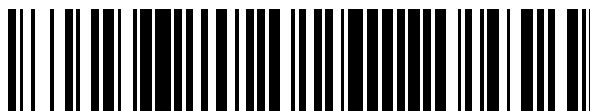


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 652 017**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

C07K 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.06.2002 PCT/IL2002/00478**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2002 WO02102299**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.06.2002 E 02733206 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.09.2017 EP 1409547**

54 Título: **Métodos y composiciones farmacéuticas para el engaño inmunitario, particularmente útiles en el tratamiento de cáncer**

30 Prioridad:

19.06.2001 US 298915 P
29.03.2002 US 108511

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.01.2018

73 Titular/es:

**TECHNION RESEARCH & DEVELOPMENT
FOUNDATION LIMITED (50.0%)
Senate House, Technion City
3200004, Haifa, IL y
TEVA PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**REITER, YORAM y
LEV, AVITAL**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 652 017 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

Métodos y composiciones farmacéuticas para el engaño inmunitario, particularmente útiles en el tratamiento de cáncer

Campo y antecedentes de la invención

La presente invención se refiere a un novedoso concepto en inmunoterapia, por el que el engaño del sistema inmunitario produce destrucción específica y más eficiente de células de interés, células cancerosas en particular.

Hay fuerte evidencia de que la progresión tumoral en pacientes con cáncer está controlada por el sistema inmunitario. Esta conclusión se basa en observaciones de que la progresión tumoral está frecuentemente asociada a la secreción de factores supresores inmunitarios y/o regulación por disminución de las funciones de presentación del antígeno de la clase I del MHC (1-5). La inferencia es que los tumores deben haber elaborado estrategias para evitar una respuesta inmunitaria aparentemente eficaz. Y, lo que es más importante, puede detectarse una respuesta inmunitaria específica de tumor en individuos (6-8).

La aparente ineficiencia de las respuestas inmunitarias antitumorales que produce el fallo de combatir la enfermedad sienta la base para los actuales conceptos de inmunoterapia. Se sugiere que el refuerzo de la respuesta inmunitaria antitumoral por vacunación deliberada o por otros enfoques inmunoterapéuticos puede aumentar los posibles beneficios de las terapias basadas en inmunidad (6,9-11).

El brazo efector de los linfocitos T citotóxicos (CTL) CD8 restringidos a la clase I del MHC de la respuesta inmunitaria adaptativa está mejor equipado para reconocer el tumor como extraño e iniciar la cascada de eventos que producen la destrucción tumoral (12,13). Por tanto, el enfoque más atractivo en la inmunoterapia del cáncer está centrado en las estrategias de vacunación diseñadas para potenciar el brazo de CTL de la respuesta antitumoral y, por consiguiente, vencer los mecanismos de escape tumoral de CTL (9-11).

Uno de los mecanismos de escape mejor estudiados por los que las células tumorales evaden el ataque inmunitario es por la regulación por disminución de las moléculas de la clase I del MHC que son los antígenos reconocidos por CTL (1-5,14).

Mutaciones a lo largo de la vía de presentación de la clase I deben ser la forma más simple de los tumores para escapar de la eliminación mediada por CTL, ya que puede lograrse por uno o dos eventos mutacionales (dos mutaciones para inactivar ambos alelos o una mutación para crear un inhibidor negativo dominante) (1-3).

Se observa frecuentemente la regulación por disminución de la expresión de la clase I del MHC en tumores humanos, y es particularmente pronunciada en lesiones metastásicas (3,14-17). Esto es circunstancial, pero sin embargo evidencia convincente de la función de CTL en controlar la progresión tumoral en pacientes con cáncer. La expresión de la clase I del MHC ha sido principalmente analizada en especímenes de tumor quirúrgicamente extirpados usando métodos inmunohistoquímicos (14-15). Se ha informado de la reducción parcial o pérdida completa de MHC, que engloba todas las moléculas del MHC o limitada a alelos particulares (14-15). La pérdida de MHC puede observarse en algunas, pero no todas, las lesiones del mismo paciente. La regulación por disminución de la expresión de la clase I del MHC ha sido atribuida a mutaciones en β 2-microglobulina (β 2-m), transportador asociado a proteínas de presentación de antígenos (TAP), o las proteínas LMP-2 y LMP-7 del proteosoma (2,18-21). Evidencia adicional que implica la pérdida de la expresión de la clase I del MHC como mecanismo para el escape tumoral de la eliminación mediada por CTL procede de un estudio longitudinal de un paciente con melanoma. Células tumorales extirpadas durante la cirugía inicial presentaron nueve antígenos diferentes limitados a cuatro alelos de la clase I del HLA separados para clones de CTL establecidos del paciente (1). El paciente siguió sin enfermedad durante 5 años después de que se detectara una metástasis. En particular, una línea celular establecida de la lesión metastásica había perdido los cuatro alelos que se había mostrado previamente que presentaban antígenos de melanoma.

Así, la regulación por disminución de la molécula de la clase I del MHC es un problema limitante grave para la inmunoterapia del cáncer y la aplicación de vacunas contra el cáncer. Así, hay una necesidad ampliamente reconocida de, y sería altamente ventajoso tener, un enfoque novedoso de inmunoterapia que careciera de las limitaciones anteriores, concretamente un enfoque de inmunoterapia que fuera independiente del nivel de expresión de las moléculas de la clase I del MHC por células cancerosas.

El documento EP 0 352 761 enseña construcciones de antígeno que resultan de la unión de los antígenos de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) a moléculas de vehículo específicas. La unión tiene lugar en el extremo N o C por enlace covalente o, en el caso de enlace no covalente, por ejemplo mediante unión a avidina-biotina. Las moléculas de vehículo específicas se unen selectivamente a células diana y son preferentemente anticuerpos monoclonales. También se desvelan procesos de ingeniería genética para la producción de tales construcciones. Por consiguiente, se usan construcciones de antígeno generadas para dañar o eliminar células diana.

Sumario de la invención

El brazo efector de los linfocitos T citotóxicos (CTL) CD8 restringidos a la clase I del MHC de la respuesta inmunitaria adaptativa está mejor equipado para reconocer células tumorales como extrañas e iniciar la cascada de eventos que produce la destrucción tumoral. Sin embargo, los tumores han desarrollado estrategias sofisticadas para escapar de los mecanismos efectores inmunitarios, de las que las mejores estudiadas es por la regulación por disminución de las moléculas de la clase I del MHC que son los antígenos reconocidos por CTL.

Las moléculas de la invención se definen en las reivindicaciones.

Para vencer esto y desarrollar nuevos enfoques para inmunoterapia, y aunque se reduzca la presente invención a la práctica, se construyó una molécula recombinante en la que un MHC monocatenario es específicamente dirigido a células tumorales mediante su fusión con fragmentos de anticuerpo recombinante específicos de cáncer o un ligando que se une a receptores expresados por células tumorales. Como una molécula a modo de ejemplo, una molécula de HLA-A2 monocatenaria se fusionó genéticamente con los dominios variables de un anticuerpo humanizado específico de la subunidad α anti-receptor de IL-2, anti-Tac (aTac). La construcción, llamada B2M-aTac(dsFv), se expresó en *E. coli* y se produjeron moléculas funcionales por el repliegamiento *in vitro* en presencia de péptidos antigénicos restringidos al HLA-A2. Estudios de citometría de flujo revelaron la capacidad de decorar células tumorales humanas HLA-A2-negativas positivas para antígeno, con complejos de HLA-A2 de un modo que fuera completamente dependiente de la especificidad del fragmento de anticuerpo de direccionamiento. Y, lo que es más importante, el recubrimiento mediado por B2M-aTac(dsFv) de células tumorales diana las hizo susceptibles a la lisis mediada por CTL específica del péptido gp100 de melanoma restringido al HLA-A2 eficiente y específico. Estos resultados demuestran el concepto de que el direccionamiento específico de antígeno de tumor guiado por anticuerpo de complejos de MHC-péptido en células tumorales puede hacerlas susceptibles y potenciar la destrucción de CTL. Este novedoso enfoque abre ahora el camino para el desarrollo de nuevas estrategias inmunoterapéuticas basadas en el direccionamiento de anticuerpos de ligandos de MHC relacionados naturales y mecanismos citotóxicos basados en CTL.

Por lo tanto, aunque la presente invención se reduzca a la práctica, se desarrolló una estrategia novedosa para volver a dirigir los complejos de la clase I del MHC-péptido sobre la superficie de células tumorales en una forma que fuera independiente del grado de expresión de la clase I del MHC por las células tumorales diana. Para este fin, se emplearon dos brazos del sistema inmunitario en fusión. Un brazo, el resto de direccionamiento, comprende fragmentos recombinantes específicos de tumor de anticuerpos dirigidos a tumor o antígenos de diferenciación que se han usado durante muchos años para dirigir radioisótopos, toxinas o fármacos a células cancerosas (22, 23). El segundo brazo efector es una molécula de MHC monocatenario (MHCmc) compuesta de β 2-microglobulina humana unida a los tres dominios extracelulares de la cadena pesada de HLA-A2 (24, 25, documento WO 01/72768). Conectando las dos moléculas en un único gen recombinante y expresando el gen. La nueva molécula se expresa eficientemente en *E. coli* y se produce, por ejemplo, por repliegamiento *in vitro* en presencia de péptidos restringidos al HLA-A2. Este enfoque, como se muestra en el presente documento, convierte las células tumorales diana en susceptibles a la lisis por linfocitos T citotóxicos independientemente de su nivel de expresión de MHC y así puede emplearse como un nuevo enfoque para potenciar la inmunidad antitumoral mediada por CTL. Este enfoque novedoso conducirá al desarrollo de una nueva clase de agentes terapéuticos recombinantes capaces de destrucción y eliminación selectiva de células tumorales que utilizan ligandos de MHC relacionados naturales y mecanismos citotóxicos basados en CTL.

Según un aspecto, se proporciona una inmuno-molécula que comprende: un dominio efector de la clase I del MHC humano soluble; y un dominio de direccionamiento que está unido al dominio efector de la clase I del MHC humano soluble.

Así, según otro aspecto, se proporciona una construcción de ácidos nucleicos que codifica una inmuno-molécula, comprendiendo la construcción: un primer polinucleótido que codifica un dominio efector de la clase I del MHC humano soluble; y un segundo polinucleótido que codifica un dominio de direccionamiento; el primer polinucleótido y el segundo polinucleótido están seleccionados y se unen de forma que el dominio efector de la clase I del MHC humano soluble y el dominio de direccionamiento de anticuerpo se fusionen traduccionalmente opcionalmente mediante un conector peptídico intermedio.

Según todavía otro aspecto, se proporciona una construcción de ácidos nucleicos que codifica una inmuno-molécula, comprendiendo la construcción: un primer polinucleótido que codifica un dominio efector de la clase I del MHC humano soluble; y un segundo polinucleótido que codifica una región variable de una de una cadena ligera o una cadena pesada de un dominio de direccionamiento de anticuerpo; el primer polinucleótido y el segundo polinucleótido están seleccionados y se unen de forma que el dominio efector de la clase I del MHC humano soluble y la región variable de la una de la cadena ligera y cadena pesada del dominio de direccionamiento de anticuerpo se fusionen traduccionalmente opcionalmente mediante un conector peptídico intermedio; y un tercer polinucleótido que codifica la otra de la una de la cadena ligera y cadena pesada del dominio de direccionamiento de anticuerpo.

Según un aspecto adicional, se proporciona un sistema de construcción de ácidos nucleicos que comprende: una

- primera construcción de ácidos nucleicos que comprende: un primer polinucleótido que codifica un dominio efector de la clase I del MHC humano soluble; y un segundo polinucleótido que codifica una región variable de una de una cadena ligera o una cadena pesada de un dominio de direccionamiento de anticuerpo; el primer polinucleótido y el segundo polinucleótido están seleccionados y se unen de forma que el dominio efector de la clase I del MHC humano soluble y la región variable de la una de la cadena ligera y cadena pesada del dominio de direccionamiento de anticuerpo se fusionen traduccionalmente opcionalmente mediante un conector peptídico intermedio; una segunda construcción de ácidos nucleicos que comprende: un tercer polinucleótido que codifica la otra de la una de la cadena ligera y cadena pesada del dominio de direccionamiento de anticuerpo.
- Según un aspecto adicional, se proporciona un método de destrucción selectiva de una célula en un paciente, presentando la célula un antígeno (por ejemplo, un receptor), comprendiendo el método administrar al paciente una inmuno-molécula que comprende: un dominio efector de la clase I del MHC humano soluble complejoado con un péptido restringido al MHC; y un dominio de direccionamiento que está unido al dominio efector de la clase I del MHC humano soluble, siendo el dominio de direccionamiento para unirse selectivamente al antígeno; por el cual, el dominio efector de la clase I del MHC humano soluble complejoado con el péptido restringido al MHC inicia una respuesta inmunitaria mediada por CTL contra la célula, destruyendo así selectivamente la célula *in vivo*.
- Según características adicionales en las realizaciones preferidas descritas más adelante, el dominio de direccionamiento es un dominio de direccionamiento de anticuerpo.
- Según características todavía adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el dominio de direccionamiento es un dominio de direccionamiento de ligando.
- Según características todavía adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el dominio de direccionamiento de ligando está seleccionado del grupo que consiste en PDGF, EGF, KGF, TGF α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, VEGF y sus derivados, TNF.
- Según características todavía adicionales en las realizaciones descritas, el dominio efector de la clase I del MHC humano soluble y el dominio de direccionamiento de anticuerpo se fusionan traduccionalmente, opcionalmente con un conector peptídico traduccionalmente fusionado intermedio.
- Según características todavía adicionales en las realizaciones descritas, el dominio de direccionamiento de anticuerpo comprende una región variable de una cadena ligera de un anticuerpo unida al dominio efector.
- Según características todavía adicionales en las realizaciones descritas, la región variable de la cadena ligera del anticuerpo y el dominio efector se fusionan traduccionalmente, opcionalmente con un conector peptídico traduccionalmente fusionado intermedio.
- Según características todavía adicionales en las realizaciones descritas, el dominio de direccionamiento de anticuerpo comprende además una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo unida a la región variable de la cadena ligera del anticuerpo.
- Según características todavía adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la región variable de la cadena pesada del anticuerpo y la región variable de la cadena ligera del anticuerpo se fusionan traduccionalmente, opcionalmente con un conector peptídico traduccionalmente fusionado intermedio.
- Según características todavía adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la región variable de la cadena pesada del anticuerpo se une a la región variable de la cadena ligera del anticuerpo mediante un conector peptídico.
- Según características todavía adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la región variable de la cadena pesada del anticuerpo se une a la región variable de la cadena ligera del anticuerpo mediante al menos un enlace S-S.
- Según características todavía adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el dominio de direccionamiento de anticuerpo comprende una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo unida al dominio efector.
- Según características todavía adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la región variable de la cadena pesada del anticuerpo y el dominio efector se fusionan traduccionalmente, opcionalmente con un conector peptídico traduccionalmente fusionado intermedio.
- Según características todavía adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el dominio de direccionamiento de anticuerpo comprende además una región variable de una cadena ligera de un anticuerpo unida a la región variable de la cadena pesada del anticuerpo.
- Según características todavía adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la región variable de la cadena ligera del anticuerpo y la región variable de la cadena pesada del anticuerpo se fusionan traduccionalmente,

opcionalmente con un conector peptídico traduccionalmente fusionado intermedio.

Según características todavía adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la región variable de la cadena ligera del anticuerpo se une a la región variable de la cadena pesada del anticuerpo mediante un conector peptídico.

5 Según características todavía adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la región variable de la cadena ligera del anticuerpo se une a la región variable de la cadena pesada del anticuerpo mediante al menos un enlace S-S.

10 Según características todavía adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el dominio de direccionamiento de anticuerpo es capaz de unirse a un antígeno asociado a tumor.

Según características todavía adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el dominio de direccionamiento de anticuerpo es capaz de unirse a un antígeno específico de tumor.

15 Según características todavía adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el dominio efector de la clase I del MHC humano soluble comprende una β -2-microglobulina humana funcional y una cadena pesada de la clase I del MHC humano funcional unidas a él.

20 Según características todavía adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la cadena pesada de la clase I del MHC humano funcional comprende dominios α 1-3.

25 Según características todavía adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la β -2-microglobulina humana funcional y la cadena pesada de la clase I del MHC humano funcional se fusionan traduccionalmente, opcionalmente con un conector peptídico traduccionalmente fusionado intermedio.

Según características todavía adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el dominio efector de la clase I del MHC humano soluble comprende además un péptido restringido al MHC.

30 Según características todavía adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el péptido restringido al MHC está unido a la β -2-microglobulina humana funcional.

35 Según características todavía adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el péptido restringido al MHC y la β -2-microglobulina humana funcional se fusionan traduccionalmente, opcionalmente con un conector peptídico traduccionalmente fusionado intermedio.

Según características todavía adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el péptido restringido al MHC está complejoado con la cadena pesada de la clase I del MHC humano funcional.

40 Según características todavía adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el péptido restringido al MHC deriva de un patógeno común.

Según características todavía adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el péptido restringido al MHC deriva de un patógeno para el que hay una vacunación activa.

45 Según características todavía adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el péptido restringido al MHC deriva de un antígeno asociado a o específico de tumor.

50 Según características adicionales descritas más adelante, cualquiera de las construcciones de ácidos nucleicos descritas en el presente documento, que comprende además al menos una secuencia reguladora que actúa en cis operativamente unida a los polinucleótidos codificantes en ella.

Según características todavía adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la secuencia reguladora que actúa en cis es funcional en bacterias.

55 Según características todavía adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la secuencia reguladora que actúa en cis es funcional en levadura.

60 Según características todavía adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la secuencia reguladora que actúa en cis es funcional en células de animales.

Según características todavía adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la secuencia reguladora que actúa en cis es funcional en células vegetales.

65 Según todavía otro aspecto, se proporciona una célula transformada que comprende cualquiera de las construcciones de ácidos nucleicos o el sistema de construcción de ácidos nucleicos descrito en el presente

documento.

Según características adicionales en realizaciones preferidas descritas más adelante, la célula es una célula eucariota seleccionada del grupo que consiste en una célula de mamífero, una célula de insecto, una célula de planta, una célula de levadura y una célula de protozoo.

Según características todavía adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la célula es una célula bacteriana.

Según todavía un aspecto adicional, se proporciona una preparación aislada de cuerpos de inclusión derivados de bacteria que comprenden más del 30 por ciento en peso de una inmuno-molécula como se describe en el presente documento.

Según todavía un aspecto adicional de la presente divulgación, se proporciona un método de producción de una inmuno-molécula que comprende: expresar, en bacterias, la inmuno-molécula que comprende: un dominio efector de la clase I del MHC humano soluble que incluye una β -2-microglobulina humana funcional y una cadena pesada de la clase I del MHC humano funcional unidas a él; y un dominio de direccionamiento que está unido al dominio efector de la clase I del MHC humano soluble; y aislar la inmuno-molécula.

Según características adicionales en realizaciones preferidas descritas más adelante, la inmuno-molécula comprende además un péptido restringido al MHC unido a la β -2-microglobulina humana funcional, comprendiendo el método además el plegamiento de la inmuno-molécula para así generar un complejo de clase I del MHC-péptido restringido al MHC.

Según características todavía adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el aislamiento de la inmuno-molécula es por cromatografía de exclusión por tamaño.

Según características todavía adicionales en las realizaciones preferidas descritas, un péptido restringido al MHC se co-expresa junto con la inmuno-molécula en las bacterias.

Según características todavía adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la expresión, en las bacterias, de la inmuno-molécula se efectúa de forma que la inmuno-molécula forme cuerpos de inclusión en las bacterias.

Según características todavía adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el péptido restringido al MHC y la inmuno-molécula co-forman cuerpos de inclusión en las bacterias.

Según características todavía adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el aislamiento de la inmuno-molécula comprende además: desnaturalizar los cuerpos de inclusión para liberar moléculas de proteínas de los mismos; y renaturalizar las moléculas de proteínas.

Según características todavía adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el renaturalizar las moléculas de proteínas se efectúa en presencia de un péptido restringido al MHC.

Según características todavía adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el péptido restringido al MHC se co-expresa en las bacterias.

La presente invención trata satisfactoriamente las limitaciones de las configuraciones presentemente conocidas proporcionando un nuevo medio con el que combatir el cáncer.

Breve descripción de los dibujos

La invención se describe en el presente documento, a modo de ejemplo solo, con referencia a los dibujos adjuntos. Con referencia específica ahora a los dibujos en detalle, se enfatiza que los datos mostrados son a modo de ejemplo y para fines de discusión ilustrativa de las realizaciones preferidas de la presente invención solo, y se presentan en la causa de proporcionar lo que se cree que es la descripción más útil y fácilmente entendida de los principios y aspectos conceptuales de la invención. A este respecto, no se hace intento por mostrar detalles estructurales de la invención en más detalle que el que es necesario para un entendimiento fundamental de la invención, haciendo evidente la descripción, tomada con los dibujos, para aquellos expertos en la materia cómo las varias formas de la invención pueden ser integradas en la práctica.

