 35 - un dominio nucleotídico (ii) tal como se define en la reivindicación 1.
7. Semianticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que:
- 40 * la primera molécula quimérica, A o B, comprende o consiste en:
- un dominio polipeptídico (i) tal como se define en la reivindicación 1, y los dominios siguientes, posicionados sucesivamente en el orden siguiente, a partir del extremo C-terminal del dominio polipeptídico (i):
- 45 - un enlazador tal como se define en la reivindicación 2,
- un dominio nucleotídico (ii) tal como se define en la reivindicación 1, denominado S1
- un enlazador tal como se define en la reivindicación 2, unido por medio de una unión lábil en medio reductor a
- 50 - un dominio marcador o un dominio biológicamente activo tal como se define en la reivindicación 5, unido por medio de una unión covalente a
- un enlazador tal como se define en la reivindicación 2,
- 55 - un segundo dominio nucleotídico denominado S3, que comprende o que consiste en un polinucleótido, o un análogo de un polinucleótido, y que es capaz de emparejarse en una estructura bicatenaria con un dominio nucleotídico complementario denominado S4 en medio hídrico; y
- 60 - un enlazador tal como se define en la reivindicación 2,
- estando el dominio S3 o dicho enlazador unidos al extremo C-terminal de un segundo dominio polipeptídico, denominado DV2a, que es característico de un DV de una cadena pesada o de una cadena ligera de un anticuerpo, siendo DV2a y el dominio polipeptídico (i) de la molécula quimérica A o B característicos de DV de anticuerpos
- 65 distintos, y

- un elemento lipófilo tal como se define en la reivindicación 5, estando dicho elemento lipófilo unido a DV2a por medio de una unión lábil en medio reductor o por medio de un enlazador tal como se define en la reivindicación 2, comprendiendo dicho enlazador una unión lábil en medio reductor o estando unido a DV2a por medio de una unión lábil en medio reductor,

* la segunda molécula quimérica, respectivamente B o A, comprende o consiste en:

- un dominio polipeptídico (i) tal como se define en la reivindicación 1, siendo este dominio y el dominio polipeptídico (i) de la primera molécula quimérica característicos de DV de un mismo anticuerpo, siendo uno de estos dominios característico de un DV de la cadena ligera de un anticuerpo dado, y siendo el otro característico de un DV de la cadena pesada del mismo anticuerpo,

y los dominios siguientes, posicionados sucesivamente en el orden siguiente, a partir del extremo C-terminal del dominio polipeptídico (i):

- un enlazador tal como se define en la reivindicación 2, y

- un dominio nucleotídico (ii) tal como se define en la reivindicación 1, denominado S2, capaz de emparejarse en una estructura bicatenaria con S1 en medio hídrico.

8. Semianticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que:

* la primera molécula quimérica, A o B, comprende o consiste en:

- un dominio polipeptídico (i) tal como se define en la reivindicación 1, y los dominios siguientes, posicionados sucesivamente en el orden siguiente, a partir del extremo C-terminal del dominio polipeptídico (i):

- un enlazador tal como se define en la reivindicación 2,

- un dominio nucleotídico (ii) tal como se define en la reivindicación 1, denominado S5,

- un enlazador tal como se define en la reivindicación 2, comprendiendo dicho enlazador una unión lábil en medio reductor o estando unido por medio de una unión lábil en medio reductor a

- un segundo dominio nucleotídico denominado S4, que comprende o que consiste en un polinucleótido, o un análogo de un polinucleótido, y que es capaz de emparejarse en una estructura bicatenaria con un dominio nucleotídico complementario denominado S3, en medio hídrico; y

- un enlazador tal como se define en la reivindicación 2,

- estando el dominio S4 o dicho enlazador unido al extremo C-terminal de un segundo dominio polipeptídico, denominado DV2b, que es característico de un DV de una cadena pesada o de una cadena ligera de un anticuerpo, siendo DV2b y el dominio polipeptídico (i) de la primera molécula quimérica, característicos de DV de anticuerpos distintos, y

- un elemento lipófilo tal como se define en la reivindicación 5, estando dicho elemento lipófilo unido a DV2b por medio de un enlace lábil en medio reductor o por medio de un enlazador tal como se define en la reivindicación 2, comprendiendo dicho enlazador una unión lábil en medio reductor o estando unido a DV2a por medio de una unión lábil en medio reductor; y

* la segunda molécula quimérica, respectivamente B o A, comprende o consiste en:

- un dominio polipeptídico (i) tal como se define en la reivindicación 1, siendo este dominio y el dominio polipeptídico (i) de la primera molécula quimérica, característicos de DV de un mismo anticuerpo, siendo uno de estos dominios característico de un DV de la cadena ligera de un anticuerpo dado, y siendo el otro característico de un DV de la cadena pesada del mismo anticuerpo,

y los dominios siguientes, posicionados sucesivamente en el orden siguiente, a partir del extremo C-terminal del dominio polipeptídico (i):

- un enlazador tal como se define en la reivindicación 2, y

- un dominio nucleotídico (ii) tal como se define en la reivindicación 1, denominado S6, capaz de emparejarse en una estructura bicatenaria con S5 en medio hídrico.

9. Semianticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1, 7 y 8, en el que dicho polinucleótido es un ADN o un

ARN.

10. Semianticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1, 7 y 8, en el que dicho análogo de un polinucleótido es un ácido nucleico peptídico (ANP), un ácido nucleico bloqueado (o LNA: Locked Nucleic Acid), un ácido nucleico metilfosfonato, o un ácido nucleico tioato.

11. Semianticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que los dominios polipeptídicos (i) son característicos de dominios DV de uno o varios anticuerpo(s) dirigido(s):

- contra un antígeno presente a la superficie de células de mamífero, o

- contra un antígeno viral, o

- contra un antígeno bacteriano, o

- contra una retrotranscriptasa.

12. Semianticuerpo según la reivindicación 11, en el que dicho antígeno presente en la superficie de células de mamífero es la proteína CD4, dicho antígeno viral es la proteína de revestimiento externo de un virus del VIH, dicho antígeno bacteriano es una proteína de un revestimiento bacteriano, o dicha retrotranscriptasa es una retrotranscriptasa de VIH-1 o VIH-2.

13. Semianticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 12, en el que el dominio marcador y/o el dominio biológicamente activo comprende o consiste en dos ANPzimas, estando dichas ANPzimas unidas por sus extremos N-terminales o C-terminales por medio de un mismo enlazador.

14. Semianticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 5, 6-8, en el que la unión lábil en medio reductor es un puente disulfuro o en el que la unión persistente en medio reductor es una unión establecida con un ácido maleimida.