En los dibujos:

Las FIG. 1A-F demuestran la unión de complejos schLA-A2 replegados *in vitro* a CTL. Se hicieron reaccionar clones de CTL específicos del antígeno de diferenciación de melanoma gp100 R6C12 y R1E2 con tetrámeros schLA-A2 purificados replegados *in vitro* que contenían el epítipo G9-209M reconocido por CTL R6C12 y el péptido G9-280V reconocido por CTL R1E2. Se tiñeron CTL con FITC-anti-CD8 (Figuras 1A y 1D), con

tetrámeros scHLA-A2/G9-209M marcados con PE (Figuras 1B y 1F) y con tetrámeros scHLA-A2/G9-280V (Figuras 1C y 1E). Se tiñeron CTL R6C12 y R1E2 con el tetrámero G9-209M y G9-280V específico, respectivamente pero no con tetrámero de control.

La FIG. 1G es una representación esquemática de un complejo scHLA-A2 usado en los experimentos descritos en las Figuras 1A-F.

La FIG. 1H demuestra las secuencias de ácidos nucleicos (SEQ ID NO:1) y de aminoácidos (SEQ ID NO:2) de scHLA-A2 esquemáticamente ilustradas en la Figura 1G.

Las FIG. 2A-D demuestran el diseño, expresión, purificación y caracterización bioquímica de B2M-aTac(dsFv).

Figura 2A - Se generó la construcción B2M-aTac(dsFv) fusionando un MHC monocatenario con un fragmento Fv variable de anticuerpo. En el gen de HLA-A2 monocatenario se fusionó con α -2m humana con los tres dominios extracelulares de HLA-A2 mediante un conector flexible de 15 aminoácidos de longitud [(Gly₄-Ser)₃, es decir, GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:3), codificado por GGCGGAGGAGGGTCCGGTGGCGGAGG TTCAGGAGGCGGTGGATCG (SEQ ID NO:15)]. Se usó el mismo conector peptídico para conectar el gen scHLA con el fragmento Fv de anticuerpo. Se fusionó el dominio variable VL del anticuerpo con el extremo C del gen scHLA-A2 mientras que el dominio variable VH se expresó por separado. Los dos plásmidos se expresaron en cultivos separados y se combinaron los cuerpos de inclusión reducidos solubilizados para formar fragmentos Fv estabilizados por disulfuro (dsFv) en los que los dominios variables Fv están estabilizados por enlaces disulfuro intercatenarios manipulados entre restos conservados de la región estructural. La Figura 2B muestra el análisis de SDS-PAGE de los cuerpos de inclusión de cultivos bacterianos incluidos para expresar los componentes de B2M-aTac(dsFv); B2M-aTacVL y aTacVH. La Figura 3C muestra el análisis de SDS-PAGE en geles no reductores y reductores de B2M-aTac(dsFv) después de la purificación por intercambio iónico en columna de Q-Sepharose. La Figura 4D demuestra la unión de B2M-aTac(dsFv) a G9-209M replegado al antígeno diana, p55. La detección de la unión fue con el MAb w6/32 específico de conformación.

La FIG. 2E demuestra las secuencias de ácidos nucleicos (SEQ ID NO:4, la secuencia conectora se muestra en letras minúsculas) y de aminoácidos (SEQ ID NO:5) de B2M-aTacVL esquemáticamente ilustrado en la Figura 2A como parte de B2M-aTac(dsFv).

La FIG. 2F demuestra las secuencias de ácidos nucleicos (SEQ ID NO:6) y de aminoácidos (SEQ ID NO:7) de aTacVH esquemáticamente ilustradas en la Figura 2A como parte de B2M-aTac(dsFv).

Las FIG. 3A-F demuestran la unión de B2M-aTac(dsFv) a células diana de tumor HLA-A2-negativo. Análisis de citometría de flujo de la unión de B2M-aTac(dsFv) a células HLA-A2-negativo positivas para antígeno. La Figura 3A muestra la unión del Mab anti-Tac (rojo) a A431; la Figura 3B muestra la unión del Mab anti-Tac a células A431 transfectadas con Tac (p55) (ATAC4) (rojo); la Figura 3C muestra la unión del Mab anti-HLA-A2 BB7.2 a células A431 incubadas (rojo) o no (azul) con B2M-aTac(dsFv); la Figura 3D muestra la unión del Mab BB7.2 a células ATAC4 transfectadas con p55 preincubadas (rojo) o no (azul) con B2M-aTac(dsFv); la Figura 3E muestra la unión del Mab anti-Tac (rojo) a células HUT102W leucémicas; y la Figura 3F muestra la unión del Mab BB7.2 a células HUT102W preincubadas (rojo) o no (azul) con B2M-aTac(dsFv). En todos los casos, las células de control con anticuerpo secundario se muestran en negro.

Las FIG. 4A-E demuestra la potenciación de la lisis mediada por CTL de células tumorales HLA-A2-negativo por B2M-aTac(dsFv). Se incubaron células diana recubiertas o no con los complejos de B2M-aTac(dsFv)-péptido con CTL específicos del péptido gp100 reactivo con melanoma en un ensayo de liberación de ³⁵metionina. Figura 4A - Se preincubaron o no células A431 y ATAC4 HLA-A2⁻ transfectadas con p55 con complejos B2M-aTac(dsFv)/G9-209M, seguido de incubación con el CTL específico de G9-209M, R6C12. El control son células incubadas con medio solo; Figura 4B - se preincubaron células A431 y ATAC4 HLA-A2⁻ transfectadas con p55 con complejos B2M-aTac(dsFv)/G9-209M, seguido de incubación con CTL R6C12. FM3D son células de melanoma HLA-A2⁺, gp100⁺; Figuras 4C y 4D - se preincubaron células ATAC4 transfectadas con p55 con complejos B2M-aTac(dsFv) replegados con los péptidos restringidos al HLA-A2 G9-209M, G9-280V y TAX, seguido de incubación con el clon de CTL específico de G9-209M R6C12 en la Figura 4C o el clon de CTL específico de G9-280V R1E2 en la Figura 4D; Figura 4E - se preincubaron células leucémicas HUT102W y CRIL-2 HLA-A2⁻ (con) o no (sin) con complejos B2M-aTac(dsFv) que contenían el péptido apropiado, seguido de incubación con los CTL R6C12 específicos de G9-209M o CTL R1E2 específicos de G9-280V como se indica.

La FIG. 5 es un gráfico que demuestra los resultados de un ensayo *in vivo* con B2m-aTac(dsFv). Se mezclaron células ATAC4 (1x10⁵) con CTL R6C12 (1x10⁶) (E:T 10:1) en presencia o ausencia de B2M-aTac(dsFv) (20-50 µg/ml) en 200 µl. La mezcla se inyectó por vía subcutánea a ratones sin pelo y se observó la aparición de tumores. Se usaron células ATAC4 solas como control.

La FIG. 6 es una ilustración esquemática de inmuno-moléculas preferidas según la presente invención, en la que las líneas entre recuadros representan enlace covalente (por ejemplo, fusión traduccional) entre restos en los recuadros.

Descripción de las realizaciones preferidas

La presente divulgación es de (i) inmuno-moléculas novedosas; (ii) métodos de preparación de las mismas; (iii) construcciones de ácidos nucleicos que codifican las mismas; y (iv) métodos de uso de las mismas para la destrucción selectiva de células, células cancerosas en particular.

Los principios y operación de la presente invención pueden entenderse mejor con referencia a los dibujos y descripciones adjuntas.

Por tanto, debe entenderse que la fraseología y terminología empleadas en el presente documento es con el fin de descripción y no debe ser considerada como limitante.

La progresión tumoral se asocia frecuentemente a la secreción de factores inmunosupresores y/o regulación por disminución de funciones de presentación del antígeno de la clase I del MHC (1-5, 14, 15). La inferencia es que los tumores han elaborado estrategias para evitar una respuesta inmunitaria aparentemente eficaz. Un significativo progreso hacia el desarrollo de vacunas que puedan estimular una respuesta inmunitaria contra tumores ha implicado la identificación de los antígenos de proteína asociados a un tipo de tumor dado y se identificó el mapeo de epítopes de antígenos de tumor para los motivos de unión restringidos a la clase I y la clase II del HLA y están actualmente siendo usados en diversos programas de vacunación (6, 9, 11-13). Las moléculas de la clase I del MHC que presentan los péptidos apropiados son necesarias para proporcionar las señales específicas para el reconocimiento y la destrucción por CTL. Sin embargo, el mecanismo principal de escape tumoral es la pérdida, regulación por disminución o alteración de los perfiles de HLA que puedan convertir la célula diana en insensible a la lisis de CTL, aunque la célula expresa el antígeno de tumor apropiado. En tumores humanos, la pérdida de HLA puede ser de hasta el 50 %, sugiriendo que una reducción en los niveles de proteína podría ofrecer una ventaja de supervivencia a las células tumorales (14, 15).

La presente invención presenta un nuevo enfoque para evitar este problema. Aunque se reduzca la presente invención a la práctica, se mostró que el direccionamiento específico de tumor de los complejos de la clase I del MHC-péptido en células tumorales era una estrategia eficaz y eficiente para convertir células HLA-A2-negativo susceptibles a la lisis por CTL restringidos al HLA-A2 relevantes. Esta nueva estrategia de redirigir los CTL contra células tumorales aprovecha el uso de fragmentos recombinantes de anticuerpo o ligandos que pueden localizarse en células malignas que expresan un marcador tumoral (antígeno, por ejemplo, receptor), normalmente asociado al fenotipo transformado (tal como receptores del factor de crecimiento, antígenos de diferenciación), con un grado relativamente alto de especificidad. Los fragmentos de anticuerpo recombinante de direccionamiento tumoral usados, aunque se reduzca la presente invención a la práctica, están constituidos por los dominios variables Fv que son los módulos funcionales más pequeños de anticuerpos necesarios para mantener la unión al antígeno. Esto los hace especialmente útiles para aplicaciones clínicas, no solo para generar la molécula descrita en el presente documento, sino también para preparar otras proteínas de fusión de anticuerpo, tales como inmunotoxinas Fv recombinantes o fusiones de anticuerpo recombinante-citocina (37, 38), debido a que su pequeño tamaño mejora la penetración tumoral.

El fragmento de direccionamiento de anticuerpo o ligando de direccionamiento se fusiona con una molécula de HLA monocaténario que puede plegarse eficientemente y funcionalmente alrededor de un péptido restringido al HLA-A2. Este enfoque puede ser expandido a otros alelos de HLA importantes y muchos tipos de especificidades tumorales que son dictados por los fragmentos de anticuerpo recombinante, generando así una nueva familia de agentes inmunoterapéuticos que puede usarse para aumentar y potenciar las actividades antitumorales. Junto con la aplicación de anticuerpos monoclonales para la terapia del cáncer, este enfoque puede considerarse como un enlace entre los anticuerpos antitumorales y la inmunoterapia mediada por célula.

Ya se han usado anticuerpos recombinantes para redirigir linfocitos T usando un enfoque clásico de anticuerpos biespecíficos en los que un brazo de anticuerpo se dirige contra un antígeno específico de tumor y el otro brazo contra una molécula asociada a célula efectora tal como CD3 para CTL y CD16 para células NK (39).

También se han usado ya ligandos que se unen a células tumorales para dirigir una variedad de toxinas a células tumorales. Véanse, por ejemplo, las referencias 50-52 con respecto a EGF, TGF α , IL-2 e IL-3.

Una ventaja importante del enfoque de la presente invención es el uso de una molécula recombinante que puede producirse en una forma homogénea y grandes cantidades. Y, lo que es más importante, el tamaño de la molécula B2M-dsFv de aproximadamente 65 kDa (generada con cualquier fragmento dsFv de anticuerpo) es óptimo con respecto a los requisitos necesarios para la buena penetración tumoral por una parte y semivida relativamente larga y estabilidad en la circulación por otra (40). Un estudio reciente que describe la generación de tetrámeros de anticuerpo-clase I del MHC fue publicado por que se observó la eficiente destrucción mediada por CTL de células diana tumorales usando conjugados de tetrámero de Fab-estreptavidina-MHC (41). La limitación de este enfoque, en comparación con la fusión de fragmento de anticuerpo recombinante-MHCmc monomérico descrita en el presente documento, es el gran tamaño de estas moléculas de aproximadamente 400 kDa y el hecho de que los tetrámeros de MHC solubles pueden inducir la activación de los propios linfocitos T, mientras que la molécula de MHC monomérica no puede inducir la activación, a menos que está a una concentración local relativamente alta (42-44).

El recubrimiento de células tumorales que habían regulado por disminución su propia expresión de MHC mediante el uso de este enfoque de direccionamiento potencia las células para la destrucción mediada por CTL mientras que se usa una diana en las células tumorales que está normalmente implicada en el proceso de transformación, los ejemplos más clásicos son los receptores del factor de crecimiento tales como IL-2R como se usa en el presente documento. Este hecho también favorece la idea de que usando este enfoque los mutantes de escape que regulan por disminución el receptor elegido como diana probablemente no tienen una ventaja de crecimiento debido a que el receptor participa directamente en funciones de supervivencia clave de las células cancerosas.

Otra ventaja del enfoque de anticuerpo presentado en el presente documento es el hecho de que estos nuevos agentes pueden diseñarse alrededor de la especificidad de péptido deseado, concretamente el replegamiento de la molécula B2M-Fv puede realizarse alrededor de cualquier péptido restringido al MHC apropiado. En los ejemplos presentados en el presente documento, se emplearon CTL específicos de tumor restringidos al HLA-A2 que reconocen epítopes de linfocitos T derivados del antígeno de diferenciación de melanoma gp100. Sin embargo, el tipo de CTL reactivos con antígeno que va a ser redirigido para destruir las células tumorales puede definirse por otros péptidos antigénicos basándose en el reciente conocimiento de los mecanismos inmunitarios en salud y enfermedad. Por ejemplo, la identificación de respuestas de CTL específicos de tumor en pacientes puede sugerir que éstos pueden ser eficientes para el direccionamiento. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que estos CTL específicos de tumor no siempre son óptimos, ya que están frecuentemente presentes solo a frecuencias muy bajas o incluso cuando están presentes a frecuencias altas pueden no ser funcionales o anérgicos (7). Así, una fuente más activa y prometedora de CTL puede ser reclutada de linfocitos circulantes dirigidos contra epítopes de linfocitos T comunes y muy inmunogénicos tales como derivados de virus o toxinas bacterianas que también pueden provocar una buena respuesta de memoria (45,46). Se ha mostrado que los precursores de CTL dirigidos contra epítopes de gripe, VEB, CMV (péptidos) se mantienen en altas frecuencias en la circulación de pacientes con cáncer, además de individuos sanos y estos CTL son normalmente activos y con un fenotipo de memoria (45, 46). Así, estos CTL serían la fuente de elección para ser redirigidos a las células tumorales mediante el uso de una molécula B2M-Fv generada cargada con tales epítopes derivados de virus. El agente óptimo es una molécula B2M-Fv en la que el péptido antigénico también está ligado covalentemente al complejo mediante el uso de un conector flexible que conecta el péptido con el extremo N de la β -2-microglobulina. Esta construcción garantizará la óptima estabilidad para el complejo de MHCmc *in vivo* debido a que el péptido estabilizante está conectado covalentemente y no puede abandonar fácilmente la ranura de unión a MHC-péptido. Este tipo de moléculas de péptido-MHC monocatenario se generaron previamente en sistemas murinos y humanos para diversos estudios funcionales y estructurales (47, 48). Una opción adicional es usar derivados de péptido antigénicos que se modifican en los "restos de anclaje" de forma que aumente su afinidad por la ranura de unión a HLA (27).

También hay varias opciones para el tipo de fragmento Fv que va a usarse como el resto de direccionamiento. Además del tipo dsFv de fragmento, empleado aunque que se reduzca la presente invención a la práctica, puede usarse un fragmento Fv monocatenario (scFv) en el que los dominios VH y VL de anticuerpo están conectados mediante un conector peptídico. En tal caso, la molécula B2M-Fv está codificada por un plásmido que evita la posible contaminación con moléculas B2M de un solo dominio.

Otro aspecto importante de la presente invención que está soportado por otros es el hecho de que el recubrimiento de complejos de MHC-péptido antigénicos sobre la superficie de células tumorales sin anclaje transmembranario es suficiente para inducir su eficiente lisis por CTL específicos sin el conocimiento de si moléculas accesorias autólogas de las células tumorales diana están presentes o no en absoluto y están desempeñando una función en tal destrucción mediada por CTL. Esta observación resulta del hecho de que se forma una alta concentración local de complejos de MHC-péptido recubiertos que presentan un epítipo de linfocito particular T (péptido) sobre las células elegidas como diana que supera enormemente la densidad natural de tales complejos presentados sobre la superficie de células. En el caso de la subunidad α de IL-2R, están presentes varios de cientos a miles de sitios por célula en las células diana, en comparación con muy pocos complejos que contienen un péptido particular que se espera esté presente sobre las células, que puede ser suficiente para la destrucción eficaz y eficiente, incluso sin la participación de moléculas accesorias. Esto es sin tener en cuenta la regulación por disminución de la expresión de la clase I del MHC como mecanismo de escape. Indicación adicional de esta posibilidad se encuentra mediante los hallazgos de que los tetrámeros de MHC pueden inducir la activación de linfocitos T por sí mismos (44), que incluye la reciente observación de que la activación de CTL por tetrámeros de MHC sin moléculas accesorias puede demostrarse al nivel de célula individual (Cohen, Denkberg, Reiter; manuscrito presentado).

En conclusión, los resultados presentados en el presente documento proporcionan una clara demostración de la utilidad del enfoque de la presente invención para reclutar CTL activos para la destrucción tumoral de células mediante anticuerpo específico de cáncer o direccionamiento guiado por ligando de complejos de MHCmc-péptido. Estos resultados sientan las bases para el desarrollo de una nuevo enfoque inmunoterapéutico basado en respuestas inmunitarias celulares que existen de forma natural que son redirigidas contra las células tumorales.

Según un aspecto, se proporciona una inmuno-molécula que comprende un dominio efector de la clase I del MHC humano soluble; y un dominio de direccionamiento, ya sea el dominio de direccionamiento de anticuerpo o dominio de direccionamiento de ligando, que está unido al dominio efector de la clase I del MHC humano soluble. Preferentemente, la inmuno-molécula tiene un peso molecular inferior a 100 kDa. El dominio efector de la clase I del MHC humano soluble y el dominio de direccionamiento se fusionan preferentemente traduccionalmente, opcionalmente con un conector peptídico traduccionalmente fusionado intermedio. Sin embargo, otras formas para unir covalentemente el dominio efector de la clase I del MHC humano soluble y el dominio de direccionamiento se describen en el presente documento más adelante.

La Figura 6 demuestra varias inmuno-moléculas preferidas de la presente invención, identificadas como (i) - (xiv). Todas las moléculas comprenden un MHC monocatenario y soluble, que incluye β -2-microglobulina humana funcional unida a la cadena pesada de la clase I del MHC humano funcional, que preferentemente comprende los dominios α 1-3. Preferentemente, la β -2-microglobulina humana funcional y la cadena pesada de la clase I del MHC

humano funcional se fusionan traduccionalmente, opcionalmente con un conector peptídico traduccionalmente fusionado intermedio. Sin embargo, como se detalla adicionalmente más adelante, la β -2-microglobulina humana funcional y la cadena pesada de la clase I del MHC humano funcional pueden unirse covalentemente entre sí en otras formas.

Como se usa en el presente documento, el término "funcional", cuando se usa en referencia a la β -2-microglobulina y polipéptidos de cadena pesada de un complejo de la clase I del MHC monocatenario, se refiere a cualquier porción de cada uno que es capaz de contribuir al ensamblaje de un complejo de la clase I del MHC monocatenario funcional (es decir, capaz de unión y presentación a péptidos antigénicos restringidos al MHC específicos de CTL cuando se complejan).

Las expresiones "traduccionalmente fusionado" y "en marco" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a polipéptidos codificados por polinucleótidos que están unidos covalentemente para formar un único marco de lectura abierto continuo que abarca la longitud de las secuencias codificantes de los polinucleótidos unidos. Tales polinucleótidos pueden unirse covalentemente directamente o preferentemente indirectamente mediante un espaciador o región conectora que codifica un péptido conector.

Las moléculas (i) - (vi) y (xiii) comprenden además un péptido restringido al MHC covalentemente unido a ellas. El péptido restringido al MHC está preferentemente unido a la β -2-microglobulina humana funcional. Preferentemente, el péptido restringido al MHC y la β -2-microglobulina humana funcional se fusionan traduccionalmente, opcionalmente con un conector peptídico traduccionalmente fusionado intermedio. Sin embargo, como se detalla además más adelante, el péptido restringido al MHC y la β -2-microglobulina humana funcional pueden unirse covalentemente entre sí de otras formas.

Las moléculas (vii) - (xii) y (xiv) comprenden además un péptido restringido al MHC que no está covalentemente unido a ellas. En ambos casos, sin embargo, el péptido restringido al MHC está seleccionado para complejarse con la cadena pesada de la clase I del MHC humano funcional tras el replegamiento, como se describe además más adelante.

El péptido restringido al MHC deriva preferentemente de un patógeno común, tal como gripe, hepatitis, etc. El patógeno del que deriva el péptido restringido al MHC se selecciona según varios criterios del siguiente modo: (i) preferentemente, una gran porción de la población se expuso al patógeno o sus antígenos mediante infección de vacunación; (ii) una vacunación activa está disponible para el patógeno, de manera que sea capaz de reforzar la respuesta inmunitaria; y (iii) se retiene título relativamente alto de CTL con memoria a largo plazo para el patógeno en pacientes infectados o vacunados.

Alternativamente, el MHC-péptido deriva de un antígeno asociado a o específico de tumor. Se mostró que los péptidos restringidos al MHC derivados de antígeno asociado a o específico de tumor pueden usarse para provocar una respuesta de CTL eficiente. Para este fin, véanse, por ejemplo, el documento WO 00/06723, que se incorpora en el presente documento por referencia.

El dominio de direccionamiento puede ser un dominio de direccionamiento de anticuerpo (moléculas (i)-(xii)) o un dominio de direccionamiento de ligando (moléculas (xiii) y (xiv)).

Según una realización preferida de la presente invención, el dominio de direccionamiento de anticuerpo comprende una región variable de una cadena ligera de un anticuerpo unido al dominio efector (véanse las moléculas (i) y (vii) de la Figura 6). Preferentemente, la región variable de la cadena ligera del anticuerpo y el dominio efector se fusionan traduccionalmente, opcionalmente con un conector peptídico traduccionalmente fusionado intermedio. Sin embargo, otras formas de enlazar covalentemente la región variable de la cadena ligera del anticuerpo y el dominio efector se describen a continuación.

Según otra realización preferida, el dominio de direccionamiento de anticuerpo comprende además una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo unida a la región variable de la cadena ligera del anticuerpo (véanse las moléculas (iii) - (vi) y (ix) - (xii) de la Figura 6). Preferentemente, la región variable de la cadena pesada del anticuerpo y la región variable de la cadena ligera del anticuerpo se fusionan traduccionalmente, opcionalmente con un conector peptídico traduccionalmente fusionado intermedio (véanse las moléculas (vi) y (x) de la Figura 6). Sin embargo, otras formas de enlazar covalentemente la región variable de la cadena pesada del anticuerpo y la región variable de la cadena ligera del anticuerpo se desvelan en el presente documento.

Por ejemplo, la región variable de la cadena pesada del anticuerpo puede unirse a la región variable de la cadena ligera del anticuerpo mediante al menos un enlace S-S, generando un resto dsFV (véanse, por ejemplo, las moléculas (v) y (xi) en la Figura 6)).

Según otra realización preferida de la presente invención, el dominio de direccionamiento de anticuerpo comprende una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo unido al dominio efector (véanse las moléculas (ii) y (viii) de la Figura 6). Preferentemente, la región variable de la cadena pesada del anticuerpo y el dominio efector se fusionan traduccionalmente, opcionalmente con un conector peptídico traduccionalmente fusionado intermedio

(véanse las moléculas (iii) y (ix) de la Figura 6). Sin embargo, otras formas para unir covalentemente la región variable de la cadena pesada del anticuerpo y el dominio efector se describen más adelante.

Según otra realización preferida, el dominio de direccionamiento de anticuerpo comprende además una región variable de una cadena ligera de un anticuerpo unida a la región variable de la cadena pesada del anticuerpo (véanse las moléculas (iii), (vi), (ix) y (xii) de la Figura 6). Preferentemente, la región variable de la cadena ligera del anticuerpo y la región variable de la cadena pesada del anticuerpo se fusionan traduccionalmente, opcionalmente con un conector peptídico traduccionalmente fusionado intermedio (véanse las moléculas (iii) y (ix) de la Figura 6). Sin embargo, otras formas para unir covalentemente la región variable de la cadena ligera del anticuerpo y la región variable de la cadena pesada del anticuerpo se desvelan en el presente documento.

Por ejemplo, la región variable de la cadena ligera del anticuerpo puede unirse a la región variable de la cadena pesada del anticuerpo mediante al menos un enlace S-S, generando un resto dsFv (véanse, por ejemplo, las moléculas (vi) y (xii) en la Figura 6)).

El dominio de direccionamiento de anticuerpo en la molécula de la invención está seleccionado para ser capaz de unirse a un antígeno asociado a o específico de tumor. Se apreciará a este respecto que actualmente hay varios cientos de antígenos asociados a o específicos de tumor identificados, asociados a diversos tumores sólidos y no sólidos, y además que los anticuerpos monoclonales se desarrollaron para muchos de ellos. En otras palabras, las secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos de muchos anticuerpos que se unen específicamente a antígenos asociados a o específicos de tumor ya son conocidos o pueden ser fácilmente determinados analizando los hibridomas que producen tales anticuerpos.

Las moléculas descritas en la Figura 6 están compuestas de un único polipéptido [por ejemplo, moléculas (i)-(iv) y (xiii)], dos polipéptidos [moléculas (v), (vi), (vi)-(x) y (xiv)] o tres polipéptidos [moléculas (xi) y (xii)].

Los términos péptido y polipéptido se usan en el presente documento indistintamente. Cada uno de los polipéptidos puede sintetizarse usando cualquier método conocido en la técnica. Por lo tanto, se apreciará que las inmunomoléculas de la presente invención o porciones de las mismas pueden prepararse de varias formas, que incluyen síntesis en fase sólida de proteínas, sin embargo, en la realización preferida de la invención, al menos porciones importantes de las moléculas, por ejemplo, el dominio efector de la clase I del MHC humano soluble (con o sin el péptido restringido al MHC) y el dominio de direccionamiento de anticuerpo (como un scFv o como un brazo de un dsFv) se generan por traducción de una construcción o construcciones de ácidos nucleicos respectivas.

Así, se requiere de uno a tres marcos de lectura abiertos para sintetizar las moléculas de la Figura 6 mediante traducción. Estos marcos de lectura abiertos pueden residir en una única, dos o tres moléculas de ácidos nucleicos. Así, por ejemplo, una única construcción de ácidos nucleicos puede llevar uno, dos o tres marcos de lectura abiertos. Pueden usarse una a tres secuencias reguladoras que actúan en cis para controlar la expresión del uno a tres marcos de lectura abiertos. Por ejemplo, una única secuencia reguladora que actúa en cis puede controlar la expresión de uno, dos o tres marcos de lectura abiertos, en un modo similar a cistrón. Alternativamente, pueden usarse tres secuencias reguladoras que actúan en cis independientes para controlar la expresión de los tres marcos de lectura abiertos. También se prevén otras combinaciones.

En casos en los que el péptido restringido al MHC no se una covalentemente a las restantes porciones de la molécula (véase en la Figura 6 moléculas (vii) - (xii)), se prepara preferentemente mediante técnicas en fase sólida, ya que es generalmente un péptido corto de menos de 10 aminoácidos.

Los marcos de lectura abiertos y las secuencias reguladoras que actúan en cis pueden ser llevados por una a tres moléculas de ácidos nucleicos. Por ejemplo, cada marco de lectura abierto y su secuencia reguladora que actúa en cis son llevados por una molécula de ácido nucleico diferente, o todos los marcos de lectura abiertos y sus secuencias reguladoras que actúan en cis asociadas son llevados por una única molécula de ácido nucleico. También se prevén otras combinaciones.

La expresión del (de los) polipéptido(s) puede efectuarse por transformación/transfección y/o co-transformación/co-transfección de una única célula o una pluralidad de células con cualquiera de las moléculas de ácidos nucleicos, que sirven de vectores de transformación/transfección (por ejemplo, como plásmidos, fagos, fagémidos o virus).

Por lo tanto, según otro aspecto, se proporciona una construcción de ácidos nucleicos que codifica una inmunomolécula. La construcción según este aspecto de la invención comprende un primer polinucleótido que codifica un dominio efector de la clase I del MHC humano soluble; y un segundo polinucleótido que codifica un dominio de direccionamiento, ya sea un dominio de direccionamiento de anticuerpo o un dominio de direccionamiento de ligando. El primer polinucleótido y el segundo polinucleótido están seleccionados y se unen juntos de forma que el dominio efector de la clase I del MHC humano soluble y el dominio de direccionamiento se fusionen traduccionalmente, opcionalmente mediante un conector peptídico intermedio.

Según todavía otro aspecto, se proporciona una construcción de ácidos nucleicos que codifica una inmunomolécula.

molécula. La construcción según este aspecto de la invención comprende un primer polinucleótido que codifica un dominio efector de la clase I del MHC humano soluble; y un segundo polinucleótido que codifica una región variable de una de una cadena ligera o una cadena pesada de un dominio de direccionamiento de anticuerpo. El primer polinucleótido y el segundo polinucleótido están seleccionados y se unen juntos de forma que el dominio efector de la clase I del MHC humano soluble y la región variable de la una de la cadena ligera y cadena pesada del dominio de direccionamiento de anticuerpo se fusionen traduccionalmente opcionalmente mediante un conector peptídico intermedio. La construcción según este aspecto de la invención comprende además un tercer polinucleótido que codifica la otra de la una de la cadena ligera y cadena pesada del dominio de direccionamiento de anticuerpo. El tercer polinucleótido puede seleccionarse para codificar un polipéptido separado, para permitir la generación de un dsFV, o para codificar un polipéptido que se fusiona traduccionalmente con el segundo ácido nucleico, para permitir la generación de un scFV.

Según un aspecto adicional, se proporciona un sistema de construcción de ácidos nucleicos. El sistema de construcción comprende una primera construcción de ácidos nucleicos que comprende un primer polinucleótido que codifica un dominio efector de la clase I del MHC humano soluble; y un segundo polinucleótido que codifica una región variable de una de una cadena ligera o una cadena pesada de un dominio de direccionamiento de anticuerpo. El primer polinucleótido y el segundo polinucleótido están seleccionados y se unen juntos de forma que el dominio efector de la clase I del MHC humano soluble y la región variable de la una de la cadena ligera y cadena pesada del dominio de direccionamiento de anticuerpo se fusionen traduccionalmente opcionalmente mediante un conector peptídico intermedio. El sistema de construcción comprende además una segunda construcción de ácidos nucleicos que comprende un tercer polinucleótido que codifica la otra de la una de la cadena ligera y cadena pesada del dominio de direccionamiento de anticuerpo. Estas construcciones pueden ser co-introducidas en la misma célula o en diferentes células. En el primer caso, las construcciones que constituyen el sistema de construcción pueden mezclarse juntas, mientras que en el segundo caso, las construcciones que constituyen el sistema de construcción se mantienen sin mezclar en receptores separados.

Cuando y donde se usen, el conector péptido está seleccionado de una secuencia de aminoácidos que es inherentemente flexible, de forma que los polipéptidos conectados así se pliegan independientemente y nativamente tras la expresión de los mismos, facilitando así la formación de un complejo de la clase I del MHC humano monocatenario (mc) funcional, que se dirige a scFv o ligando y/o complejo de la clase I del MHC humano-antígeno restringido al MHC.

Cualquiera de las construcciones de ácidos nucleicos descritas en el presente documento comprende al menos una secuencia reguladora que actúa en cis operativamente unida a los polinucleótidos codificantes en ella. Preferentemente, la secuencia reguladora que actúa en cis es funcional en bacterias. Alternativamente, la secuencia reguladora que actúa en cis es funcional en levadura. Todavía alternativamente, la secuencia reguladora que actúa en cis es funcional en células de animales. Todavía alternativamente, la secuencia reguladora que actúa en cis es funcional en células vegetales.

La secuencia reguladora que actúa en cis puede incluir una secuencia promotora y secuencias potenciadoras de la transcripción o traducción adicionales todas las cuales sirven para facilitar la expresión de los polinucleótidos cuando se introducen en una célula hospedadora. Ejemplos específicos de promotores se describen en el presente documento más adelante en el contexto de diversos sistemas de expresión eucariotas y procariotas y en la sección de ejemplos que sigue.

Se apreciará que una única secuencia reguladora que actúa en cis puede utilizarse en una construcción de ácidos nucleicos para dirigir la transcripción de un único transcrito que incluye uno o más marcos de lectura abiertos. En el caso posterior, puede utilizarse un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) para permitir la traducción de la secuencia de ácidos nucleicos internamente posicionada.

Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona una célula transformada que comprende una cualquiera o más de las construcciones de ácidos nucleicos o el sistema de construcción de ácidos nucleicos descrito en el presente documento. La célula, según este aspecto de la invención, puede ser una célula eucariota seleccionada del grupo que consiste en una célula de mamífero, una célula de insecto, una célula de planta, una célula de levadura y una célula de protozoo, o puede ser una célula bacteriana.

Siempre que la co-expresión de polipéptidos independientes en una única célula sea preferida, la construcción o construcciones empleadas deben configurarse de forma que los niveles de expresión de los polipéptidos independientes se optimicen, para obtener proporciones más altas del producto final.

Preferentemente, un promotor (que es un ejemplo de una secuencia reguladora que actúa en cis) utilizado por la(s) construcción (construcciones) de ácidos nucleicos de la presente invención es un promotor constitutivo fuerte tal que se obtienen altos niveles de expresión para los polinucleótidos tras la transformación en células hospedadoras.

Se apreciará que también pueden efectuarse altos niveles de expresión transformando la célula hospedadora con un alto número de copias de la(s) construcción (construcciones) de ácidos nucleicos, o utilizando secuencias que

actúan en cis que estabilizan el transcrito resultante y como tal disminuyen la degradación o "renovación" de un transcrito tal.

Como se usa en el presente documento, la expresión "célula transformada" describe una célula en la que una secuencia de ácidos nucleicos exógena se introduce para así alterar genéticamente establemente o transitoriamente la célula hospedadora. Puede producirse en condiciones naturales o artificiales usando diversos métodos muy conocidos en la técnica, algunos de los cuales se describen en detalle en el presente documento más adelante en el contexto con ejemplos específicos de células hospedadoras.

La célula hospedadora transformada puede ser una célula eucariota, tal como, por ejemplo, una célula de mamífero, una célula de insecto, una célula de planta, una célula de levadura y una célula de protozoo, o alternatively, la célula puede ser una célula bacteriana.

Cuando se utiliza para la expresión de células hospedadoras eucariotas, la(s) construcción (construcciones) de ácidos nucleicos según la presente invención pueden ser un vector lanzadera, que puede propagarse tanto en *E. coli* (en la que la construcción comprende un marcador de selección apropiado y origen de replicación) como ser compatible para la expresión en células hospedadora eucariotas. La(s) construcción (construcciones) de ácidos nucleicos según la presente invención pueden ser, por ejemplo, un plásmido, un bácmido, un fagémido, un cósmido, un fago, un virus o un cromosoma artificial.

Según otra realización preferida de la presente invención, la célula hospedadora es una célula de mamífero de, por ejemplo, un cultivo de células de mamífero. Sistemas de expresión en mamífero adecuados incluyen, pero no se limitan a, pcDNA3, pcDNA3.1(+/-), pZeoSV2(+/-), pSecTag2, pDisplay, pEF/myc/cyto, pCMV/myc/cyto, pCR3.1, que están disponibles de Invitrogen, pCI que está disponible de Promega, pBK-RSV y pBK-CMV que están disponibles de Stratagene, pTRES que está disponible de Clontech, y sus derivados.

También puede utilizarse cultivos de células de insecto para expresar las secuencias de ácidos nucleicos de la presente invención. Sistemas de expresión en insecto adecuados incluyen, pero no se limitan a, el sistema de expresión en baculovirus y sus derivados que están comercialmente disponibles de numerosos proveedores tales como Invitrogen (maxBac™), Clontech (BacPak™) o Gibco (Bac-to-Bac™).

La expresión de las secuencias de ácidos nucleicos de la presente invención también puede efectuarse en células de planta. Como se usa en el presente documento, la expresión "célula de planta" puede referirse a protoplastos de planta, células de un cultivo de tejido de planta, células de tejidos derivados de planta o células de plantas enteras.

Hay diversos métodos de introducción de construcciones de ácidos nucleicos en células vegetales. Tales métodos se basan en tanto la integración estable de la construcción de ácidos nucleicos o una porción de la misma en el genoma de la célula de planta, como en la expresión transitoria de la construcción de ácidos nucleicos, en cuyo caso estas secuencias no son establemente integradas en el genoma de la célula de planta.

Hay dos métodos principales para efectuar la integración genómica estable de secuencias de ácidos nucleicos exógenos tales como aquellos incluidos dentro de la construcción de ácidos nucleicos de la presente invención en genomas de células de planta:

(i) Transferencia génica mediada por *Agrobacterium*: Klee et al. (1987) Annu. Rev. Plant Physiol. 38:467-486; Klee y Rogers en Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol. 6, Molecular Biology of Plant Nuclear Genes, eds. Schell, J., y Vasil, L. K., Academic Publishers, San Diego, Calif. (1989) p. 2-25; Gatenby, in Plant Biotechnology, eds. Kung, S. y Arntzen, C. J., Butterworth Publishers, Boston, Mass. (1989) p. 93-112.

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

El sistema de *Agrobacterium* incluye el uso de vectores plasmídicos que contienen segmentos de ADN definidos que se integran en el ADN genómico de planta. Métodos de inoculación del tejido de planta varían dependiendo de la especie de planta y el sistema de administración de *Agrobacterium*. Un enfoque ampliamente usado es el procedimiento de disco de hoja, véase, por ejemplo, Horsch et al. en Plant Molecular Biology Manual A5, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (1988) p. 1-9. Un enfoque complementario emplea el sistema de administración de

Agrobacterium en combinación con infiltración a vacío. El sistema de *Agrobacterium* es especialmente viable en la creación de plantas dicotiledóneas establemente transformadas.

Hay diversos métodos de transferencia directa de ADN en células vegetales. En la electroporación, se exponen brevemente protoplastos a un campo eléctrico fuerte. En microinyección, el ADN es mecánicamente inyectado directamente en las células usando micropipetas muy pequeñas. En el bombardeo de micropartículas, el ADN se adsorbe sobre microproyectiles tales como cristales de sulfato de magnesio, partículas de tungsteno o partículas de oro, y los microproyectiles son físicamente acelerados en células o tejidos de planta. También puede utilizarse transferencia directa de ADN para transformar transitoriamente células de planta.

En cualquier caso, promotores de planta adecuados que pueden ser utilizados para la expresión en células de planta de la primera y segunda secuencias de ácidos nucleicos incluyen, pero no se limitan a, promotor 35S de CaMV, promotor de ubiquitina, y otros promotores fuertes que pueden expresar las secuencias de ácidos nucleicos en una forma constitutiva o específica de tejido.

También puede usarse virus de planta como vectores de transformación. Virus que se ha mostrado que son útiles para la transformación de hospedadores de células de planta incluyen CaV, TMV y BV. La transformación de plantas usando virus de planta se describe en la patente de EE.UU. N.º 4.855.237 (BGV), documento EP-A 67.553 (TMV), solicitud publicada japonesa N.º 63-14693 (TMV), documentos EPA 194.809 (BV), EPA 278.667 (BV); y Gluzman, Y. et al., *Communications in Molecular Biology: Viral Vectors*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp. 172-189 (1988). Partículas de pseudovirus para su uso en expresar ADN foráneo en muchos hospedadores, que incluyen plantas, se describen en el documento WO 87/06261.

La construcción de virus de ARN de planta para la introducción y expresión de secuencias de ácidos nucleicos exógenas no virales en plantas se demuestra por las referencias anteriores, además de por Dawson, W. O. et al., *Virology* (1989) 172:285-292; Takamatsu et al. *EMBO J.* (1987) 6:307-311; French et al. *Science* (1986) 231:1294-1297; y Takamatsu et al. *FEBS Letters* (1990) 269:73-76.

Cuando el virus es un virus de ADN, las construcciones pueden prepararse para el propio virus. Alternativamente, el virus puede clonarse primero en un plásmido bacteriano para facilitar la construcción del vector viral deseado con las secuencias de ácidos nucleicos descritas anteriormente. El virus puede entonces escindirse del plásmido. Si el virus es un virus de ADN, un origen de replicación bacteriano puede unirse al ADN viral, que entonces es replicado por las bacterias. La transcripción y traducción de este ADN hará que la proteína de la cubierta encapside el ADN viral. Si el virus es un virus de ARN, el virus se clona generalmente como un ADNc y se inserta en un plásmido. El plásmido se usa entonces para hacer todas las construcciones. El virus de ARN se produce entonces por transcripción de la secuencia del plásmido viral y traducción de los genes virales para hacer que la(s) proteína(s) de la cubierta encapsiden el ARN viral.