15. Vesícula que comprende uno o varios semianticuerpo(s) tal(es) como se define(n) en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, comprendiendo dicha vesícula:

* un semianticuerpo tal como se define en la reivindicación 7, denominado HAC_1, en el que

- el dominio polipeptídico (i) de las moléculas quiméricas A y B es característico de un DV de un anticuerpo dirigido contra un primer antígeno presente en la superficie de células de mamífero o dirigido contra un antígeno viral, y

- el dominio polipeptídico DV2a es característico de un DV de un anticuerpo anti-retrotranscriptasa; o

* un semianticuerpo tal como se define en la reivindicación 8, denominado HAC_2, en el que

- el dominio polipeptídico (i) de las moléculas quiméricas A y B es característico de un DV de un anticuerpo dirigido contra un segundo antígeno presente en la superficie de las células de mamíferos, o dirigido contra un antígeno viral; y

- el dominio polipeptídico DV2b es característico de un DV del mismo anticuerpo que el dominio DV2a, siendo DV2a o DV2b característicos de un DV de la cadena ligera de un anticuerpo dado, y siendo el otro dominio, respectivamente DV2b o DV2a, característico de un DV de una cadena pesada del mismo anticuerpo.

16. Vesícula según la reivindicación 15, siendo dicha vesícula un liposoma constituido de una membrana de partículas del virus de VIH-1 o VIH-2, en el que dicho antígeno viral es la proteína de revestimiento externo de un virus VIH, dicha anti-retrotranscriptasa es una anti-retrotranscriptasa de VIH-1 o VIH-2, o dicho segundo antígeno es la proteína CD4.

17. Partícula en la que están unidos uno o varios semianticuerpo(s) tal(es) como se definen en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 por medio

- de una o varias uniones lábiles en medio reductor; o

- de un ANP o de un ácido nucleico que comprende una secuencia complementaria de una secuencia nucleica de dicho semianticuerpo.

18. Partícula según la reivindicación 17, siendo dicha partícula una nanopartícula o Qdot.

19. Composición farmacéutica o terapéutica, que comprende, o que consiste en, o que consiste esencialmente en,

uno o varios semianticuerpo(s) tal(es) como se define(n) en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, o una o varias vesícula(s) tal(es) como se define(n) en la reivindicación 15 o 16, o una o varias partícula(s) tal(es) como se define(n) en la reivindicación 17 o 18, y, llegado el caso, un soporte, un diluyente y/o una vesícula farmacéuticamente aceptable.

5 20. Composición según la reivindicación 19, para una utilización como medicamento para la prevención y/o el tratamiento de un cáncer y/o de una enfermedad genética, y/o de una enfermedad infecciosa, y/o de una infección bacteriana.

10 21. Composición para una utilización según la reivindicación 20, en la que la enfermedad genética es una miopatía, y/o la enfermedad infecciosa es una infección por un lentivirus, y/o la infección bacteriana es una infección por una bacteria resistente a antibióticos.

15 22. Composición según la reivindicación 21, en la que la enfermedad infecciosa es una infección por VIH-1 o VIH-2.

23. Kit que comprende uno o varios semianticuerpo(s) tal(es) como se define(n) en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, una o varias vesícula(s) tal(es) como se define(n) en la reivindicación 15 o 16, una o varias partícula(s) tal(es) como se define(n) en la reivindicación 17 o 18, o una o varias composición(es) tales como se define(n) en cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22 y, llegado el caso, un prospecto.

20 24. Kit según la reivindicación 23, para una utilización tal como se define en la reivindicación 20.

25 25. Método para detectar y, llegado el caso, cuantificar, uno o varios antígenos de interés, eventualmente presentes en una muestra, comprendiendo dicho método o consistiendo en las etapas siguientes:

- la puesta en contacto de unos antígenos de la muestra con uno o varios semianticuerpo(s) tal(es) como se definen en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14;

30 - la detección de unos complejos eventualmente formados entre dicho o dichos semianticuerpos y uno o varios antígenos de la muestra;

- llegado el caso, la cuantificación del o los antígenos así detectados,

35 en el que los antígenos eventualmente presentes en la muestra biológica se han fijado previamente sobre un soporte sólido.

26. Chip, caracterizado por que comprende uno o varios semianticuerpo(s) tal(es) como se define(n) en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, estando dicho o dichos semianticuerpo(s) unido(s) sobre una o varias unidades de hibridación (o manchas) de dicho chip.

40 27. Método para detectar y, llegado el caso, cuantificar, uno o varios antígenos de interés eventualmente presentes en una muestra, comprendiendo dicho método o consistiendo en las etapas siguientes:

45 a) la puesta en contacto de unas unidades de hibridación (o manchas) de un chip de ácidos nucleicos con uno o varios semianticuerpo(s) tal(es) como se definen en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, siendo el semianticuerpo capaz de fijarse a una o varias unidad(es) de hibridación de dicho chip;

50 b) la puesta en contacto de unas unidades de hibridación del chip (o de las unidades del chip puestas en contacto con el semianticuerpo en la etapa a) con las proteínas o los antígenos de la muestra (o más generalmente con la muestra);

c) la detección de unos complejos eventualmente formados entre el semianticuerpo fijado sobre el chip y uno o varios antígenos de la muestra;

55 d) llegado el caso, la cuantificación del o los antígenos así detectados.

28. Kit que comprende o que consiste en:

60 a)

- un chip de ácido(s) nucleico(s); y

- uno o varios semianticuerpo(s) tal(es) como se definen en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, o una o varias composición(es) tales como se define(n) en la reivindicación 19; y

65 - llegado el caso, un prospecto; o

b)

- 5 - un chip de ácido(s) nucleico(s), que comprende una o varias unidad(es) de hibridación (o manchas) sobre las cuales se hibrida un semianticuerpo tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14; y
- llegado el caso, un prospecto.

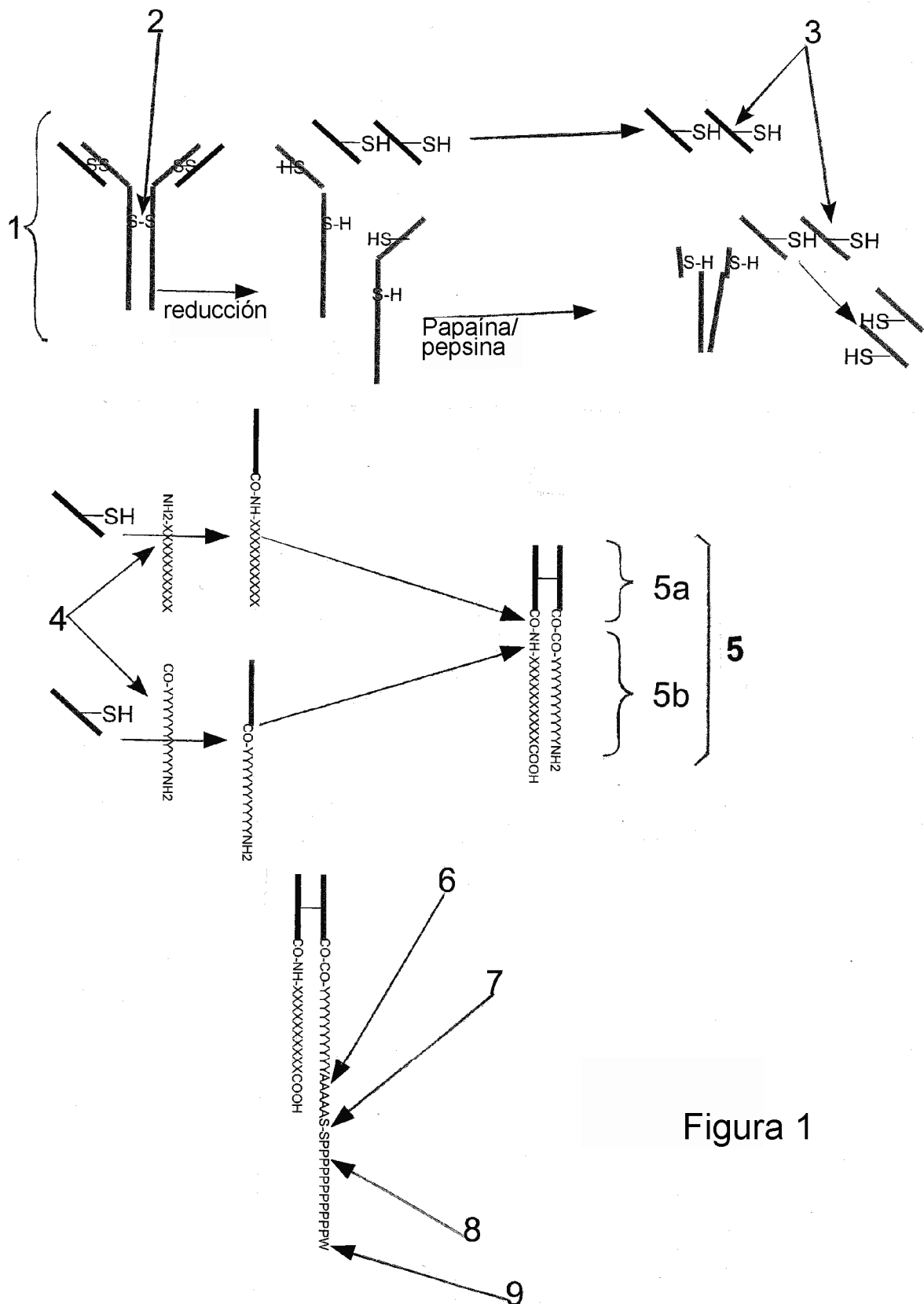


Figura 1

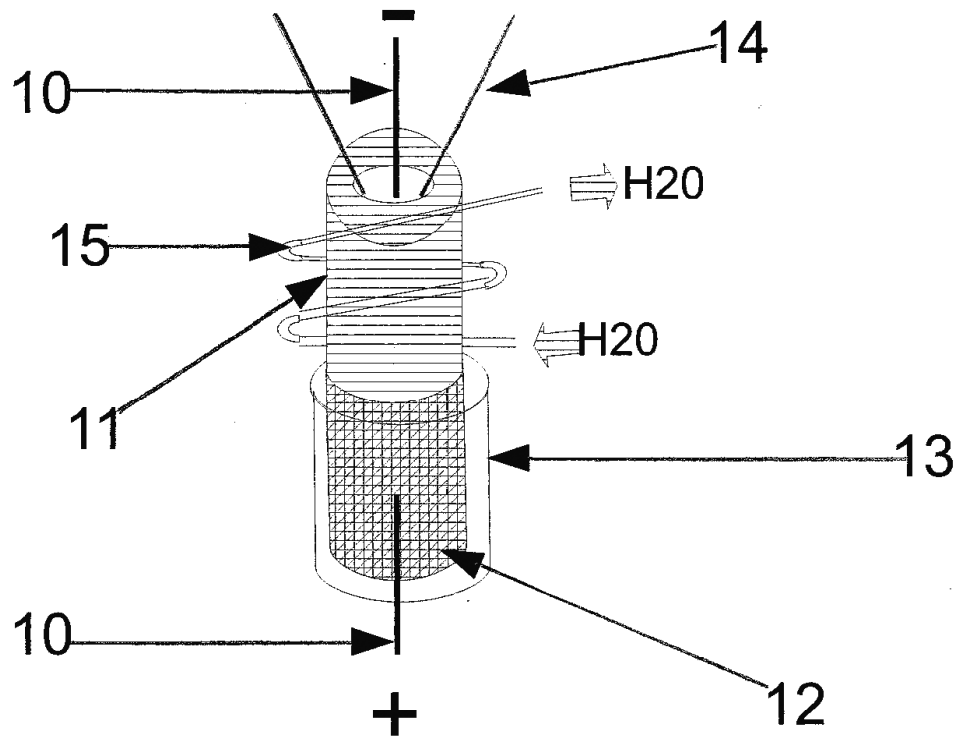


Figura 2

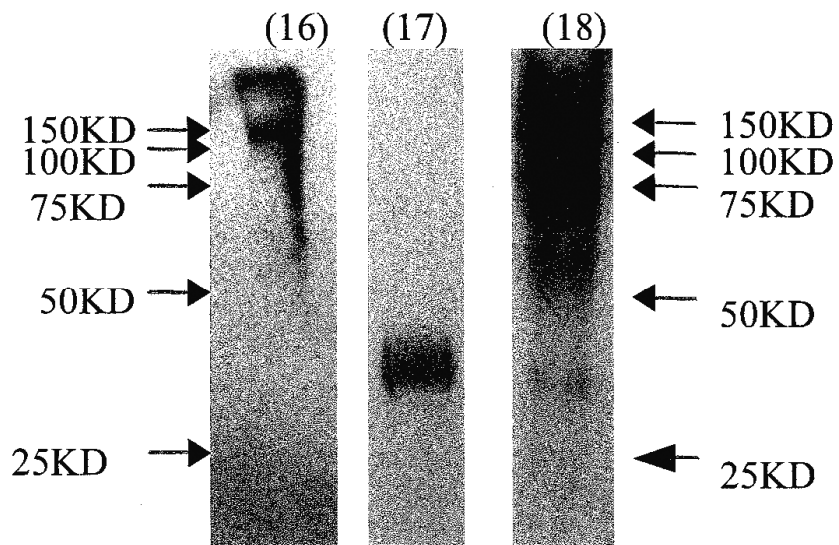


Figura 3

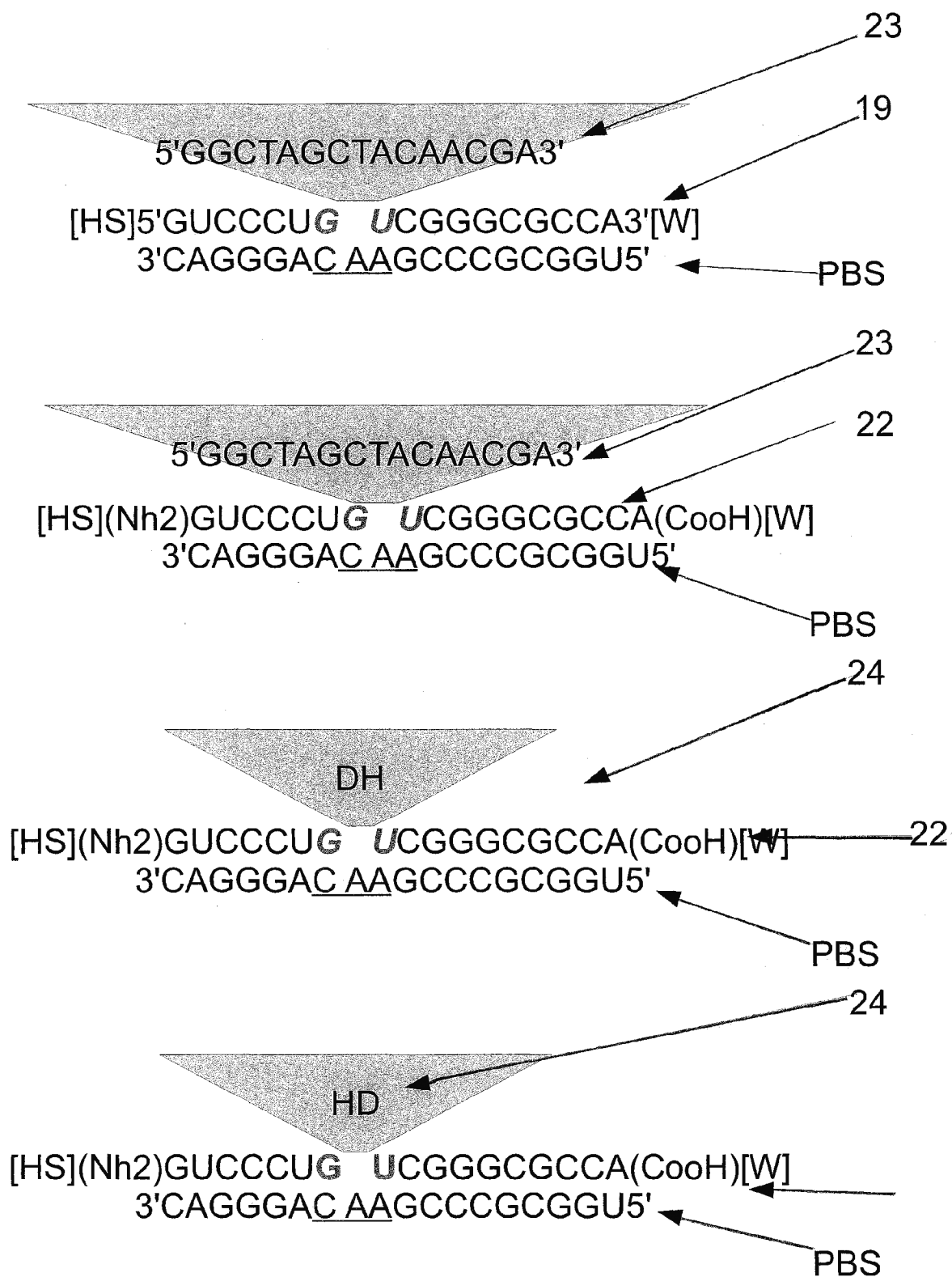


Figura 4