La construcción de virus de ARN de planta para la introducción y expresión en plantas de secuencias de ácidos nucleicos exógenas no virales tales como aquellas incluidas en la construcción de la presente invención se demuestra por las referencias anteriores, además de en la patente de EE.UU. N.º 5.316.931.

También pueden utilizarse células de levadura como células hospedadoras por la presente invención. Se conocen en la técnica numerosos ejemplos de vectores de expresión en levadura adecuados para la expresión de las secuencias de ácidos nucleicos de la presente invención en levadura y están comercialmente disponibles. Tales vectores normalmente se introducen en una célula hospedadora de levadura mediante métodos químicos o de transformación por electroporación muy conocidos en la técnica. Sistemas comercialmente disponibles incluyen, por ejemplo, los sistemas de expresión pYES™ (Invitrogen) o YEX™ (Clontech).

Se apreciará que cuando se exprese en sistemas de expresión eucariotas tales como aquellos descritos anteriormente, la construcción de ácidos nucleicos preferentemente incluye una secuencia codificante de péptido señal de forma que los polipéptidos producidos a partir de la primera y segunda secuencias de ácidos nucleicos sean dirigidos mediante la señal de péptido unido en vías de secreción. Por ejemplo, en células hospedadoras de mamífero, insecto y de levadura, los polipéptidos expresados pueden secretarse al medio de crecimiento, mientras que en sistemas de expresión en planta los polipéptidos pueden secretarse en el apoplasto, o dirigirse a un orgánulo subcelular.

Según una realización actualmente más preferida de la invención, la célula hospedadora es una célula bacteriana, tal como, por ejemplo, *E. coli*. Un hospedador bacteriano puede transformarse con la secuencia de ácidos nucleicos mediante métodos de transformación muy conocidos en la técnica, que incluyen, por ejemplo, transformación química (por ejemplo, CaCl₂) o electroporación.

Se conocen en la técnica numerosos ejemplos de sistemas de expresión bacterianos que pueden utilizarse para expresar las secuencias de ácidos nucleicos de la presente invención. Sistemas de expresión bacterianos comercialmente disponibles incluyen, pero no se limitan a, el sistema de expresión pET™ (Novagen), sistema de expresión pSE™ (Invitrogen) o el sistema de expresión pGEX™ (Amersham).

Como se describe además en la sección de ejemplos que sigue, la expresión bacteriana es particularmente ventajosa, ya que los polipéptidos expresados forman cuerpos de inclusión sustancialmente puros fácilmente susceptibles a la recuperación y purificación del polipéptido expresado.

Así, según otro aspecto más, se proporciona una preparación de cuerpos de inclusión derivados de bacteria que están compuestos por más del 30 por ciento, preferentemente más del 50 %, más preferentemente más del 75 %, lo más preferentemente más del 90 % en peso del polipéptido recombinante o una mezcla de polipéptidos de la presente invención. El aislamiento de tales cuerpos de inclusión y la purificación del (de los) polipéptido(s) de los mismos se describe en detalle en la sección de ejemplos que sigue.

Como se demuestra en la sección de ejemplos que sigue, la expresión bacteriana del (de los) polipéptido(s) puede proporcionar altas cantidades de inmuno-moléculas puras y funcionales.

Según un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un método de producción de una inmuno-molécula de la invención. El método según este aspecto de la presente invención utiliza cualquiera de la(s) construcción (construcciones) de ácidos nucleicos descritas para expresar, en bacterias, un (los) polipéptido(s) descritos en el presente documento.

Tras la expresión, el polipéptido(s) se aísla/n y purifica/n como se describe más adelante.

Como se describe además en la sección de ejemplos que sigue, el (los) polipéptido(s) expresado(s) forman cuerpos de inclusión sustancialmente puros que son fácilmente aislados mediante técnicas de fraccionamiento muy conocidas en la técnica y purificados mediante, por ejemplo, etapas de desnaturalización-renaturalización.

Preferentemente, el (los) polipéptido(s) se renaturalizan y repliegan en presencia de un péptido restringido al MHC, que está ya sea unido a, coexpresado con o mezclado con otros polipéptidos de la invención y que es capaz de la unión del polipéptido de la clase I del MHC monocatenario. Como se describe además en la sección de ejemplos, esto permite generar un complejo de la clase I del MHC-péptido antigénico sustancialmente puro que puede purificarse además por cromatografía de exclusión por tamaño.

Se apreciará que el péptido restringido al MHC usado para el replegamiento puede ser co-expresado junto con (como un péptido independiente) o fusionarse con el polipéptido de la clase I del MHC humano soluble en las bacterias. En un caso tal, el polipéptido expresado y el péptido co-forman cuerpos de inclusión que pueden aislarse y utilizarse para la formación de complejos de la clase I del MHC-péptido antigénico.

Según un aspecto adicional, se proporciona un método de destrucción selectiva de una célula en un paciente, presentando la célula un antígeno (por ejemplo, un receptor). El método según este aspecto de la invención comprende administrar al paciente una inmuno-molécula que comprende: un dominio efector de la clase I del MHC humano soluble complejoado con un péptido restringido al MHC; y un dominio de direccionamiento, ya sea anticuerpo o dominio de direccionamiento de ligando, que está unido al dominio efector de la clase I del MHC humano soluble. El dominio de direccionamiento sirve para unir selectivamente al antígeno; por lo que el dominio efector de la clase I del MHC humano soluble complejoado con el péptido restringido al MHC inicia una respuesta inmunitaria mediada por CTL contra la célula, destruyendo así selectivamente la célula *in vivo*. La célula que va a ser destruida puede ser una célula cancerosa, en cuyo caso, el dominio de direccionamiento se seleccionará para la unión a un antígeno asociado a tumor caracterizado por dicha célula cancerosa.

Las siguientes secciones proporcionan ejemplos específicos y alternativas para cada uno de los diversos aspectos de la invención descritos en el presente documento. Estos ejemplos y alternativas no deben ser considerados como limitantes de ningún modo, ya que la invención puede ponerse en práctica en formas similares, aunque algo diferentes. Estos ejemplos, sin embargo, enseñan a los expertos en la materia sobre cómo poner en práctica las diversas alternativas y realizaciones de la invención.

Anticuerpo:

El término "anticuerpo" y la expresión "dominio de direccionamiento de anticuerpo", como se usa para describir la presente invención, incluye moléculas intactas, además de fragmentos funcionales de las mismas, tales como Fab, F(ab')₂, Fv y scFv que son capaces de unión específica de alta afinidad a un antígeno. Estos fragmentos de anticuerpos funcionales se definen como sigue: (i) Fab, el fragmento que contiene un fragmento de unión al antígeno monovalente de una molécula de anticuerpo, puede producirse por digestión del anticuerpo completo con la enzima papaína para dar una cadena ligera intacta y una porción de una cadena pesada; (ii) Fab', el fragmento de una molécula de anticuerpo que puede obtenerse tratando el anticuerpo completo con pepsina, seguido de reducción, para dar una cadena ligera intacta y una porción de la cadena pesada; se obtienen dos fragmentos Fab' por molécula de anticuerpo; (iii) F(ab')₂, el fragmento del anticuerpo que puede obtenerse tratando anticuerpo completo con la enzima pepsina sin reducción posterior; F(ab')₂ es un dímero de dos fragmentos Fab' mantenidos juntos por dos enlaces disulfuro; (iv) Fv, definido como un fragmento genéticamente manipulado que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada expresadas como dos cadenas; y (c) scFv o "anticuerpo

monocatenario" ("SCA"), una molécula genéticamente manipulada que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada, unidas por un conector polipeptídico adecuado como una molécula monocatenaria genéticamente fusionada.

- 5 Métodos de preparación de estos fragmentos son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988, incorporado en el presente documento por referencia).

10 Pueden prepararse fragmentos de anticuerpos según la presente invención por hidrólisis proteolítica del anticuerpo o por expresión en *E. coli* o células de mamífero (por ejemplo, cultivo de células de ovario de hámster chino u otros sistemas de expresión en proteína) de ADN que codifica el fragmento.

15 Pueden obtenerse fragmentos de anticuerpos por digestión con pepsina o con papaína de anticuerpos completos por métodos convencionales. Por ejemplo, pueden producirse fragmentos de anticuerpos por escisión enzimática de anticuerpos con pepsina para proporcionar un fragmento 5S indicado $F(ab')_2$. Este fragmento puede ser además escindido usando un agente reductor de tiol, y opcionalmente un grupo de bloqueo para los grupos sulfhidrilo resultantes de la escisión de enlaces disulfuro, para producir fragmentos monovalentes 3,5S Fab'. Alternativamente, una escisión enzimática usando pepsina produce dos fragmentos Fab' monovalentes y un fragmento Fc directamente. Estos métodos se describen, por ejemplo, por Goldenberg, patentes de EE.UU. N.º 4.036.945 y 4.331.647, y referencias contenidas en su interior, cuyas patentes se incorporan por este documento por referencia en su totalidad. Véase también Porter, R. R., *Biochem. J.*, 73: 119-126, 1959. También pueden usarse otros métodos de escisión de anticuerpos, tales como separación de cadenas pesadas para formar fragmentos de cadena ligera-pesada monovalentes, escisión de fragmentos adicional, u otras técnicas enzimáticas, químicas o genéticas, mientras que los fragmentos se unan al antígeno que es reconocido por el anticuerpo intacto.

25 Fragmentos Fv comprenden una asociación de cadenas V_H y V_L . Esta asociación puede ser no covalente, como se describe en Inbar et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 69:2659-62, 1972. Alternativamente, las cadenas variables pueden unirse por un enlace disulfuro intermolecular o reticularse por productos químicos tales como glutaraldehído. Preferentemente, los fragmentos Fv comprenden cadenas V_H y V_L conectadas por un conector peptídico. Estas proteínas de unión al antígeno monocatenarias (sFv) se preparan construyendo un gen estructural que comprende secuencias de ADN que codifican los dominios V_H y V_L conectados por un oligonucleótido. El gen estructural se inserta en un vector de expresión, que posteriormente se introduce en una célula hospedadora tal como *E. coli*. Las células hospedadoras recombinantes sintetizan una cadena de polipéptido individual con un péptido conector que une dos dominios V. Métodos de producción de sFv se describen, por ejemplo, por Whitlow y Filpula, *Methods*, 2: 97-105, 1991; Bird et al., *Science* 242:423-426, 1988; Pack et al., *Bio/Technology* 11:1271-77, 1993; y Ladner et al., patente de EE.UU. N.º 4.946.778, que se incorpora por este documento por referencia en su totalidad.

30 Otra forma de un fragmento de anticuerpo es un péptido que codifica una única región determinante de la complementariedad (CDR). Pueden obtenerse péptidos de CDR ("unidades mínimas de reconocimiento") construyendo genes que codifican la CDR de un anticuerpo de interés. Tales genes se preparan, por ejemplo, usando la reacción en cadena de la polimerasa para sintetizar la región variable de células productoras de ARN de anticuerpo. Véase, por ejemplo, Larrick y Fry, *Methods*, 2: 106-10, 1991.

45 Formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son moléculas quiméricas de inmunoglobulinas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', $F(ab')_2$ u otras subsecuencias de unión al antígeno de anticuerpos) que contienen secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo de receptor) en el que los restos que forman una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor están sustituidos por restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo de donante) tal como ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, restos de Fv de la región estructural de la inmunoglobulina humana están sustituidos por restos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender restos que no se encuentran ni en el anticuerpo de receptor ni en las CDR importadas o secuencias de la región estructural. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR se corresponden con aquellas de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana.

60 El anticuerpo óptimamente humanizado también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana [Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992)].

65 Métodos de humanización de anticuerpos no humanos son muy conocidos en la técnica. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en él de una fuente que es no humana. Estos restos de aminoácidos no humanos se denominan frecuentemente restos de importación, que normalmente son tomados de un dominio variable de importación. La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores [Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-327

(1988); Verhoeven et al., Science, 239:1534-1536 (1988)], sustituyendo CDR de roedor o secuencias de CDR por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, tales anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos (patente de EE.UU. N.º 4.816.567), en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido con la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados normalmente son anticuerpos humanos en los que algunos restos de CDR y posiblemente algunos restos de FR están sustituidos por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

También pueden producirse anticuerpos humanos usando diversas técnicas conocidas en la técnica, que incluyen bibliotecas de presentación en fagos [Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991)]. Las técnicas de Cole et al. y Boerner et al. también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985) y Boerner et al., J. Immunol., 147(1):86-95 (1991)]. Similarmente, pueden prepararse humanos introduciendo loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógenos han sido parcialmente o completamente inactivados. Tras la exposición, se observa producción de anticuerpos humanos, que se parece estrechamente a la observada en seres humanos en todos los aspectos, que incluyen reordenación de genes, ensamblaje y repertorio de anticuerpos. Este enfoque se describe, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. N.º 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, y en las siguientes publicaciones científicas: Marks et al., Bio/Technology 10, 779-783 (1992); Lonberg et al., Nature 368 856-859 (1994); Morrison, Nature 368 812-13 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14, 826 (1996); Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13 65-93 (1995).

Se apreciará que una vez se identifican las CDR de un anticuerpo usando técnicas convencionales de ingeniería genética, pueden usarse para concebir polinucleótidos expresables que codifican cualquiera de las formas o fragmentos de anticuerpos descritos en el presente documento.

Ligando

La tabla a continuación proporciona ejemplos no exhaustivos de receptores selectivamente expresados mediante una variedad de células tumorales, sus ligandos e información de secuencia referente a los ligandos, información de secuencia que puede usarse en la construcción de construcciones e inmuno-moléculas según la presente invención:

Receptor	Tumor (Ref)	Ligando	N.º de acceso de Genbank (secuencia de ácidos nucleicos)	N.º de acceso de Genbank (secuencia de aminoácidos)
EGFR	Mama, cerebro, pulmón (Niv et al Curr. Pharm. Biotech. 2:19-46, 2002)	EGF	L17029	AAB32226
PDGFR	Ovario, mama	PDGF	XO6374	CAA29677
EGFR mutante	Hígado, cerebro	EGF	S51343	AAB19486
IL-4R	Renal	IL-4	M13982	AAA59149
IL-6R	Mieloma	IL-6	M14584	AAA59149
IL-10R	Leucemias	IL-10	M57627	AAA63207
EGFR	Mama, ovario,	TGF α	M31172	AAA61157
VEGFR	Carcinomas de vasos sanguíneos	VEGF	M32977	AAA35789
KDR	Carcinomas de vasos sanguíneos	VEGF	M32977	AAA35789

Una clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) humano:

El complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) es un complejo de antígenos codificado por un grupo de loci unidos, que se llaman conjuntamente H-2 en el ratón y HLA en seres humanos. Las dos clases principales de los antígenos de MHC, clase I y clase II, comprenden cada una un conjunto de glucoproteínas de la superficie celular que desempeñan una función en determinar el tipo de tejido y la compatibilidad del trasplante. En reacciones de trasplante, los linfocitos T citotóxicos (CTL) responden principalmente contra glucoproteínas de clase I extrañas, mientras que los linfocitos T cooperadores responden principalmente contra glucoproteínas de clase II extrañas.

Las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I se expresan sobre la superficie de casi todas las células. Estas moléculas funcionan en la presentación de péptidos que derivan principalmente de proteínas endógenamente sintetizadas para linfocitos T CD8⁺ mediante una interacción con el receptor $\alpha\beta$ de linfocitos T. La molécula de la clase I del MHC es un heterodímero compuesto de una cadena pesada de 46 kDa que está no covalentemente asociada a la β -2-microglobulina de 12 kDa de cadena ligera. En seres humanos, hay varios haplotipos de MHC, tales como, por ejemplo, HLA-A2, HLA-A1, HLA-A3, HLA-A24, HLA-A28, HLA-A31, HLA-A33, HLA-A34, HLA-B7, HLA-B45 y HLA-Cw8, sus secuencias pueden encontrarse en la base de datos de Kabat, en <http://immuno.bme.nwu.edu/>, que se incorpora en el presente documento por referencia.

Péptidos que se unen a moléculas de la clase I del MHC; antígenos restringidos al MHC:

Péptidos restringidos a la clase I del MHC (también denominados en el presente documento indistintamente antígenos restringidos al MHC, péptidos restringidos al HLA, antígenos restringidos al HLA) que normalmente tienen 8-10 aminoácidos de longitud, se unen a la ranura de $\alpha 1$ - $\alpha 2$ de la cadena pesada mediante dos o tres restos de anclaje que interactúan con bolsillos de unión correspondientes en la molécula de MHC. La cadena de β -2-microglobulina desempeña una función importante en el transporte intracelular de la clase I del MHC, unión a péptido y estabilidad conformacional. Para la mayoría de las moléculas de clase I, se requiere la formación de un heterodímero que consiste en la cadena pesada de la clase I del MHC, péptido (auto o antigénico) y β -2-microglobulina para la maduración biosintética y expresión en la superficie celular.

Estudios de investigación realizados sobre la unión de péptido a moléculas de la clase I del MHC permiten definir motivos de MHC específicos funcionales en la presentación de péptidos derivados de antígenos virales, tumorales y auto-antígenos que son posiblemente inmunogénicos y podrían provocar la respuesta específica de linfocitos T citotóxicos (CTL).

Como se usa en el presente documento, el término "péptido" se refiere a péptidos nativos (tanto productos de degradación como péptidos sintéticamente sintetizados) y además a peptidomiméticos, tales como peptoides y semipeptoides que son análogos de péptido, que pueden tener, por ejemplo, modificaciones que convierten los péptidos en más estables mientras están en un cuerpo, o más inmunogénicos. Tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a, ciclación, modificación del extremo N, modificación del extremo C, modificación del enlace peptídico, que incluyen, pero no se limitan a, $\text{CH}_2\text{-NH}$, $\text{CH}_2\text{-S}$, $\text{CH}_2\text{-S=O}$, O=C-NH , $\text{CH}_2\text{-O}$, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$, S=C-NH , CH=CH o CF=CH , modificación de esqueletos y modificación de restos. Métodos de preparación de compuestos peptidomimético son muy conocidos en la técnica y se especifican en Quantitative Drug Design, C.A. Ramsden Gd., Capítulo 17.2, F. Choplin Pergamon Press (1992), que se incorpora por referencia como si se expusiera completamente en el presente documento. Detalle adicional a este respecto se proporciona en el presente documento.

Como se usa en el presente documento en la memoria descriptiva y en la sección de reivindicaciones más adelante, se entiende que el término "aminoácido" incluye los 20 aminoácidos que existen de forma natural; aquellos aminoácidos frecuentemente modificados post-traduccionalmente *in vivo*, que incluyen, por ejemplo, hidroxiprolina, fosfoserina y fosfotreonina; y otros aminoácidos poco usuales que incluyen, pero no se limitan a, ácido 2-aminoadípico, hidroxilisina, isodesmosina, nor-valina, nor-leucina y ornitina. Además, el término "aminoácido" incluye tanto D- como L-aminoácidos. Elaboración adicional de los posibles aminoácidos útiles según la presente invención y ejemplos de aminoácidos no naturales útiles en antígenos de péptido reconocibles de HLA-A2 de MHC-I se dan en el presente documento.

Basándose en datos experimentales acumulados, hoy en día es posible predecir cuáles de los péptidos de una proteína se unirán a MHC, clase I. La clase I del MHC de HLA-A2 ha sido hasta la fecha mejor caracterizada que otros haplotipos de HLA, aunque datos predictivos y/o esporádicos están disponibles para todos los otros haplotipos.

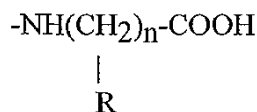
Con respecto a los péptidos de unión a HLA-A2, suponer las siguientes posiciones (P1-P9) en un péptido 9-mero:

P1-P2-P3-P4-P5-P6-P7-P8-P9

Las posiciones P2 y P2 incluyen los restos de anclaje que son los principales restos que participan en la unión a moléculas de MHC. Las posiciones de interacción de los restos de aminoácido P2 y P9 son aminoácido natural no cargado alifático hidrófilo (siendo ejemplos Ala, Val, Leu, Ile, Gln, Thr, Ser, Cys, preferentemente Val y Leu) o de un aminoácido no cargado alifático hidrófilo no natural (siendo ejemplos norleucina (Nle), norvalina (Nva), ácido α -aminobutírico). Las posiciones P1 y P3 también son conocidas por incluir restos de aminoácidos que participan o ayudan en la unión a moléculas de MHC, sin embargo, estas posiciones pueden incluir cualquier aminoácido, natural o no natural. Las otras posiciones son interaccionadas por restos de aminoácidos que normalmente no participan en la unión, más bien estos aminoácidos se presentan a las células inmunitarias. Más detalles referentes a la unión de péptidos a moléculas de MHC pueden encontrarse en Parker, K.C., Bednarek, M.A., Coligan, J.E., Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. J Immunol.152,163-175, 1994, véase la Tabla V, en particular. Por lo tanto, la puntuación de los péptidos de unión a HLA-A2.1 puede realizarse usando el software HLA Peptide Binding Predictions accesible mediante una interfaz de web mundial en http://www.bimas.dcrn.nih.gov/molbio/hla_bind/index.html. Este software se basa en datos acumulados y puntuaciones de cada péptido posible en una proteína analizada para la posible unión a HLA-A2.1 de MHC según la contribución de cada aminoácido en el péptido. Puntuaciones de unión teóricas representan la semivida calculada del complejo de HLA-A2.1-péptido.