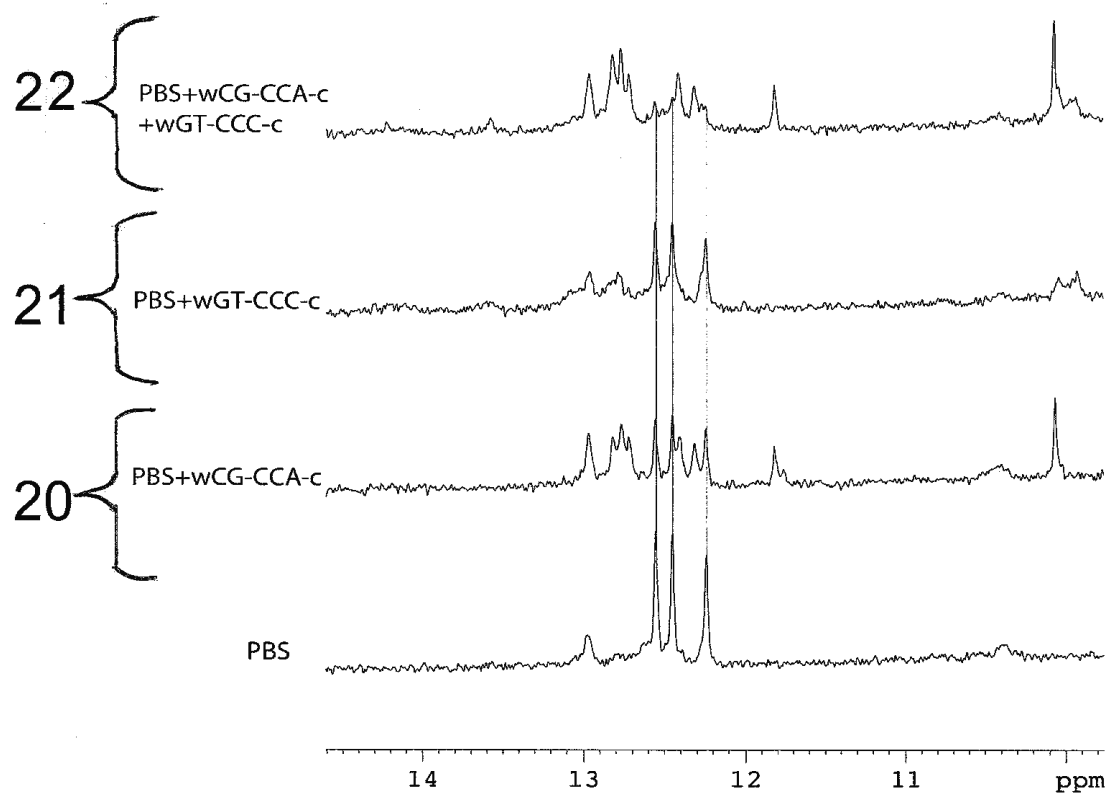
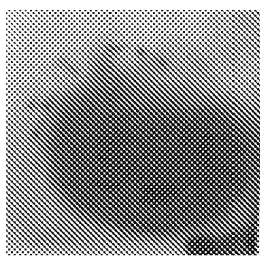
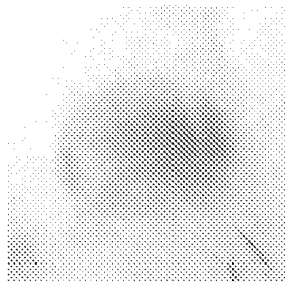


Figura 6



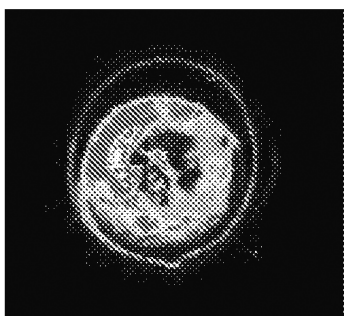
A



B

Figura 7

(1)



(2)

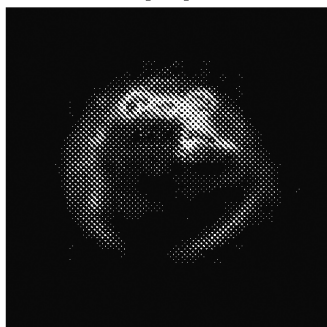
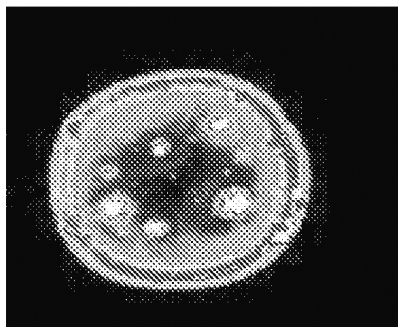


Figura 8

(1)



(2)

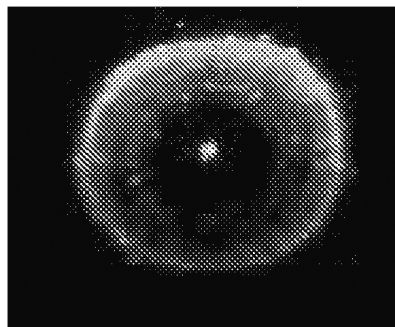


Figura 9