Los aminoácidos naturales alifáticos hidrófilos en P2 y P9 pueden estar sustituidos por aminoácidos sintéticos, preferentemente Nleu, Nval y/o ácido α -aminobutírico. P9 también puede estar sustituido por aminoácidos alifáticos

de fórmula general $-\text{HN}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$, en la que $n = 3-5$, además de por derivados ramificados de los mismos, tales como, pero no se limitan a,



en la que R es, por ejemplo, metilo, etilo o propilo, localizado en uno cualquiera o más de los n carbonos.

El resto del extremo amino (posición P1) puede estar sustituido por ácidos carboxílicos alifáticos positivamente cargados, tales como, pero no se limitan a, $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$, en la que $n = 2-4$ y $\text{H}_2\text{N}-\text{C}(\text{NH})-\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$, en la que $n = 2-3$, además de por hidroxilisina, N-metil-lisina u ornitina (Orn). Además, el resto del extremo amino puede estar sustituido por restos aromáticos ampliados, tales como, pero no se limitan a, $\text{H}_2\text{N}-(\text{C}_6\text{H}_6)-\text{CH}_2-\text{COOH}$, p-aminofenilalanina, $\text{H}_2\text{N}-\text{F}(\text{NH})-\text{NH}-(\text{C}_6\text{H}_6)-\text{CH}_2-\text{COOH}$, p-guanidinofenilalanina o piridinoalanina (Pal). Estos últimos restos pueden formar enlace de hidrógeno con los restos OH^- de los restos de tirosina en el bolsillo de unión del extremo N de MHC-1, además de crear, interacciones aromático-aromático simultáneas.

La derivatización de restos de aminoácidos en las posiciones P4-P8, deben estos restos tener una cadena lateral, tal como OH, SH o NH_2 , como Ser, Tyr, Lys, Cys u Orn, puede ser por alquilo, arilo, alcanóilo o aroilo. Además, grupos OH en estas posiciones también pueden ser derivatizados por fosforilación y/o glucosilación. Se ha mostrado que estas derivatizaciones potencian en algunos casos la unión al receptor de linfocitos T.

Derivados más largos en los que el segundo aminoácido del anclaje está en la posición P10 pueden incluir en P9 la mayoría de los aminoácidos L. En algunos casos también son aplicables derivados más cortos, en los que el ácido del extremo C sirve del segundo resto de anclaje.

Derivados de aminoácido cíclico pueden interaccionar en la posición P4-P8, preferentemente posiciones P6 y P7. Puede obtenerse ciclación mediante formación de enlaces amida, por ejemplo, incorporando Glu, Asp, Lys, Orn, ácido di-aminobutírico (Dab), ácido di-aminopropiónico (Dap) en diversas posiciones en la cadena (enlaces $-\text{CO}-\text{NH}$ o $-\text{NH}-\text{CO}$). También puede obtenerse ciclación esqueleto a esqueleto mediante la incorporación de aminoácidos modificados de fórmulas $\text{H}-\text{N}((\text{CH}_2)_n-\text{COOH})-\text{C}(\text{R})\text{H}-\text{COOH}$ o $\text{H}-\text{N}((\text{CH}_2)_n-\text{COOH})-\text{C}(\text{R})\text{H}-\text{NH}_2$, en las que $n = 1-4$, y adicionalmente en las que R es cualquier cadena lateral natural o no natural de un aminoácido.

También es posible la ciclación mediante la formación de enlaces S-S mediante la incorporación de dos restos Cys. Puede obtenerse ciclación de cadena lateral a cadena lateral adicional mediante la formación de un enlace de interacción de fórmula $-(\text{CH}_2)_n-\text{S}-\text{CH}_2-\text{C}-$, en la que $n = 1$ o 2 , que es posible, por ejemplo, mediante la incorporación de Cys u homoCys y reacción de su grupo SH libre con, por ejemplo, Lys bromoacetilada, Orn, Dab o Dap.

Enlaces peptídicos ($-\text{CO}-\text{NH}-$) dentro del péptido pueden estar sustituidos por enlaces N-metilados ($-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CO}-$), enlaces éster ($-\text{C}(\text{R})\text{H}-\text{C}-\text{O}-\text{O}-\text{C}(\text{R})-\text{N}-$), enlaces cetometileno ($-\text{CO}-\text{CH}_2-$), enlaces α -aza ($-\text{NH}-\text{N}(\text{R})-\text{CO}-$), en las que R es cualquier alquilo, por ejemplo, metilo, enlaces carba ($-\text{CH}_2-\text{NH}-$), enlaces hidroxietileno ($-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$), enlaces tioamida ($-\text{CS}-\text{NH}-$), dobles enlaces olefínicos ($-\text{CH}=\text{CH}-$), enlaces retroamida ($-\text{NH}-\text{CO}-$), derivados de péptido ($-\text{N}(\text{R})-\text{CH}_2-\text{CO}-$), en las que R es la cadena lateral "normal", naturalmente presentada sobre el átomo de carbono.

Estas modificaciones pueden producirse en cualquiera de los enlaces a lo largo de la cadena de péptido e incluso en varios (2-3) al mismo tiempo. Preferentemente, pero no en todos los casos necesarios, estas modificaciones deben excluir aminoácidos de anclaje.

Los aminoácidos aromáticos naturales, Trp, Tyr y Phe, pueden estar sustituidos por ácido no natural sintético tal como TIC, naftilalanina (Nol), derivados de metilados en el anillo de Phe, derivados halogenados de Phe u o-metil-Tyr.

Antígenos restringidos al MHC de tumor:

Las referencias citadas en la siguiente tabla proporcionan ejemplos de péptidos restringidos al MHC de tumor de la clase I del MHC humano derivados de antígenos asociados a tumor (TAA) o marcadores de proteína asociados a diversos cánceres. Péptidos restringidos al MHC de tumor adicionales derivados de antígenos asociados a tumor (TAA) pueden encontrarse en <http://www.bmi-heidelberg.com/syfyfeithi/>

Cancer	TAA/Marcador	HLA	Referencia
Carcinoma de células transitorias	Uroplakina II	HLA-A2	WO 00/06723
Carcinoma de células transitorias	Uroplakina Ia	HLA-A2	WO 00/06723
Carcinoma de la próstata	Antígeno específico de la próstata	HLA-A2	WO 00/06723
Carcinoma de la próstata	Antígeno de membrana específico de próstata	HLA-A2	WO 00/06723

Cancer	TAA/Marcador	HLA	Referencia
Carcinoma de la próstata	Fosfatasa ácida de próstata	HLA-A2	WO 00/06723
Cáncer de mama	BA-46	HLA-A2	WO 00/06723
Cáncer de mama	Muc-1	HLA-A2	WO 00/06723
Melanoma	Gp100	HLA-A2	Referencia 54
Melanoma	MART1	HLA-A2	Referencia 54
Todos los tumores	Telomerasa	HLA-A2	Referencia 54
Leucemia	TAX	HLA-A2	Referencia 54
Carcinomas	NY-ESO	HLA-A2	Referencia 54
Melanoma	MAGE-A1	HLA-A2	Referencia 54
Melanoma	MAGE-A3	HLA-A24	Referencia 54
Carcinomas	HER2	HLA-A2	Referencia 54
Melanoma	Beta-catenina	HLA-A24	Referencia 54
Melanoma	Tirosinasa	HLA-DRB1	Referencia 54
Leucemia	Bcr-abl	HLA-A2	Referencia 54
Cabeza y cuello	Caspasa 8	HLA-B35	Referencia 54

Antígenos restringidos al MHC virales:

- 5 Las referencias citadas en la siguiente tabla proporcionan ejemplos de péptidos restringidos al MHC virales de la clase I del MHC humano derivados de antígenos virales.

Enfermedad	Antígeno viral	HLA	Referencia
SIDA (HTLV-1)	HIV-1 RT 476-484	HLA-A2	http://www.bmi-heidelberg.com/syfpeithi/
Gripe	G I L G F V F T L (SEQ ID NO:16)	HLA-A2	http://www.bmi-heidelberg.com/syfpeithi/
Enfermedad de CMV	CMV	HLA-A2	http://www.bmi-heidelberg.com/syfpeithi/
Linfoma de Burkitt	TAX	HLA-A2	http://www.bmi-heidelberg.com/syfpeithi/
Hepatitis C	HCV	HLA-A2	http://www.bmi-heidelberg.com/syfpeithi/
Hepatitis B	Proteína pre-S de VHB 85-66 S T N R Q S G R Q (SEQ ID NO:17)	HLA-A2	http://www.bmi-heidelberg.com/syfpeithi/
Leucemia HTLV-1	HTLV-1 tax 11-19	HLA-A2	http://www.bmi-heidelberg.com/syfpeithi/
Hepatitis	Antígeno de superficie del VHB 185-194	HLA-A2	http://www.bmi-heidelberg.com/syfpeithi/

Antígenos restringidos al MHC autoinmunitarios:

- 10 El sitio web <http://www.bmi-heidelberg.com/syfpeithi/> proporciona ejemplos de péptidos restringidos al MHC autoinmunitarios de la clase I del MHC humano derivados de antígenos autoinmunitarios.

Moléculas de la clase I del MHC solubles:

- 15 Secuencias que codifican complejos de la clase I y clase II del MHC recombinantes que son solubles y que pueden producirse en grandes cantidades se describen en, por ejemplo, las referencias 23, 24 y 41-53 y además en la solicitud de patente de EE.UU. N.º 09/534.966 y PCT/IL01/00260 (publicada como el documento WO 01/72768), todos los cuales se incorporan en el presente documento por referencia. Las moléculas de la clase I del MHC solubles están disponibles o pueden producirse por cualquiera de los haplotipos de MHC, tales como, por ejemplo,
- 20 HLA-A2, HLA-A1, HLA-A3, HLA-A24, HLA-A28, HLA-A31, HLA-A33, HLA-A34, HLA-B7, HLA-B45 y HLA-Cw8, siguiendo, por ejemplo, las enseñanzas del documento PCT/IL01/00260, ya que sus secuencias son conocidas y pueden encontrarse en la base de datos de kabat, en <http://immuno.bme.nwa.edu/>, el contenido del sitio se incorpora en el presente documento por referencia. Tales moléculas de la clase I del MHC solubles pueden cargarse con antígenos restringidos al MHC adecuados y usarse para la vacunación de mamífero no humano que tiene
- 25 células que expresan la clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) humano como se detalla además en el presente documento más adelante.

Conjugados químicos:

- 30 Se conocen en la técnica muchos métodos para conjugar o fusionar (acoplar) moléculas de diferentes tipos, que incluyen péptidos o polipéptidos. Estos métodos pueden usarse según la presente invención para acoplar un dominio efector de la clase I del MHC humano soluble con un dominio de direccionamiento de anticuerpo y opcionalmente con un antígeno restringido al MHC.
- 35 Pueden conjugarse o fusionarse dos péptidos aislados usando cualquier método de conjugación conocido para un experto en la materia. Un péptido puede conjugarse con otro usando un éster de N-hidroxisuccinimida de ácido 3-(2-piridilditio)propiónico (también llamado 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo) ("SDPD") (Sigma, Cat. N.º P-3415), un procedimiento de conjugación de glutaraldehído o un procedimiento de conjugación de carbodiimida.

Conjugación de SPDP:

Puede usarse cualquier método de conjugación de SPDP conocido para aquellos expertos en la materia. Por ejemplo, en una realización ilustrativa, se usa una modificación del método de Cumber et al. (1985, Methods of Enzymology 112: 207-224) como se describe más adelante.

Se mezcla un péptido (1,7 mg/ml) con un exceso de 10 veces de SPDP (50 mM en etanol) y el anticuerpo se mezcla con un exceso de 25 veces de SPDP en fosfato de sodio 20 mM, NaCl 0,10 M a pH 7,2 y cada una de las reacciones se incubaron, por ejemplo, durante 3 horas a temperatura ambiente. Las reacciones se dializan entonces contra PBS.

El péptido se reduce, por ejemplo, con DTT 50 mM durante 1 hora a temperatura ambiente. El péptido reducido se desala por equilibración en columna G-25 (hasta 5 % de muestra/volumen de columna) con KH_2PO_4 50 mM a pH 6,5. El péptido reducido se combina con el anticuerpo SPDP en una relación molar de 1:10 de anticuerpo:péptido y se incubaba a 4 °C durante la noche para formar un conjugado de péptido-anticuerpo.

Conjugación de glutaraldehído:

La conjugación de un péptido con otro péptido puede llevarse a cabo por métodos conocidos para aquellos expertos en la materia usando glutaraldehído. Por ejemplo, en una realización ilustrativa, se usa el método de conjugación por G.T. Hermanson (1996, "Antibody Modification and Conjugation, en Bioconjugate Techniques, Academic Press, San Diego) descrito más adelante.

Los péptidos (1,1 mg/ml) se mezclan a un exceso de 10 veces con 0,05 % de glutaraldehído en fosfato 0,1 M, NaCl 0,15 M a pH 6,8, y se deja que reaccionen durante 2 horas a temperatura ambiente. Puede añadirse lisina 0,01 M para bloquear el exceso de sitios. Después de la reacción, el exceso de glutaraldehído se elimina usando una columna G-25 equilibrada con PBS (10 % v/v de muestra/volumenes de columna)

Conjugación de carbodiimida:

La conjugación de un péptido con otro péptido puede llevarse a cabo por métodos conocidos para aquellos expertos en la materia usando un agente deshidratante tal como una carbodiimida. Lo más preferentemente, la carbodiimida se usa en presencia de 4-dimetilaminopiridina. Como es muy conocido para aquellos expertos en la materia, puede usarse la conjugación de carbodiimida para formar un enlace covalente entre un grupo carboxilo de péptido y un grupo hidroxilo de un péptido (produciendo la formación de un éster enlace), o un grupo amino de un péptido (produciendo la formación de un enlace amida) o un grupo sulfhidrilo de un péptido (produciendo la formación de un enlace tioéster).

Asimismo, puede usarse el acoplamiento de carbodiimida para formar enlaces covalentes análogos entre un grupo de carbono de un péptido y un grupo hidroxilo, amino o sulfhidrilo del otro péptido. Véase, generalmente, J. March, Advanced Organic Chemistry: Reaction's, Mechanism, and Structure, pp. 349-50 & 372-74 (3d ed.), 1985. Por medio de ilustración, y no limitación, el péptido se conjuga con otro mediante un enlace covalente usando una carbodiimida, tal como dicitohexilcarbodiimida. Véanse generalmente los métodos de conjugación por B. Neises et al. (1978, Angew Chem., Int. Ed. Engl. 17:522; A. Hassner et al. (1978, Tetrahedron Lett. 4475); E.P. Boden et al. (1986, J. Org. Chem. 50:2394) y L.J. Matias (1979, Synthesis 561).

Objetos adicionales, ventajas y características novedosas de la presente invención serán evidentes para un experto habitual en la materia tras el examen de los siguientes ejemplos, que no pretenden ser limitantes. Además, cada una de las diversas realizaciones y aspectos de la presente invención como se delinean anteriormente en este documento y como se reivindican en la sección de reivindicaciones a continuación encuentra soporte experimental en los siguientes ejemplos.

EJEMPLOS

Ahora se hace referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores, ilustran la invención de una forma no limitante.

Generalmente, la nomenclatura usada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Tales técnicas son minuciosamente explicadas en la bibliografía. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); metodologías como se exponen en las patentes de EE.UU. N.º 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory

Handbook", Volúmenes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" por Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Tercera Edición; "Current Protocols in Immunology" Volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8ª Edición), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., New York (1980);
 5 inmunosayos disponibles se describen ampliamente en la bibliografía de patentes y científica, véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.º 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); todos los cuales se incorporan por referencia como si se expusieran completamente en el presente documento. Otras referencias generales se proporcionan durante todo este documento. Se cree que los procedimientos en el presente documento son muy conocidos en la técnica y se proporcionan para conveniencia del lector.

Materiales y métodos experimentales

Péptidos: Se sintetizaron péptidos por química de fluorenilmetoxycarbonilo estándar y se purificaron > 95 % por HPLC de fase inversa. Los péptidos restringidos al HLA-A2 asociados a tumor usados son: G9-209-2M (IMDQVPFSV, SEQ ID NO:8) y G9-280-9V (ILEPGPVT, SEQ ID NO:9), ambos derivados del antígeno de diferenciación de melanoma gp100 y son epítopes inmunodominantes comunes (32-34). Estos péptidos se modifican en las posiciones de anclaje de MHC 2 (en G9-209-2M) y 9 (en G9-280-9V) para mejorar la afinidad de unión al HLA-A2 (27). Se usó el péptido derivado de HTLV-1 (LLFGYPVYV, SEQ ID NO:10) como control.

Líneas celulares: Se mantuvieron células A431, ATAC4 (carcinoma epidermoide), HUT102W y CRII-2 (leucemia, ATL) en RPMI + 10 % de FCS. Las células ATAC4 son células de carcinoma epidermoide A431 humano transfectadas establemente con la subunidad α del receptor de IL-2 (p55, Tac, CD25) (53). Las células transfectadas se mantuvieron en medio de crecimiento que contenía 500 μ g/ml de G418 (Gibco-BRL).

Construcciones de plásmido: Se construyó la molécula MHCmc como se describe previamente uniendo β -microglobulina humana con los tres dominios extracelulares del gen de HLA-A2 (24, 25, documento WO 01/72768). Los genes del dominio variable VL(cys) y VH(cys) del MAb anti-Tac se construyeron previamente para formar la molécula dsFv anti-Tac en la que los dos dominios variables se mantienen juntos y se estabilizan por un enlace disulfuro intercatenario manipulado en restos conservados de la región estructural (29, 30). Para construir la molécula MHCmc-aTacVL, el extremo C de la molécula MHCmc se conectó al extremo N de VL anti-Tac usando un conector flexible de 15 restos de largo (Gly₄-Ser)₃ (SEQ ID NO:3). Se usaron ADNc amplificados por PCR de ambas moléculas en una reacción de extensión por solapamiento de PCR de dos etapas en la que el extremo 3' de MHCmc se conectó al extremo 5' del gen VL. En la primera etapa, se introdujeron dos tercios de la secuencia conectora y sitios de clonación en cualquier gen usando los oligonucleótidos: MHCmc-5: 5'-GGAAGCGTTGGCGCATATGATCC AGCGTACTCC-3' (SEQ ID NO:11) y MHCmc-3: 5'-TCCTGAACCTCCGCCACCGGACCCTCCTCCGCCCTCCCATCTCAGGG T-3' (SEQ ID NO:12), que introducen un sitio de restricción *NdeI* en el extremo 5' del gen de MHCmc y dos tercios del conector en el extremo 3'. El gen VL anti-Tac se amplificó por PCR con los oligonucleótidos: VL-Tac-5: 5'-TCCGGTGGCGGAGGTTTCAGGAGGCGGTGGATCGCAAATTGTTCTCACC-3' (SEQ ID NO:13) y VL-Tac-3: 5'-GCAGTAAGGAA TTCATTAGAGCTCCAGCTTGGT-3' (SEQ ID NO:14) para introducir dos tercios del conector en el extremo 5' del gen VL y un sitio de clonación *EcoRI* en el extremo 3'. En una segunda etapa de ensamblaje, los dos productos de PCR se combinaron en una relación 1:1 (50 ng cada uno) para formar una reacción de extensión por solapamiento de PCR usando los cebadores MHCmc-5 y VL-Tac-3 para el ensamblaje de la construcción MHCmc-aTacVL. El producto de PCR se subclonó posteriormente en el vector de expresión basado en pET pULI7 (49) usando los sitios de restricción *NdeI* y *EcoRI*. Se subclonó el gen VH anti-Tac para preparar el fragmento dsFv anti-Tac en pULI7 como se describe previamente (29).