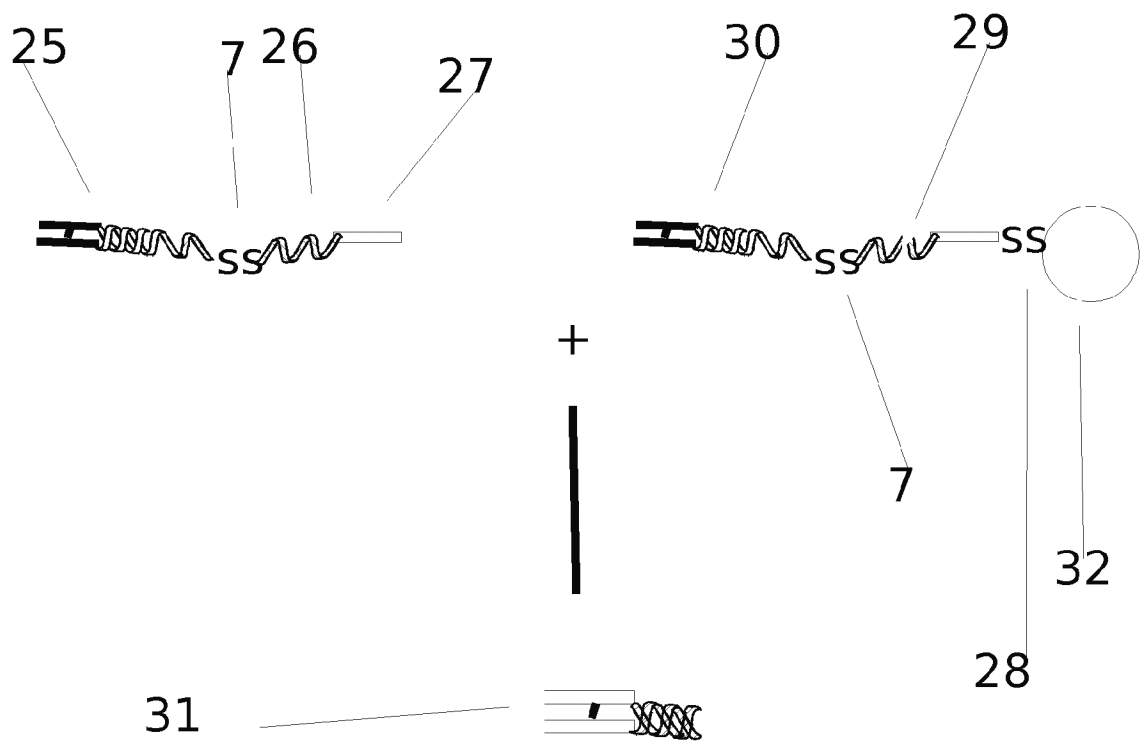


Fig10

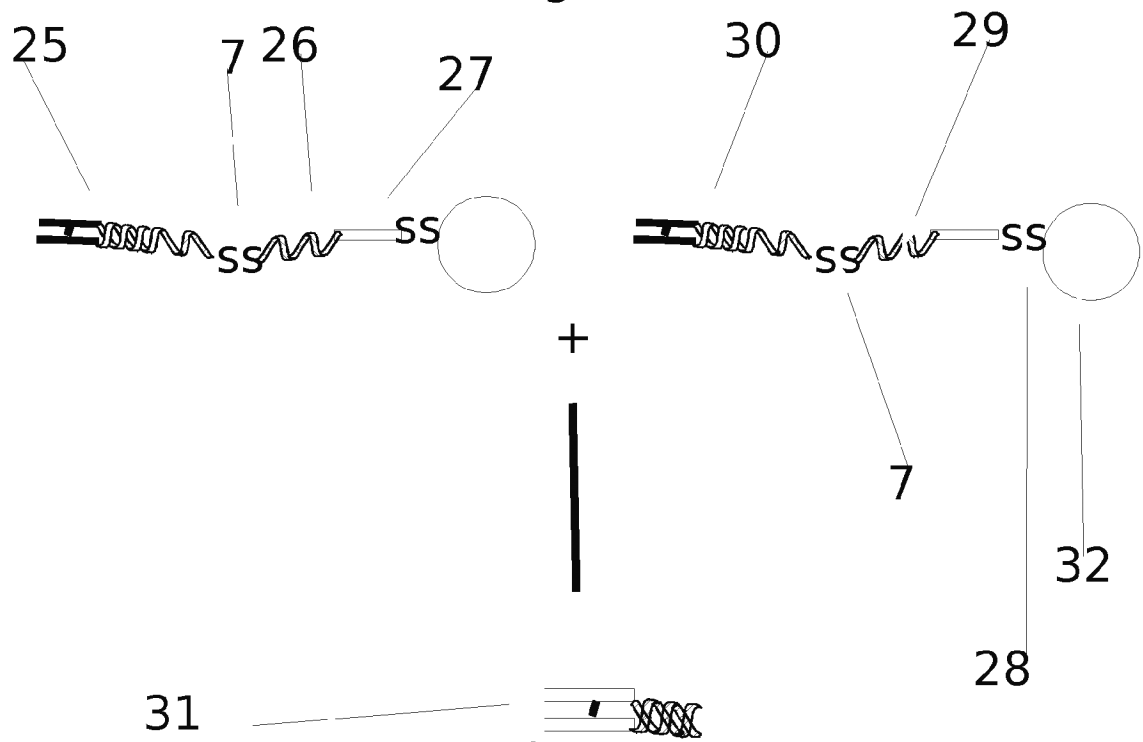


Fig11

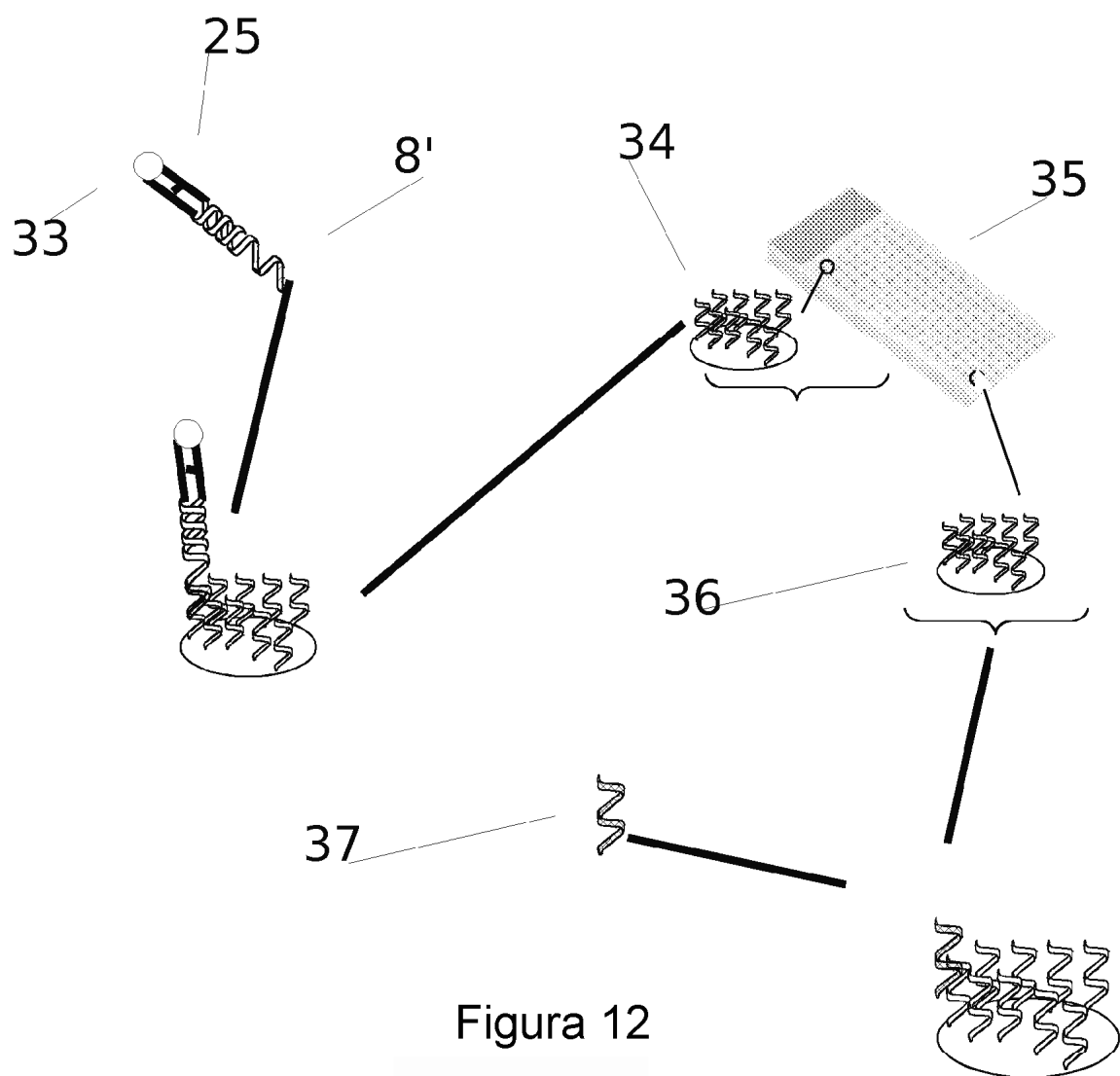


Figura 12

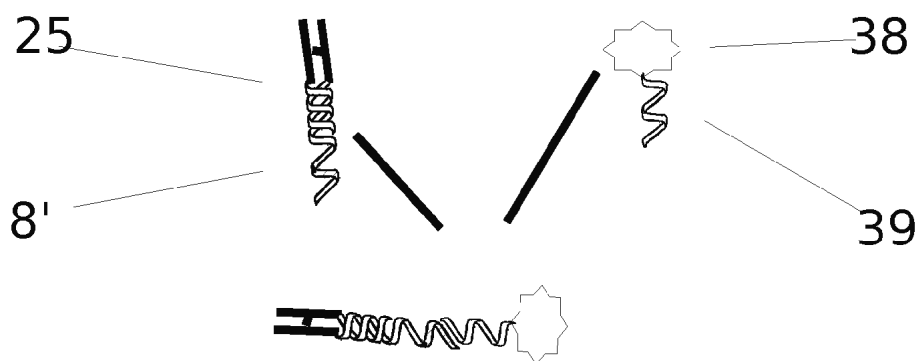


Fig13

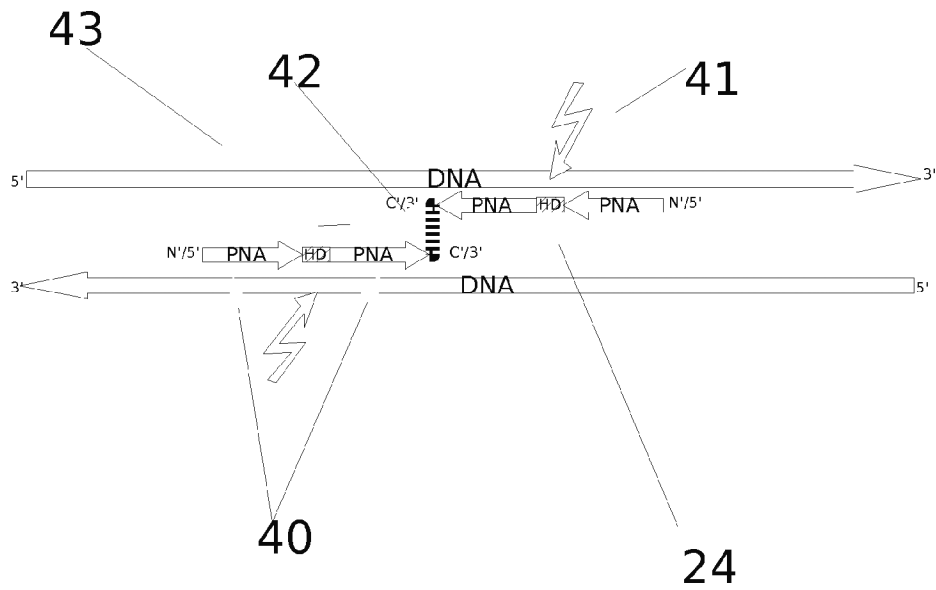


Fig14

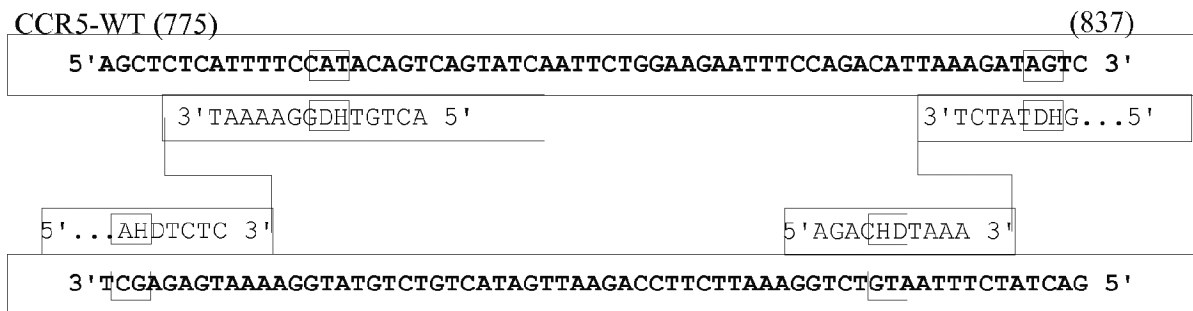


Fig15

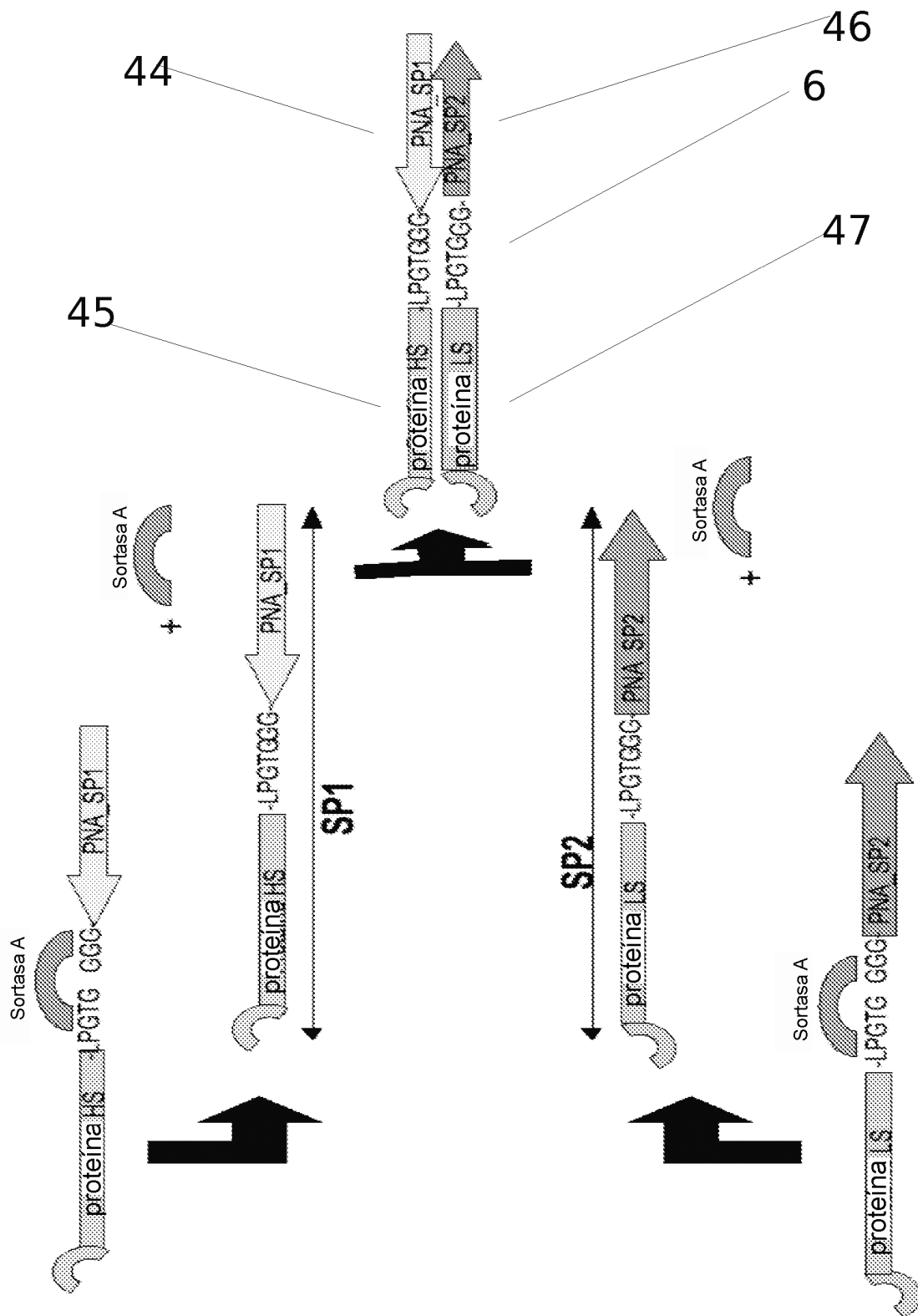