Expresión, replegamiento y purificación de complejos de B2M-aTac(dsFv)-péptido: Los componentes de B2M-aTac(dsFv); MHCmc-aTacVL y aTacVH, se expresaron en células BL21 (Δ DE3) separadas (Novagen, Madison, WI). Tras la inducción con IPTG, se acumularon grandes cantidades de proteína recombinante insoluble en cuerpos de inclusión intracelulares. Se aislaron y purificaron cuerpos de inclusión de cada componente a partir de las células BL21 inducidas como se ha descrito previamente (29, 49). Brevemente, se realizó la rotura de células con 0,2 mg/ml de lisozima, seguido de la adición de 2,5 % de TRITON X-100 y NaCl 0,5 M. Se recogieron sedimentos de cuerpos de inclusión por centrifugación (13.000 rpm, 60 minutos a 4 °C) y se lavaron 3 veces con tampón Tris 50 mM, pH 7,4, que contenía EDTA 20 mM. Se determinó la expresión de cada componente de proteína recombinante en cuerpos de inclusión aislados y purificados analizando una muestra en SDS-PAGE como se muestra en la Figura 2B. Los cuerpos de inclusión aislados y purificados se solubilizaron en HCl de guanidina 6 M, pH 7,4, seguido de reducción con DTE 65 mM. Cuerpos de inclusión solubilizados y reducidos de MHCmc-aTacVL y aTacVH, mezclados en una relación molar 1:2, se replegaron por una dilución 1:100 en un sistema de tampón redox-barajado que contenía Tris

0,1 M, arginina 0,5 M, glutatión oxidado 0,09 mM, pH 10,0, en presencia de un exceso molar de 5-10 de los péptidos restringidos al HLA-A2. La concentración de proteína final en el replegamiento fue 50 µg/ml. Después del replegamiento, la proteína se dializó contra urea 100 mM, Tris 20 mM, pH 7,4, seguido de purificación de complejos de MHCmc-aTac(dsFv)-péptido solubles por cromatografía de intercambio iónico sobre columna de Q Sepharose (7,5 mm de diámetro interno x 60 cm de longitud, Pharmacia) aplicando una gradiente de sal (NaCl) (0-0,4 M). Las fracciones pico que contenían MHCmc-aTac(dsFv) se sometieron entonces a cromatografía de exclusión por tamaño (TSK3000) para más purificación e intercambio de tampón a PBS.

ELISA: Se recubrieron inmunoplasmas (Falcon) con 10 µg/ml de antígeno p55 purificado (durante la noche a 4 °C). Las placas se bloquearon con PBS que contenía 2 % de leche desnatada y entonces se incubaron con diversas concentraciones de B2M-aTac(dsFv)-péptido (90 minutos a temperatura ambiente). La unión se detectó usando el anticuerpo dependiente de conformación anti-HLA W6/32 (60 minutos, temperatura ambiente, 10 µg/ml). La reacción se desarrolló usando anti-IgG de ratón-peroxidasa. Se usó anticuerpo anti-Tac de conejo como control positivo, seguido de peroxidasa anti-conejo.

Citometría de flujo: Las células se incubaron con complejos de B2M-aTac(dsFv)-péptido (60 minutos a 4 °C en 300 µl, 25 µg/ml), se lavaron y se incubaron con el MAb anti-HLA-A2 BB7.2 (60 minutos a 4 °C, µg/ml). La detección fue con FITC anti-ratón. Se usó anti-Tac humano (10 µg/ml) como control positivo para determinar la expresión del antígeno p55, seguido de incubación con anticuerpo marcado con FITC anti-humano. Las células se lavaron posteriormente y se analizaron por citómetro de flujo de Beckman FACScaliber.

Clones de CTL y estimulación: Se proporcionaron clones de CTL específicos para los péptidos derivados de gp100 de melanoma por los Drs. Steven Rosenberg y Mark Dudley, Rama de Cirugía, Instituto Nacional del Cáncer, NIH. Estos clones de CTL se generaron clonando a partir de cultivos a granel de CMSP de pacientes que recibieron inmunizaciones con péptido (26). Se expandieron clones de CTL por incubación con células FM3D de melanoma irradiadas (como fuente de antígeno) y las células JY transformadas por VEB (linfoblastos B como células presentadoras de antígenos). La mezcla de estimulación también contuvo el anticuerpo OKT3 (30 ng/ml) y 50 UI/ml de IL-2 e IL-4.

Ensayos de citotoxicidad: Se cultivaron células diana en placa de 96 pocillos (2.5×10^3 células por pocillo) en RMPI+10 FCS. Las células se lavaron y se incubaron con metionina y medio sin suero durante 4 horas, seguido de incubación (durante la noche) con 15 µCi/ml de ^{35}S -metionina (NEN). Después de 3 horas de incubación con complejos de B2M-aTac(dsFv)-péptido (a 37 °C, 10-20 µg/ml), se añadieron células CTL efectoras a la relación diana:efectoras como se indica y se incubaron durante 8-12 horas a 37 °C. Tras la incubación, la liberación de ^{35}S -metionina de células diana se midió en una muestra de 50 µl del sobrenadante de cultivo. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. El porcentaje de lisis específica se calculó del siguiente modo: [(liberación experimental - liberación espontánea)/(liberación máxima - liberación espontánea)] x 100. La liberación espontánea se midió como ^{35}S -metionina liberada de células diana en ausencia de células efectoras, y la liberación máxima se midió como ^{35}S -metionina liberada de células diana lisadas por NaOH 0,1 M.

Resultados experimentales

Diseño de B2M-anti-Tac(dsFv): Recientemente, se generó una construcción que codifica un MHC monocatenario (MHCmc) soluble en el que el gen de β -2-microglobulina humana está unido a los tres dominios extracelulares (α 1, α 2 y α 3) del gen de cadena pesada de HLA-A2 (aa 1-275) mediante un conector flexible de 15 aminoácidos de longitud (24, 25 y documento WO 01/72768, que se incorpora en el presente documento por referencia). Estas moléculas de MHCmc se expresaron en *E. coli* como cuerpos de inclusión intracelulares y tras el replegamiento *in vitro* en presencia de péptidos asociados a tumor restringido al HLA-A2 o virales forman complejos de MHCmc-péptido correctamente plegados y funcionales y tetrámeros (24, 25, documento WO 01/72768). Estos complejos MHCmc-péptido han sido caracterizados en detalle para sus características bioquímicas y biofísicas, además de para su actividad biológica y se encuentra que son funcionales (24, 25, documento WO 01/72768). Y, lo que es más importante, fueron capaces de unirse a y teñir líneas de CTL específicos de tumor y clones. En las Figuras 1A-H se muestran la construcción y reactividad de estos complejos de MHCmc-péptido, en forma de tetrámeros de MHCmc, con CTL específicos para los epítopes del antígeno de diferenciación de melanoma gp100 G9-209M y G9-280V (26). Estos péptidos se modifican en las posiciones de anclaje del MHC 2 (en G9-209M) y 9 (en G9-280V) para mejorar la afinidad de unión a HLA-A2 (27). Los clones de CTL CD8⁺ (Figuras 1A y 1D) R6C12 y R1E2 se tiñeron intensamente (80-95 %) y específicamente con los tetrámeros de MHCmc que contienen G9-209M y G9-280V, respectivamente (Figuras 1B y 1E). Como control de especificidad, CTL R6C12 específicos de G9-209M y R1E2 específicos de G9-280V no se tiñeron por tetrámeros de G9-280V y G9-209M scHLA-A2, respectivamente (Figuras 1C y 1F). Estos CTL también reaccionaron con una intensidad similar con los epítopes no modificados no mutados G9-209 y G9-280 (datos no mostrados).

Para generar la molécula de B2M-aTac(dsFv) que dirige la molécula de MHCmc a células mediante el uso de un fragmento Fv de anticuerpo, en el extremo C del gen de HLA-A2, se fusionó el dominio variable del gen de cadena ligera (VL) del anti-CD25 humanizado (también conocido como Tac, p55, subunidad α de IL-2R) con el anticuerpo monoclonal anti-Tac (28) (Figura 2A). El dominio variable de la cadena pesada (VH) está codificado por otro plásmido para formar un fragmento de anticuerpo Fv estabilizado por disulfuro (dsFv) en el que los dominios VH y

VL se mantienen juntos y estabilizados por un enlace disulfuro intercatenario manipulado entre restos estructuralmente conservados de la región estructural de Fv (Figuras 2A, 2E y 2F) (29,30). Las posiciones en las que los restos de cisteína están situados se identificaron por modelado molecular basado en ordenador; como están situados en la región estructural de cada VH y VL, esta localización puede usarse como método general para estabilizar todos los Fv sin la necesidad de información estructural adicional. Muchos dsFv han sido construidos en los últimos años, que han sido caracterizados en detalle y encontrado que son extremadamente estables y con afinidad de unión tan buena como otras formas de anticuerpos recombinantes y en muchos casos incluso mejoradas (30, 31).

Construcción, expresión y purificación de B2M-anti-Tac(dsFv): Para generar la molécula B2M-aTac(dsFv), se construyeron dos plásmidos de expresión basados en el promotor T7 (véase también la sección de Materiales y métodos experimentales anterior en este documento); la molécula de MHCmc fusionada con el dominio VL anti-Tac (B2M-aTacVL) está codificada por un plásmido y el dominio VH anti-Tac está codificado por el segundo. En ambos plásmidos, los dominios VL y VH contienen una cisteína que se manipuló en lugar de un resto conservado en la región estructural para formar un fragmento dsFv (30). El plásmido de expresión para B2M-aTacVL se generó por una reacción de PCR de extensión por solapamiento en la que los genes de HLA-A2 y VL se unieron por un conector flexible de 15 aminoácidos de longitud de [(gly₄-ser)₃, (SEQ ID NO:3)] que es idéntico al conector usado para conectar la β 2-microglobulina y genes de HLA-A2 en la construcción de MHCmc (24, 25, documento WO 01/72768). La construcción del plásmido de expresión para el dominio VH anti-Tac se describió previamente (29). Los dos plásmidos se expresaron por separado en células BL21 de *E. coli*. Tras la inducción con IPTG, se acumularon grandes cantidades de proteína recombinante en cuerpos de inclusión intracelulares. El análisis de SDS-PAGE de los cuerpos de inclusión aislados y purificados demostró que las proteínas recombinantes con el tamaño correcto constituyeron el 80-90 % de la proteína de cuerpos de inclusión total (Figura 2B). Los cuerpos de inclusión de cada componente se aislaron por separado, solubilizaron, redujeron y replegaron en un tampón de renaturalización que contenía aditivos de redox-barajado y de prevención de la agregación, en presencia de péptidos restringidos al HLA-A2 de los epítopes de linfocitos T del antígeno de diferenciación de melanoma gp100 G9-209M y G9-280V (32-34, 27). Se mezclaron los componentes solubilizados y reducidos, B2M-aTacVL y anti-TacVH en una relación molar 1:2 en presencia de un exceso molar de 100 veces el péptido restringido al HLA-A2. Se encontró que los complejos de MHCmc-péptido y las proteínas de fusión de Fv de anticuerpo previamente generadas usando este protocolo de replegamiento se plegaron correctamente y fueron funcionales (24, 25, 30). Se purificaron moléculas de B2M-aTac(dsFv)/péptido (complejos) de la solución de replegamiento por cromatografía de intercambio iónico usando columnas Q-Sepharose. Como se muestra en la Figura 2C, análisis de SDS-PAGE no reductora de fracciones pico eluidas de la columna MonoQ revelaron la presencia de moléculas de B2M-aTac(dsFv) monoméricas con el peso molecular correcto de aproximadamente 67 kDa. Estas fracciones contuvieron también moléculas de un solo dominio de B2M-aTacVL que no estuvieron emparejadas con VH. Estas moléculas de B2M de un solo dominio son difíciles de separar de las moléculas de B2M-dsFv debido a que, como también se mostró previamente con otras proteínas de fusión de dsFv, el plegamiento de fusiones de VL es muy eficiente y el producto es bastante soluble. Sin embargo, la contaminación con las moléculas de B2M de un solo dominio no interfirió con los posteriores análisis de la molécula de B2M-aTac(dsFv) soluble. Para confirmar la correcta formación del fragmento dsFv, se realizó un análisis de SDS-PAGE reductor en el que la molécula de B2M-dsFv se separó en su componentes. Se muestra (Figura 2D) la forma molecular de B2M-aTac(dsFv) después de la reducción que contiene B2M-aTacVL y los dominios VH. En cualquier caso, pueden usarse otras técnicas de separación por tamaño para purificar la molécula B2M-aTac(dsFv) a homogeneidad.

Se probó la capacidad de B2M-aTac(dsFv) para unirse a su antígeno diana, la subunidad α del receptor de IL-2 (p55), primero por ELISA usando p55 purificado. Para monitorizar la unión de B2M-aTac(dsFv) purificado a pocillos recubiertos de p55, se usó el anticuerpo monoclonal w6/32, que reconoce moléculas de HLA solo cuando se pliegan correctamente y contienen péptido. Como se muestra en la Figura 2E, B2M-aTac(dsFv) se une en un modo dependiente de la dosis a p55, que indica que los dos dominios funcionales de la molécula, el dominio efector de MHCmc y el dominio de direccionamiento del anticuerpo dsFv, están correctamente plegados, indicado por la capacidad del resto dsFv de unirse al antígeno diana y el reconocimiento de MHCmc por el anticuerpo anti-HLA específico de conformación.

Unión de B2M-aTac(dsFv) a células diana: Para probar la capacidad de la molécula B2M-aTac(dsFv) de recubrir y dirigirse a complejos de HLA-A2-péptido sobre células tumorales, se probó su unión a células tumorales HLA-A2 negativo por citometría de flujo. Primero, se usaron células de carcinoma epidermoide humano A431, que se transfectaron establemente con el gen de p55 (células ATAC4) (35) y se probó la tinción de células parentales transfectadas frente a no transfectadas. La unión de B2M-aTac(dsFv) a las células se monitorizó usando un anticuerpo secundario MAb anti-HLA-A2 BB7.2 y marcado con FITC. La expresión del antígeno diana p55 se detectó por el anticuerpo monoclonal anti-Tac completo del que derivó el fragmento dsFv. Como se muestra en la Figura 3A, células A431 no expresan p55, sin embargo, las células ATAC4 transfectadas con p55 expresan altos niveles del antígeno (Figura 3B). Ninguna línea celular fue HLA-A2 positiva (Figura 3C y 3D). Cuando se prueba la unión de B2M-aTac(dsFv) a estas células, las Figuras 3C y 3D muestran que células ATAC4 dieron una tinción anti-HLA-A2 positiva solo cuando se preincubaron con B2M-aTac(dsFv) (Figura 3D), pero las células A431 fueron negativas cuando se preincubaron con B2M-aTac(dsFv).

A continuación, se probó la unión de B2M-aTac(dsFv) a células leucémicas que, como se muestra en la Figura 3E, expresan el antígeno p55 pero carecen de expresión de HLA-A2 (Figura 3F). Como se muestra en la Figura 2F, las células HUT102W leucémicas de ATL que expresan p55 dieron una tinción anti-HLA-A2 positiva cuando se preincubaron con B2M-aTac(dsFv). Se observaron resultados similares cuando células CR11-2 HLA-A2-negativas p55-positivas de leucemia (ATL) se preincubaron con la molécula B2M-aTac(dsFv) (datos no mostrados). Estos resultados demuestran que B2M-aTac(dsFv) puede unirse a su antígeno como se presenta en la forma nativa sobre la superficie de células. Y, lo que es más importante, B2M-aTac(dsFv) podría usarse para recubrir células HLA-A2 negativas de un modo que fuera completamente dependiente de la especificidad del tumor que se dirige al fragmento de anticuerpo que las convierte en células HLA-A2 positivas.

Inducción de la susceptibilidad mediada por B2M-aTac(dsFv) a la lisis de CTL: Para probar la capacidad de B2M-aTac(dsFv) para potenciar la susceptibilidad de células HLA-A2 negativas a células diana radiomarcadas de destrucción mediada por CTL, primero se incubaron con B2M-aTac(dsFv) y luego se probaron en un ensayo de liberación de ³⁵S-metionina en presencia de CTL específicos del péptido gp100 de melanoma restringido al HLA. Como se muestra en la Figura 4A, B2M-aTac(dsFv) indujo una eficiente lisis mediada por CTL de células ATAC4 HLA-A2 negativas p55-positivas mientras que la misma molécula B2M-aTac(dsFv) no tuvo ningún efecto y no indujo la lisis de células A431 que no expresan el antígeno. Células A431 y ATAC4 solas no presentaron ninguna lisis mediada por CTL (Figura 4A). La incubación de células ATAC4 con MHCmc solo, no fusionado con el resto de direccionamiento de dsFv, o con el anticuerpo anti-Tac, no produjo ninguna potenciación detectable de la lisis mediada por CTL (datos no mostrados). La capacidad de CTL específicos de péptidos G9-209M para destruir células ATAC4 preincubadas con B2M-aTac(dsFv) (pero no células A431) fue tan buena como, y en muchos experimentos mejor que, la eficiencia de estos CTL para lisar células FM3D de melanoma que expresan altos niveles de HLA-A2 y el antígeno de diferenciación de melanoma gp100 (36) (Figura 4B). Para demostrar la especificidad de la destrucción por CTL mediada por B2M-aTac(dsFv) para el péptido antigénico restringido al HLA-A2 usado en el replegamiento de la molécula de B2M-aTac(dsFv), se usaron dos clones de CTL, específicos para los epítopes de linfocitos T importantes de gp100 G9-209M y G9-280V. Como se muestra en la Figura 4C, se lisaron células ATAC4 HLA-A2-negativas p55-positivas por el clon de CTL específico del péptido G9-209M R6C12 solo cuando se preincubaron con B2M-aTac(dsFv) replegado con el péptido G9-209M, pero no con el epítipo de G9-280V derivado del mismo antígeno de diferenciación de melanoma ni con B2M-aTac(dsFv) replegado alrededor del epítipo TAX de linfocitos T restringido al HLA-A2 de HTLV-1. Similarmente, se destruyeron células ATAC4 por el clon de CTL específico de G9-280V R1E2 solo cuando se preincubó con B2M-aTac(dsFv) replegado con el epítipo de G9-280V, pero no con los péptidos G9-209M o TAX (Figura 4D). A continuación, se probó la lisis de CTL mediada por B2M-aTac(dsFv) de p55 que expresan células leucémicas HLA-A2 negativas HUT102W y CR11-2. Como se muestra en la Figura 4E, HUT102W y CR11-2 no fueron susceptibles a la lisis por los clones de CTL restringidos al HLA-A2 R6C12 y R1E2, específicos para los péptidos de gp100 G9-209M y G9-280V, respectivamente. Sin embargo, cuando estas células diana HLA-A2-negativas p55-positivas se preincubaron con la molécula de B2M-aTac(dsFv) se observó una potenciación significativa para lisis mediada por CTL que fue específica para el péptido gp100 presente en el complejo B2M-aTac(dsFv) (Figura 4E). Células HUT102W recubiertas con B2M-aTac(dsFv) fueron eficientemente destruidas por los clones de CTL R6C12 y R1E2 específicos de péptidos G9-209M y G9-280V, respectivamente, y células CR11-2 fueron lisadas por el clon de CTL R1E2. Células diana HLA-A2 positivas y negativas no de melanoma de control que no expresan p55 no presentaron ninguna susceptibilidad detectable a la lisis por los clones de CTL específicos de melanoma tanto recubiertos como no recubiertos con la molécula B2M-aTac(dsFv) (datos no mostrados). Estos resultados demuestran claramente, *in vitro*, el concepto de que la construcción de B2M-aTac(dsFv) puede usarse eficientemente para el direccionamiento específico de antígeno de tumor guiado por anticuerpo de complejos de MHC-péptido en células tumorales para convertirlos en susceptibles a la lisis por CTL relevantes y así potenciar respuestas inmunitarias antitumorales.

Actividad *in vivo* de B2M-aTac(dsFv):

Para evaluar inicialmente la actividad *in vivo* de B2M-aTac(dsFv) en un modelo de tumor humano, se realizó un ensayo no mutado en el que se mezclaron células ATAC4 con CTL R6C12 específicos para el péptido derivado de gp100 G9-209M en presencia o ausencia de la molécula B2M-aTac(dsFv). La mezcla se inyectó por vía subcutánea a ratones sin pelo y se siguió la formación de xenoinjertos humanos en los animales. Como se muestra en la Figura 5, células ATAC4 generaron xenoinjertos en ratones sin pelo 10-12 días después de inyección subcutánea.

Una mezcla de ATAC4 y CTL R6C12 no presentó ningún efecto significativo sobre el crecimiento tumoral. Sin embargo, cuando el receptor de IL-2 que expresa células ATAC4 se mezcló con B2M-aTac(dsFv) y CTL R6C12 se observó inhibición completa del crecimiento tumoral que indica la eficiente destrucción mediada por CTL inducida por B2M-aTac(dsFv) de células diana ATAC4 *in vivo*. Resultados *in vitro* (Figuras 4A-E) confirmaron que la cantidad de B2M-aTac(dsFv) y la relación de efectoras con respecto a diana usada para el ensayo *in vivo* produjo lisis máxima de células diana ATAC4 (95-100 % de destrucción). Células A431 negativas para el receptor de IL-2 parentales mezcladas con CTL R6C12 en presencia o ausencia de B2M-aTac(dsFv) generaron tumores eficientemente, por lo que no se observó efecto sobre el crecimiento tumoral (no mostrado).