Fig16

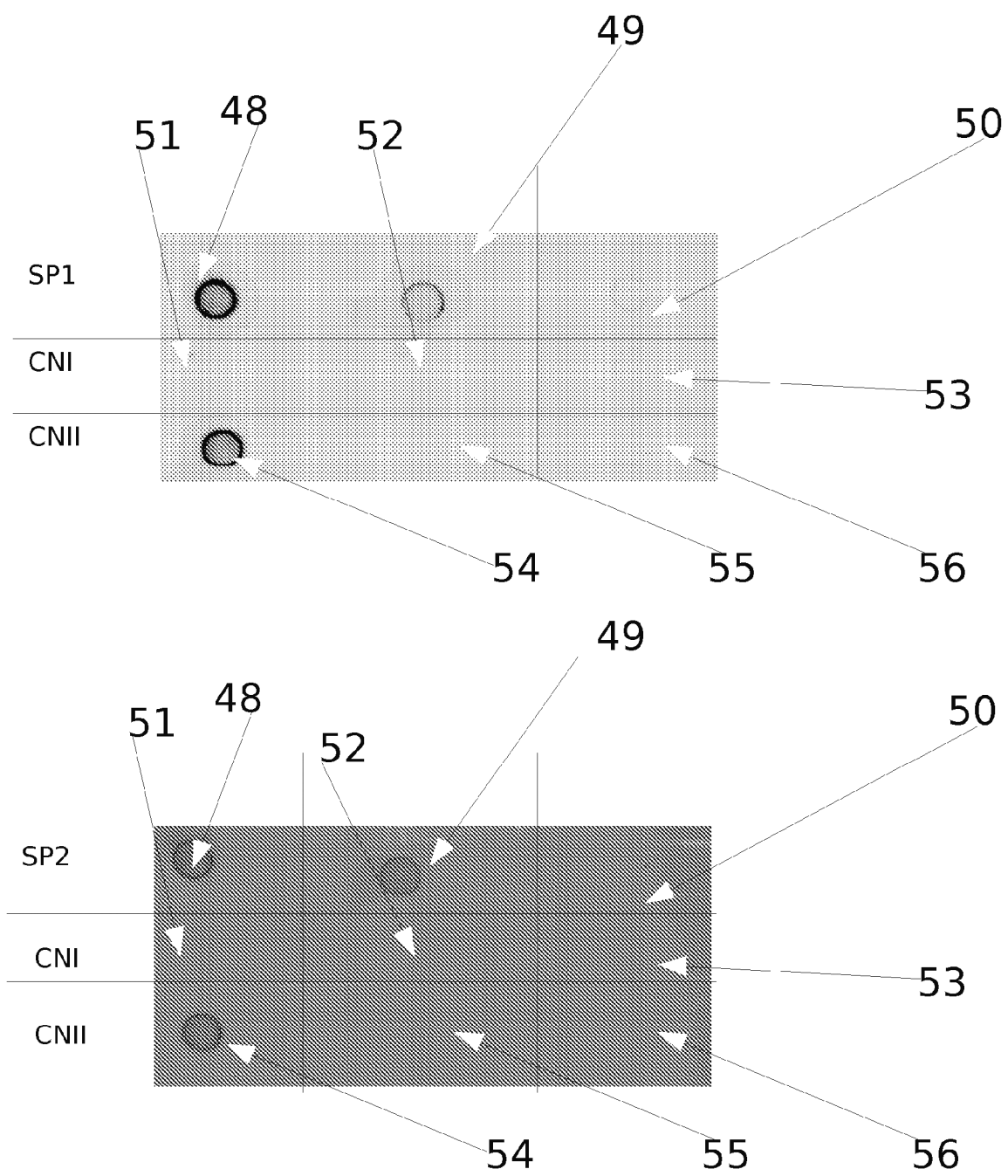


Fig17

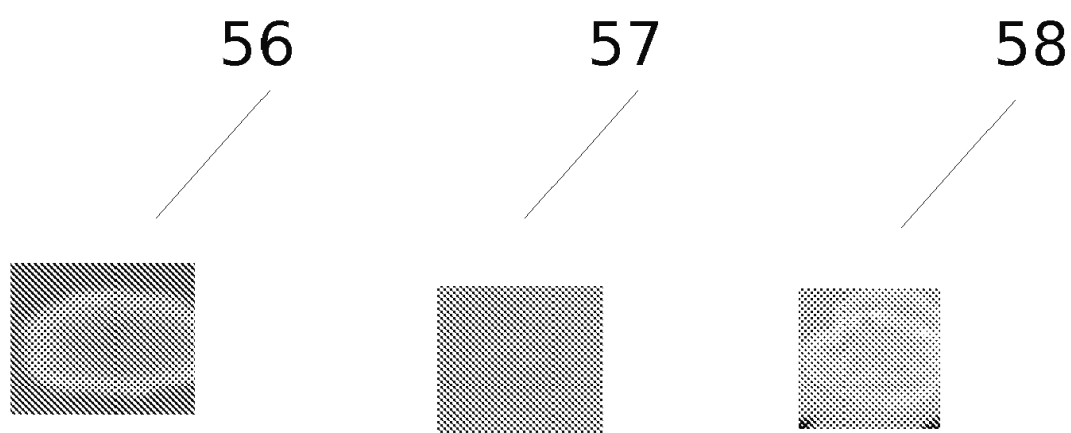


Fig18

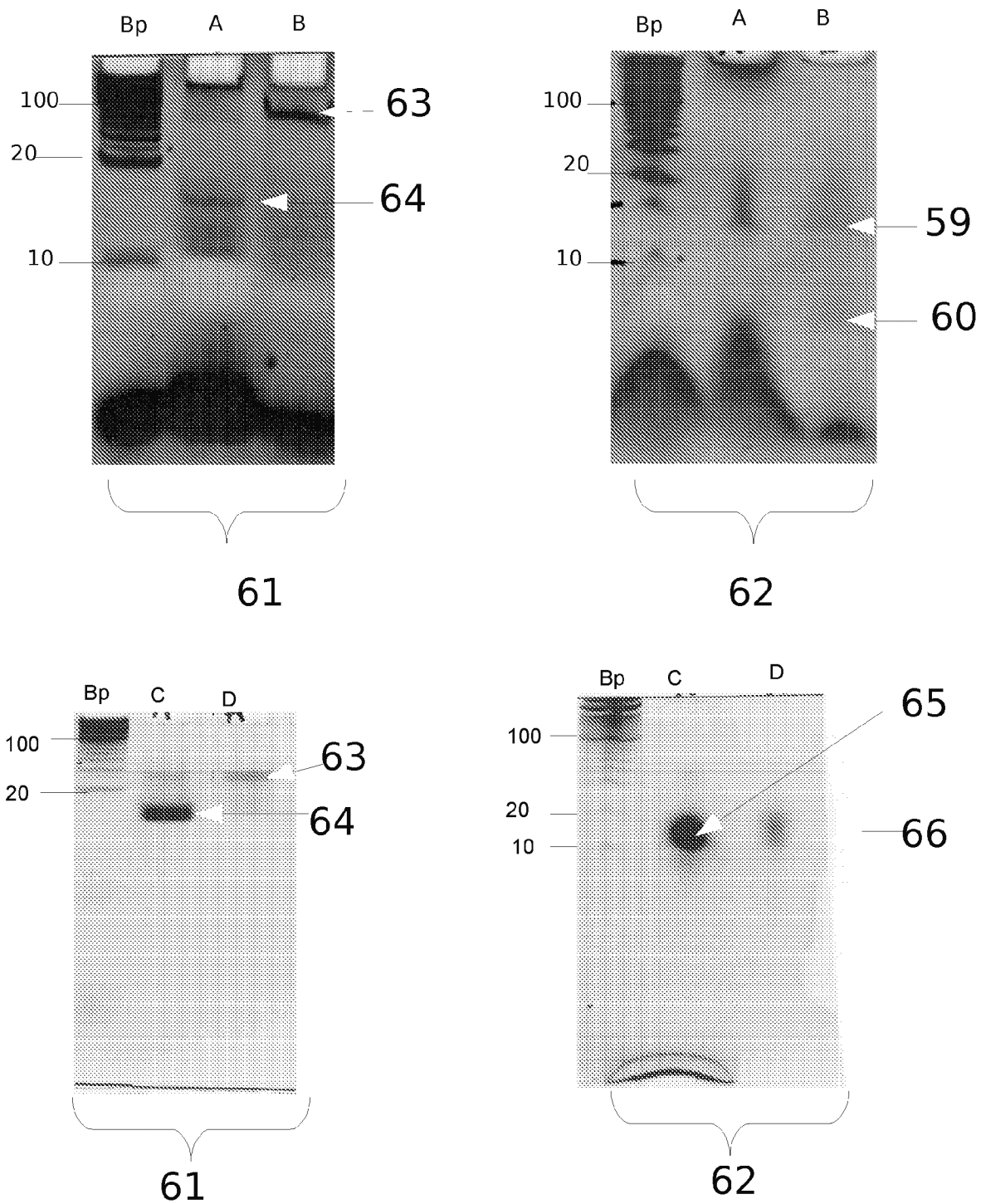


Fig19