Referencias citadas

(Referencias adicionales se citan en el texto)

- 5 1. Gilboa, E. (1999) How tumors escape immune destruction and what we can do about it. **Cancer Immunol Immunother.** 48, 343-5
2. Seliger B, Maeurer MJ, Ferrone S (2000) Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth. **Immunol Today.** 21,455-64.
- 10 3. Garrido F₅ Algaire I. (2001) MHC antigens and tumor escape from immune surveillance. *Adv Cancer Res.*;83:1 17-58.
4. Ferrone S, Finerty JF₅ Jaffee EM, Nabel GJ.(2000) How much longer will tumour cells fool the immune system? **Immunol Today.** 21,70-2.
5. Marineóla FM, Jaffee EM, Hicklin DJ, Ferrone S. (2000) Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. **Adv Immunol.** 74,181-273.
- 15 6. Rosenberg, S.A. (2001) Progress in human tumour immunology and immunotherapy. **Nature** 411,380-4
7. Lee₅P.P. **et al.** (1999) Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients. **Nat. Med.** 5, 677-685.
8. Mocellin S, Wang E, Marineóla FM. (2001) Cytokines and Immune Response in the Tumor Microenvironment. **J Immunother.** 24, 392- 407.
- 20 9. Offringa, R., van der Burg, S.H., Ossendorp, F. Toes, R.E., & Melief, C.J. Design and evaluation of antigen-specific vaccination strategies against cancer. (2000)*Cwrr Opin Immunol* 12, 576-82.
10. Esche, C., Shurin, M.R., Lotze, M.T., (1999) The use of dendritic cells for cancer vaccination. **Curr Opin Mol Ther** 1,72-81
11. Wang E, Phan GQ, Marineóla FM. (2001) T-cell-directed cancer vaccines: the melanoma model. **Expert Opin Biol Ther.** 1, 277-90.
- 25 12. Boon, T., & van der Brüggen, P. (1996) Human tumor antigens recognized by T lymphocytes. **JExp Med** 183,725-9.
13. Renkvist, N.,Castelli, C., Robbins, PF, & Parmiani, G. (2001) A listing of human tumor antigens recognized by T cells. **Cancer Immunol Immunother** 50, 3-15
- 30 14. Ferrone S, Marineóla FM. (1995) Loss of HLA class I antigens by melanoma cells: molecular mechanisms, functional significance and clinical relevance. **Immunol Today.** 16,487-94.
15. Hicklin DJ, Marineóla FM, Ferrone S. (1999) HLA class I antigen downregulation in human cancers: T-cell immunotherapy revives an old story*MolMed Today* 5, 178-86.
16. Mendez R, **et al.** (2001) Analysis of HLA class I expression in different metastases from two melanoma patients undergoing peptide immunotherapy.*r/ww* **Antigens.** 57, 508-19.
- 35 17. Real LM, (2001) **et al** Multiple mechanisms of immune evasion can coexist in melanoma tumor cell lines derived from the same patient. **Cancer Immunol Immunother.** 49, 621-8.
18. Restifo NP, Marineóla FM, Kawakami Y, Taubenberger J, Yannelli JR, Rosenberg SA. (1996) Loss of functional beta 2- microglobulin in metastatic melanomas from five patients receiving immunotherapy. **JNatl Cancer Inst.** 88, 100-8.
- 40 19. Seliger B, Maeurer MJ, Ferrone S. (1997) TAP off—tumors on. **Immunol Today** 18, 292-9.
20. Vitale M, **et al** (1998) HLA class I antigen and transporter associated with antigen processing (TAP1 and TAP2) down-regulation in high-grade primary breast carcinoma lesions. **Cancer Res.** 58,737-42.
21. Johnsen A, France J, Sy MS, Harding CV. (1998) Down- regulation of the transporter for antigen presentation, proteasome subunits, and class I major histocompatibility complex in tumor cell lines. **Cancer Res.** 58,3660-7.
- 45 22. Hudson PJ, Souriau C. (2001) Recombinant antibodies for cancer diagnosis and therapy .*Expert Opin Biol Ther.* 1,845-55.
23. Cheng JD, Rieger PT, von Mehren M, Adams GP, Weiner LM. (2000) Recent advances in immunotherapy and monoclonal antibody treatment of cancer. **Semin Oncol Nurs.** 16,2-12.
- 50 24. Denkberg₅G., Cohen₅CJ., Segal₅D., Kirkin,A.F. & Reiter₅Y. (2000) Recombinant human single-chain MHC-peptide complexes made from E. coli by in vitro refolding: functional single-chain MHC-peptide complexes and tetramers with tumor associated antigens. **Eur. J Immunol.** 30, 3522-3532.
25. Denkberg, G., Cohen, C.J., & Reiter, Y. (2001) Critical role for cd8 in binding of mhc tetramers to ter: cd8 antibodies block specific binding of human tumor- specific mhc-peptide tetramers to TCR. **J Immunol** 167,270-6
- 55 26. Dudley₅M-E., Ngo,L.T., Westwood₅J., Wunderlich,J.R. & Rosenberg₅S.A. (2000) T-cell clones from melanoma patients immunized against an anchor- modified gp100 peptide display discordant effector phenotypes. **Cancer J** 6, 69-77
27. Parkhurst MR, **et al** (1996) Improved induction of melanoma- reactive CTL with peptides from the melanoma antigen gp100 modified at HLA-A*0201-binding residues. **Jimmunol.** 157,2539-48.
- 60 28. Uchiyama T, Broder S, Waldmann TA. . (1981) A monoclonal antibody (anti-Tac) reactive with activated and functionally mature human T cells.I. Production of anti-Tac monoclonal antibody and distribution of Tac (+) cells **Jimmunol** 126,1393-7.
29. Reiter Y, Kreitman RJ₅ Brinkmann U, Pastan I. (1994) Cytotoxic and antitumor activity of a recombinant immunotoxin composed of disulfide-stabilized anti-Tac Fv fragment and truncated Pseudomonas exotoxin. **Int J Cancer.** 58,142-9.
- 65

30. Reiter Y, Brinkmann U, Lee B, Pastan I. (1996) Engineering antibody Fv fragments for cancer detection and therapy: disulfide-stabilized Fv fragments. *NatBiotechnol* 14,1239-45.
31. Reiter Y, Brinkmann U, Jung SH, Lee B, Kasprzyk PG, King CR, Pastan I. (1994) Improved binding and antitumor activity of a recombinant anti-erbB2 immunotoxin by disulfide stabilization of the Fv fragment. *JBiol Chem.* 269,18327-31.
- 5 32. Bakker, A.B. *et al.* (1994) Melanocyte lineage-specific antigen gp100 is recognized by melanoma- derived tumor-infiltrating lymphocytes. *J Exp. Med.* 179, 1005-1009.
33. Kawakami Y. *et al.* (1995) Recognition of multiple epitopes in the human melanoma antigen gp100 by tumor-infiltrating T lymphocytes associated with in vivo tumor regression. *J Immunol.* 154, 3961-3968
- 10 34. Cox AJL *et al.* (1994) Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines. *Science* 264, 716-719
35. Kreitman RJ, Bailón P, Chaudhary VK, Fitzgerald DJ, Pastan I. (1994) Recombinant immunotoxins containing anti-Tac(Fv) and derivatives of *Pseudomonas* exotoxin produce complete regression in mice of an interleukin-2 receptor-expressing human carcinoma. *Blood* 83,426-34.
- 15 36. Kirkin AJF. *et al.* (1995) Generation of human-melanoma- specific T lymphocyte clones defining novel cytolytic targets with panels of newly established melanoma cell lines. *Cancer Immunol. Immunother.* 41, 71-81
37. Pastan, I. (1997) Targeted therapy of cancer with recombinant immunotoxins. *Biochim Biophys Acta.* 1333,C1-6
38. Lode, H.N., Sc Reisfeld, R.A. (2000) Targeted cytokines for cancer immunotherapy. *Immunol Res.* 21,279-88
39. Withoff, S., Helfrich, W., de Leij, LF., Molema, G. (2001) Bispecific antibody therapy for the treatment of cancer. *Curr Opin Mol Ther.* 3,53-62
- 20 40. Jain RK. (1999) Transport of molecules, particles, and cells in solid *tmnoxsAnnu Rev BiomedEng.* 1,241-63.
41. Robert B, Guillaume P, Luescher I, Romero P, Mach JP. (2000) Antibody-conjugated MHC class I tetramers can target tumor cells for specific lysis by T lymphocytes-L¹Mr *J Immunol.* 30,3165-70.
42. Lanzavecchia, A., G. Lezzi, and A. Viola. (1999) From TCR engagement to T cell activation: a kinetic view of T cell behaviour. *Cell* 96,1-4
- 25 43. Bromley SK, *et al* (2001) The immunological synapse. *Ann Rev. Immunol.* 19, 375-396.
44. Wang, B., R. Maile, R. Greenwood, E. J. Collins, and J. A. Frelinger. (2000) Naive CD8+ T cells do not require costimulation for proliferation and differentiation into cytotoxic effector cells. *J Immunol.* 164,1216-1222.
45. Tussey L, Speller S, Gallimore A, Vessey R. (2000) Functionally distinct CD 8+ memory T cell subsets in persistent EBV infection are differentiated by migratory receptor expression. *Eur J Immunol.* 30,1823-9.
- 30 46. Lechner F, Cuero AL, Kantzanou M, Klenerman P. (2001) Studies of human antiviral CD 8+ lymphocytes using class I peptide tetramers. *Rev Med Virol.* 11,11-22.
47. Mottez, E., P. Langlade-Demoyen, H. Goumier, F. Martinon, J. Maryanski, P. Kourilsky, and J. P. Abastado. (1995) Cells expressing a major histocompatibility complex class I molecule with a single covalently bound peptide are highly immunogenic. *J. Exp. Med.* 181,493-7
- 35 48. White, J., Crawford, F., Fremont, D., Marrack, P., and Kappler, J. (1999) Soluble class I MHC with α -2 microglobulin covalently linked peptides: specific binding to a T-cell hybridoma. *J. Immunol.* 162,2671-8
49. Brinkmann U, Pai LH, Fitzgerald DJ, Willingham M, Pastan I. (1991) B3(Fv)-PE38KDEL, a single-chain immunotoxin that causes complete regression of a human carcinoma in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88,8616-20.
- 40 50. Kreitman RJ. Chimeric fusion proteins—*Pseudomonas* exotoxin- based (2001). *Curr Opin InvestigDrugs.*, 2,1282-93.
51. Pastan I, Kreitman RJ. (1998) Immunotoxins for targeted cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* 31,53-88.
52. Frankel AE, Kreitman RJ, Sausville EA. (2000) Targeted toxins. *Clin Cancer Res.* 6,326-34.
53. Kreitman RJ, Bailón P, Chaudhary VK, Fitzgerald DJ, Pastan I. (1994) Recombinant immunotoxins containing anti-Tac(Fv) and derivatives of *Pseudomonas* exotoxin produce complete regression in mice of an interleukin-2 receptor-expressing human carcinoma. *Blood* 83,426-34.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 50 <110> Reiter, Yoram Avital, Lev
- <120> MÉTODOS Y COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS PARA EL ENGAÑO INMUNITARIO, PARTICULARMENTE ÚTILES EN EL TRATAMIENTO DE CÁNCER
- 55 <130> 01/23769
- <160> 17
- 60 <170> PatentIn versión 3.1
- <210> 1
- <211> 1170
- <212> ADN
- 65 <213> Secuencia artificial

ES 2 652 017 T3

<220>

<223> Secuencia de ácidos nucleicos de la construcción SCHLA-A2

<400> 1

5

```

atgatccagc gtactccaaa gattcaggtt tactcacgtc atccagcaga gaatggaaaag      60
tcaaatattcc tgaattgcta tgtgtctggg ttcatccat ccgacattga agttgactta      120
ctgaagaatg gagagagaat tgaaaagtg gagcattcag acttgtcttt cagcaaggac      180
tggtctttct atctcttgta ttatactgag ttcaccccca ctgaaaaaga tgagtatgcc      240
tgccgtgtga accacgtgac tttgtcacag cccaagatag ttaagtggga tcgagacatg      300
ggtggcgggtg gaagcggcgg tggaggctct ggtggagggtg gcagcggctc tcaactccatg      360
aggtattttct tcacatccgt gtcccggtcc ggccgcggtg agcccgctt catcgcatg      420
ggctacgtgg acgacacgca gttcgtgcgg ttcgacagcg acgcgcgag ccagaggatg      480
gagccgcggg cgccgtggat agagcaggag ggtccggagt attgggacgg ggagacacgg      540
aaagtgaagg ccactcaca gactcaccga gtggacctgg ggacctgcg cggctactac      600
aaccagagcg aggcgggttc tcacaccgtc cagaggatgt atggctgcga cgtggggtcg      660
gactggcgct tcctccggtg gtaccaccag tacgctacg acggcaagga ttacatcgcc      720
ctgaaagagg acctgcgctc ttggaccgcg gcggacatgg cagctcagac caccaagcac      780
aagtgggagg cggcccatgt ggcggagcag ttgagagcct acctggaggg cacgtgcgtg      840
gagtggctcc gcagatacct ggagaacggg aaggagacgc tgcagcgcac ggacgcccc      900
aaaaacgcaca tgactcacca cgctgtctct gaccatgaag ccacctgag gtgctgggcc      960
ctgagcttct acctgcgga gatcacactg acctggcagc gggatgggga ggaccagacc      1020
caggacacgg agctcgtgga gaccaggcct gcaggggatg gaaccttcca gaagtgggag      1080
gctgtggtgg tgccttctgg acaggagcag agatacacct gccatgtgca gcatgagggt      1140

ttgcccgaagc ccctcaccct gagatgggag      1170

```

<210> 2

<211> 389

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Secuencia de productos de aminoácido de SCHLA-A2

15

<400> 2

ES 2 652 017 T3

Met Ile Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln Val Tyr Ser Arg His Pro Ala
1 5 10 15

Glu Asn Gly Lys Ser Asn Phe Leu Asn Cys Tyr Val Ser Gly Phe His
20 25 30

Pro Ser Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu Lys Asn Gly Glu Arg Ile Glu
35 40 45

Lys Val Glu His Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys Asp Trp Ser Phe Tyr
50 55 60

Leu Leu Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro Thr Glu Lys Asp Glu Tyr Ala
65 70 75 80

Cys Arg Val Asn His Val Thr Leu Ser Gln Pro Lys Ile Val Lys Trp
85 90 95

Asp Arg Asp Met Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Phe Thr Ser Val Ser
115 120 125

Arg Pro Gly Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Val Gly Tyr Val Asp
130 135 140

Asp Thr Gln Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Ala Ser Gln Arg Met
145 150 155 160

Glu Pro Arg Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Asp
165 170 175

Gly Glu Thr Arg Lys Val Lys Ala His Ser Gln Thr His Arg Val Asp
180 185 190

Leu Gly Thr Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Gly Ser His
195 200 205

Thr Val Gln Arg Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly Ser Asp Trp Arg Phe

ES 2 652 017 T3

210	215	220
Leu Arg Gly Tyr His Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Ala 225 230 235 240		
Leu Lys Glu Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Met Ala Ala Gln 245 250 255		
Thr Thr Lys His Lys Trp Glu Ala Ala His Val Ala Glu Gln Leu Arg 260 265 270		
Ala Tyr Leu Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg Tyr Leu Glu 275 280 285		
Asn Gly Lys Glu Thr Leu Gln Arg Thr Asp Ala Pro Lys Thr His Met 290 295 300		
Thr His His Ala Val Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg Trp Ala Leu 305 310 315 320		
Ser Phe Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu 325 330 335		
Asp Gln Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp 340 345 350		
Gly Thr Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Gln Glu 355 360 365		
Gln Arg Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Lys Pro Leu 370 375 380		
Thr Leu Arg Trp Glu 385		

<210> 3
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción 'monocatenaria', conector de aminoácido

<400> 3

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

<210> 4
 <211> 1530
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de ácidos nucleicos de la construcción B2M-aTacVL

<400> 4

ES 2 652 017 T3

```

atgatccagc gtactccaaa gattcaggtt tactcacgtc atccagcaga gaatggaaag      60
tcaaattttcc tgaattgcta tgtgtcttggg ttccatccat ccgacattga agttgactta      120
ctgaagaatg gagagagaat tgaaaaagtg gagcattcag acttgtcttt cagcaaggac      180
tggctctttct atctcttcta ttatactgag ttcccccca ctgaaaaaga tgagtatgcc      240
tgccgtgtga accacgtgac tttgtcacag cccaagatag ttaagtggga tcgagacatg      300
ggtggcgggtg gaagcggcgg tggaggctct ggtggagggtg gcagcggctc tcaactccatg      360
aggtattttct tcacatccgt gtcccgccc gcccgcgggg agccccgctt catcgcagtg      420
ggctacgttg acgacacgca gttcgtgcgg ttccagacgc acgcccgcag ccagaggatg      480
gagccgcggg cgcctggat agagcaggag ggtccggagt attgggacgg ggagacacgg      540
aaagtgaagg cccactcaca gactcaccga gtggacctg ggacctgcg cggctactac      600
aaccagagcg aggcgggttc tcacaccgtc cagaggatgt atggctgcga cgtggggtcg      660
gactggcgct tctccgcgg gtaccaccag tacgcctacg acggcaagga ttacatcgcc      720
ctgaaagagg acctgcgctc ttggaccgcg gcggacatgg cagctcagac caccaagcac      780
aagtgggagg cggcccatgt ggcggagcag ttgagagcct acctggaggg cacgtgcgtg      840
gagtggctcc gcagatacct ggagaacggg aaggagacgc tgcagcgcac ggacgcccc      900
aaaaacgcaca tgactcacca cgctgtctct gacctgaag ccacctgag' gtgctgggccc      960
ctgagcttct acctgcgga gatcacactg acctggcagc gggatgggga ggaccagacc      1020
caggacacgg agctcgtgga gaccaggcct gcaggggatg gaacctcca gaagtgggcg      1080
gctgtggttg tgcttcttg acaggagcag agatacaoct gccatgtgca gcatgagggt      1140
ttgcccagc cctcaccct gagatgggag ggcggaggag ggtccggttg cggaggttca      1200
ggaggcgggtg gatcgcaaat tgtcttcacc cagtctccag caatcatgtc tgcatctcca      1260
ggggagaagg tcaccataac ctgcagtgc agctcaagta taagttacat gactgggttc      1320
cagcagaagc caggcacttc .tccaaaactc tggatttata ccacatcaa cctggcttct      1380
ggagtccctg ctgccttcag tggcagtgga tctgggacct cttactctct cacaatcagc      1440
cgaatggagg ctgaagatgc tgccacttat tactgccatc aaaggagtac ttaccactc      1500
acgttcggtt gtggtaccaa gctggagctc      1530

```

<210> 5
 <211> 510
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de productos de aminoácido de la construcción B2M-aTacVL

<400> 5

ES 2 652 017 T3

```

Met Ile Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln Val Tyr Ser Arg His Pro Ala
1           5           10           15

Glu Asn Gly Lys Ser Asn Phe Leu Asn Cys Tyr Val Ser Gly Phe His
           20           25           30

Pro Ser Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu Lys Asn Gly Glu Arg Ile Glu
           35           40           45

Lys Val Glu His Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys Asp Trp Ser Phe Tyr
           50           55           60

Leu Leu Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro Thr Glu Lys Asp Glu Tyr Ala
65           70           75           80

Cys Arg Val Asn His Val Thr Leu Ser Gln Pro Lys Ile Val Lys Trp
           85           90           95

Asp Arg Asp Met Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
           100           105           110

Gly Gly Ser Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Phe Thr Ser Val Ser
           115           120           125

Arg Pro Gly Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Val Gly Tyr Val Asp
           130           135           140

Asp Thr Gln Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Ala Ser Gln Arg Met
145           150           155           160

Glu Pro Arg Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Asp
           165           170           175

Gly Glu Thr Arg Lys Val Lys Ala His Ser Gln Thr His Arg Val Asp
           180           185           190

Leu Gly Thr Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Gly Ser His
           195           200           205

Thr Val Gln Arg Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly Ser Asp Trp Arg Phe
           210           215           220

Leu Arg Gly Tyr His Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Ala
225           230           235           240

Leu Lys Glu Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Met Ala Ala Gln
           245           250           255

Thr Thr Lys His Lys Trp Glu Ala Ala His Val Ala Glu Gln Leu Arg
           260           265           270

Ala Tyr Leu Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg Tyr Leu Glu
           275           280           285

Asn Gly Lys Glu Thr Leu Gln Arg Thr Asp Ala Pro Lys Thr His Met
           290           295           300

```


ES 2 652 017 T3

Thr His His Ala Val Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala
305 310 315 320

Leu Ser Phe Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly
325 330 335

Glu Asp Gln Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly
340 345 350

Asp Gly Thr Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Gln
355 360 365

Glu Gln Arg Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Lys Pro
370 375 380

Leu Thr Leu Arg Trp Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
385 390 395 400

Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met
405 410 415

Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser
420 425 430

Ser Ile Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro
435 440 445

Lys Leu Trp Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala
450 455 460

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser
465 470 475 480

Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Arg Ser
485 490 495

Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Leu
500 505 510

<210> 6

<211> 348

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia de aTacVH - una parte de la secuencia de la construcción B2M-aTac(dsFv)

<400> 6

cagggtccatc tgcagcagtc tggggctgaa ctggcaaaac ctggggcctc agtgaagatg 60

tcttgcaagg cttctggcta cacctttact agctacagga tgcactgggt aaaacagagg 120

cctggacagg gtctggaatg gattggatat attaatccta qcactgggta tactgaatac 180

aatcagaagt tcaaggacaa ggccacattg actgcagaca aatcctccag cacagcctac 240

atgcaactga gcagcctgac atttgaggac tctgcagtct attactgtgc aagagggggg 300

ggggtctttg actactgggg ccaaggaacc actctcacag tctctctca 348

15

<210> 7

<211> 116
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos de aTacVH - una parte de la proteína codificada por B2M-aTac(dsFv)
<400> 7

```

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

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

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Thr Gly Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe
50           55           60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65           70           75           80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Phe Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
          85           90           95

Ala Arg Gly Gly Gly Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
          100          105          110

Thr Val Ser Ser
          115

```

10 <210> 8
<211> 9
<212> PRT
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético restringido al HLA-A2, derivado del antígeno de diferenciación de melanoma gp100

20 <400> 8

```

Ile Met Asp Gln Val Pro Phe Ser Val
1           5

```

25 <210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Péptido sintético restringido al HLA-A2, derivado del antígeno de diferenciación de melanoma gp100
<400> 9

```

Tyr Leu Glu Pro Gly Pro Val Thr Val
1           5

```

35 <210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético derivado del virus HTLV-1

<400> 10
 Leu Leu Phe Gly Tyr Pro Val Tyr Val
 1 5

5
 <210> 11
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

15
 <400> 11
 ggaagcgttg gcgcatatga tccagcgtag tcc 33

20
 <210> 12
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25
 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

30
 <400> 12
 tctgaacct ccgccaccgg accctctcc gccctccat ctcagggt 48

35
 <210> 13
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40
 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

45
 <400> 13
 tccggtggcg gaggttcagg aggcgggtga tcgcaaattg ttctacc 48

50
 <210> 14
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55
 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

60
 <400> 14
 gcagtaagga atcattaga gctccagctt ggt 33

50
 <210> 15
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55
 <220>
 <223> Oligonucleótido, que codifica el conector de la construcción monocatenaria

60
 <400> 15
 ggcggaggag ggtccggtgg cggaggttca ggaggcgggtg gatcg 45

60
 <210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 652 017 T3

$\langle 220 \rangle$

<223> Péptido restringido al MHC derivado del virus de la gripe

<400> 16

5

Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu

1

5

<210> 17

10

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> Péptido restringido al MHC derivado del virus de la hepatitis B

<400> 17

Ser Thr Asn Arg Gln Ser Gly Arg Gln

1

5

20

REIVINDICACIONES

1. Una molécula que comprende:

5 (i) un péptido restringido al MHC humano capaz de provocar una respuesta de memoria cuando está presente en la molécula, (ii) un primer conector peptídico, (iii) una β -2-microglobulina humana, (iv) un segundo conector peptídico, (v) una cadena de HLA-A2 de una molécula de la clase I del MHC humano, y (vi) un dominio de direccionamiento de anticuerpo específico de tumor,

10 en la que los segmentos (v) y (vi) están unidos entre sí directamente por un enlace peptídico o por un tercer conector peptídico y en la que el extremo carboxilo de cada uno de los segmentos (i) a (v) está unido al extremo amino de los segmentos (ii) a (vi), respectivamente.

15 2. La molécula de la reivindicación 1, en la que el dominio de direccionamiento de anticuerpo del segmento (vi) comprende un fragmento de anticuerpo funcional.

3. La molécula de la reivindicación 2, en la que el fragmento de anticuerpo funcional comprende una asociación de una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera.

20 4. La molécula de la reivindicación 3, en la que la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera están unidas entre sí por enlaces disulfuro intermoleculares.

25 5. La molécula de la reivindicación 3, en la que la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera están unidas entre sí por un cuarto conector peptídico.

6. La molécula de cualquiera de las reivindicaciones 3-5, en la que el segmento (v) se une o bien directamente por un enlace peptídico o bien por un tercer conector peptídico a la región variable de la cadena ligera del segmento (vi).

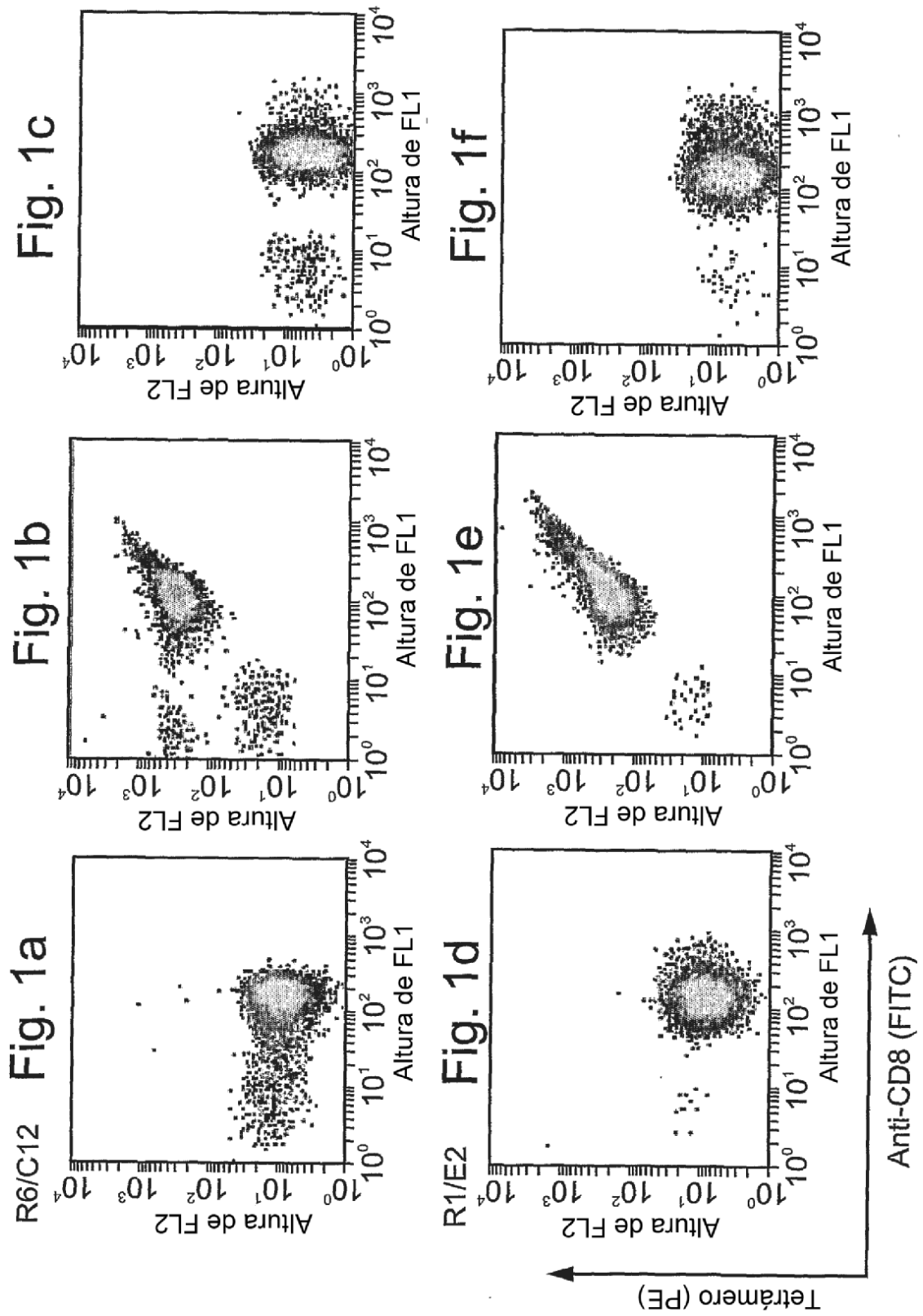
30 7. La molécula de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que dicha molécula está unida a un antígeno asociado a tumor o específico de tumor.

8. La molécula de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que el segmento (i) está complejoado con el segmento (v).

35 9. La molécula de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que el segmento (i) es un péptido derivado de un antígeno asociado a tumor o específico de tumor.

40 10. La molécula de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que el péptido restringido al MHC humano del segmento (i) deriva de una proteína viral.

11. La molécula de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en la que la proteína viral es CMV.



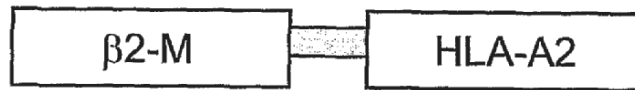


Fig. 1g

Secuencia de ácidos nucleicos de SchLA-A2 (SEQ ID NO: 1)

ATGATCCAGCGTACTCCAAAGATTGAGGTTTACTCACGTCATCCAGCAGAGAATGGAAAGTCAAATTTCTGAATTGCTATGTGTCTGGGTTTCATCCATCCGACATTGAAGTTGACTTACTGAAGAATGGAGAGAGATTGAAAAAGTGGAGCATTCAGACTTGTCTTTCAGCAAGGACTGGTCTTTCTATCTCTTGTATTATACTGAgTTCACCCCACTGAAAAAGATGAGTATGCCGTGCCGTGTGAACCACGTGACTTTGTACAGCCCAAGATAGTTAAGTGGGATCGAGACATGggtggcggtggaagcggcggtggaggtctctggtggaggtggcagcGGCTCTCACTCCATGAGGTATTTCTTCACATCCGTGTCCCGGCCCGGCCGCGGGGAGCCCCGCTTCATCGCAGTGGGCTACGTGGACGACACGCAGTTCTGTGCGGTTTCGACAGCGACGCCGCGAGCCAGAGGATGGAGCCGCGGGCGCCGTGGATAGAGCAGGAGGGTCCGGAGTATTGGGACGGGGAGACACGAAAGTGAAGGCCCACTCACAGACTCACCGAGTGGACCTGGGGACCCGTGCGCGGCTACTACAACCAGAGCGAGGCCGGTTCTCACACCGTCCAGAGGATGTATGGCTGCGACGTGGGGTTCGGACTGGCGCTTCTCCGCGGGTACCACCAGTACGCCCTACGACGGCAAGGATTACATCGCCCTGAAAGAGGACCTGCGCTCTTGGACCGCGCGGACATGGCAGCTCAGACCACCAAGCACAAAGTGGGAGGCGGCCATGTGGCGGAGCAGTTGAGAGCCTACCTGGAGGGCACGTGCGTGGAGTGGCTCCGCAGATACCTGGAGAACGGGAAGGAGACGCTGCAGCGCACGGACGCCCAAAACGCACATGACTCACACGCTGTCTCTGACCATGAAGCCACCCTGAGGTGCTGGGCCCTGAGCTTCTACCCCTGCGGAGATCACACTGACCTGGCAGCGGGATGGGGAGGACCAGACCCAGGACACGGAGCTGTGGAGACCAGGCCTGCAGGGGATGGAACCTTCCAGAAAGTGGGCGGCTGTGGTGGTGCCTTCTGGACAGGAGCAGAGATACACCTGCCATGTGCAGCATGAGGGTTTGGCCAAAGCCCTCACCTGAGATGGGAG

Secuencia de aminoácidos de SchLA-A2 (SEQ ID NO: 2)

MIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEFTPTEKDEYACRVNHVTLSPKIVKWDRDMGGGSGGGGSGGGSGGSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRFI AVGYVDDTQFVRFDSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDGETRKVKAHSQTHRVDLGLTRGYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGS DWRFLRGYHQYAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQTTKHKWEAAHVAEQLRAYLE GTCVEWLRRYLENGKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRWALSFPYAEITLTWQRDGEDQTQDTELVE TRPAGDGTFOKWA AVVVP SGQEQR YTCHVQHEGLPKPLTLRWE

Fig. 1h

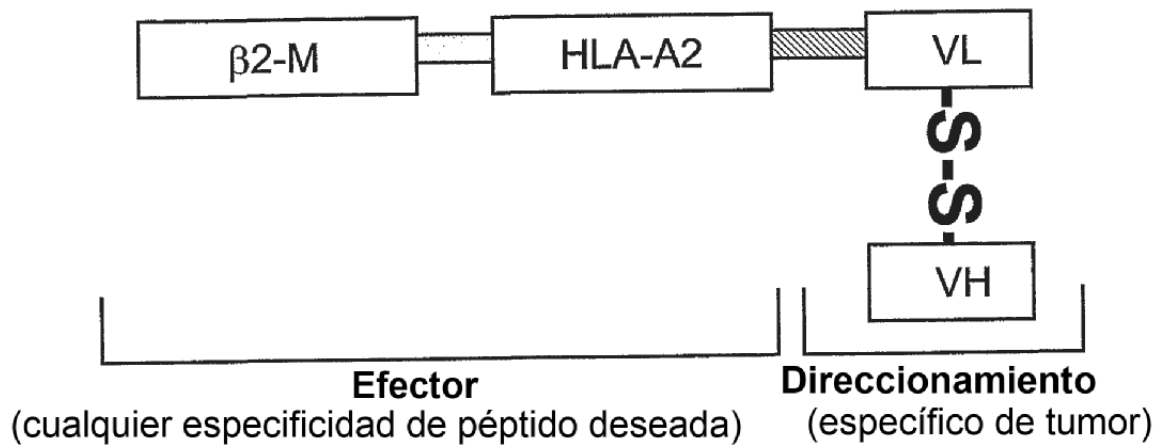


Fig. 2a

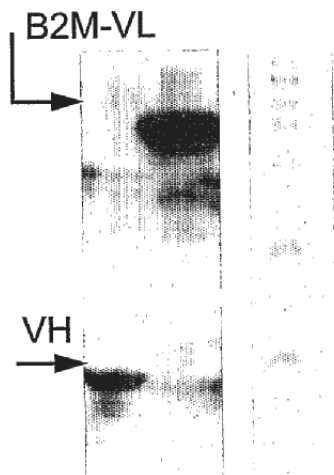


Fig. 2b

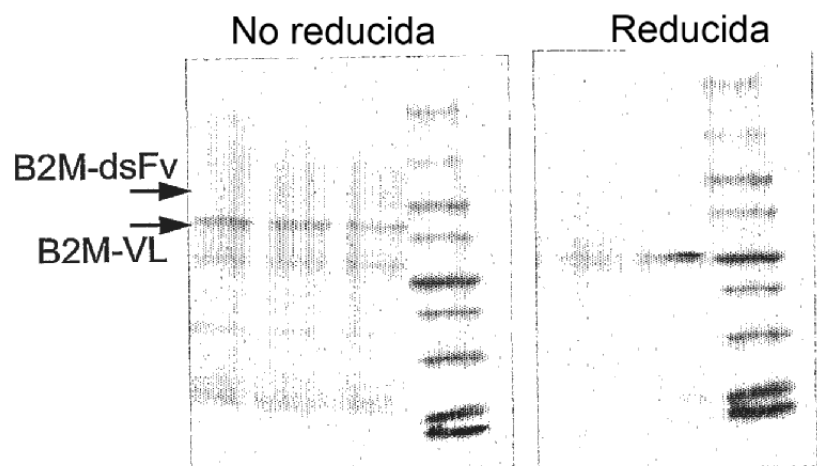


Fig. 2c

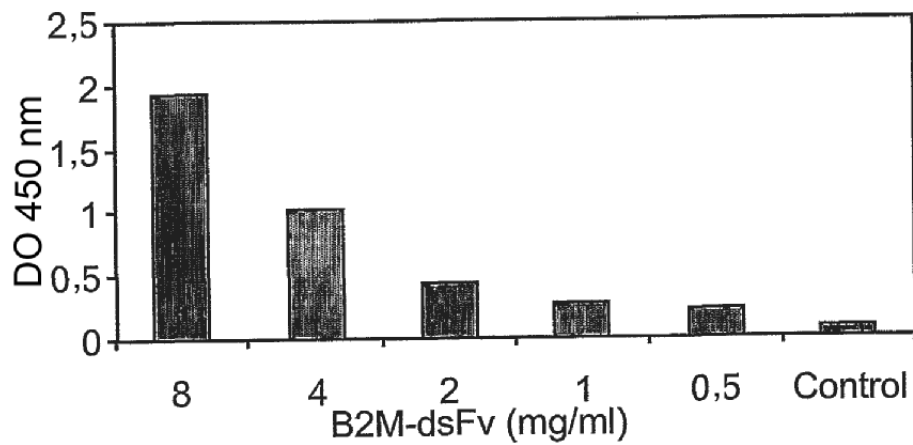


Fig. 2d

Secuencia de ácidos nucleicos de B2M-aTacVL (SEQ ID NO: 4)

ATGATCCAGCGTACTCCAAAGATTACAGTTTACTCACGTCATCCAGCAGAGAATGGAAAGTCAAATTTCT
CTGAATTGCTATGTGTCTGGGTTTCATCCATCCGACATTGAAGTTGACTTACTGAAGAATGGAGAGAGA
ATTGAAAAAGTGGAGCATTACAGACTTGTCTTTCAGCAAGGACTGGTCTTCTATCTCTTGTATTATACT
GAgTTCACCCCCACTGAAAAAGATGAGTATGCCTGCCGTGTGAACCACGTGACTTTGTACAGCCCAAG
ATAGTTAAGTGGGATCGAGACATGggtggcggtggaagcggcggtggaggctctggtggaggtggcagc
GGCTCTCACTCCATGAGGTATTTCTTCACATCCGTGTCCCGCCCCGGCCGCGGGGAGCCCCGCTTCATC
GCAGTGGGCTACGTGGACGACACGCAGTTCGTGCGGTTTCGACAGCGACGCCGCGAGCCAGAGGATGGAG
CCGCGGGCGCCGTGGATAGAGCAGGAGGGTCCGGAGTATTGGGACGGGGAGACACGGAAAGTGAAGGCC
CACTCACAGACTCACCGAGTGGACCTGGGGACCTGCGCGGCTACTACAACCAGAGCGAGGCCGGTTCT
CACACCGTCCAGAGGATGTATGGCTGCGACGTGGGGTGGGACTGGCGCTTCTCCGCGGGTACCACCAG
TACGCTACGACCGCAAGGATTACATCGCCCTGAAAGAGGACCTGCGCTCTTGGACCCGCGGACATG
GCAGCTCAGACCACCAAGCACAAGTGGGAGGCGGCCATGTGGCGGAGCAGTTGAGAGCCTACCTGGAG
GGCAGTGCCTGGAGTGGCTCCGCAGATACCTGGAGAACGGGAAGGAGACGCTGCAGCGCACGGACGCC
CCCAAAACGCacATGACTCACACGCTGTCTCTGACCATGAAGCCACCCTGAGGTGCTGGGCCCTGAGC
TTCTACCCTGCGGAGATCACACTGACCTGGCAGCGGGATGGGGAGGACCAGACCAGGACACGGAGCTC
GTGGAGACCAGGCCTGCAGGGGATGGAACCTTCCAGAAGTGGGCGGCTGTGGTGGTGCCTTCTGGACAG
GAGCAGAGATACCTGCCATGTGCAGCATGAGGGTTTGGCCAAAGCCCCCTCACCTGAGATGGGAGggc
ggaggagggtccggtggcgagggttcaggaggcggtggatcgCAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCA
ATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTACCATAACCTGCAGTGCAGCTCAAGTATAAGTTACATG
CACTGGTTCCAGCAGAAGCCAGGCACCTTCTCCAAACTCTGGATTTATACCACATCCAACCTGGCTTCT
GGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCCGAATGGAG
GCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCATCAAAGGAGTACTTACCCACTCACGTTCCGTTgTGGtACC
AAGCTGGAGCTC

Secuencia de aminoácidos de B2M-aTacVL (SEQ ID NO: 5)

MIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSEFYLLYYT
EFTPTTEKDEYACRVNHVTLSPKIVKWDMDGGGGSGGGSGGGSGSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRFI
AVGYVDDTQFVRFDSDAASQRMPEPRAPWIEQEGPEYWDGETRKVKAHSQTHRVDLGLTRGYNQSEAGS
HTVQRMYGCDVGSWRFLRGYHQYAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQTTKHKWEAAHVAEQLRAYLE
GTCVEWLLRRYLENGKETLQRTDAPKTHMTHHAVSPHEATLRWALSFPYPAEITLTWQRDGEDQTQDTEL
VETRPAGDGTGQKWAAVVPSGQEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWEGGGSGGGGSQIVLTQSPA
IMSASPGKVTITCSASSSISYMHWFQKPGTSPKLWIYTTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRME
AEDAATYYCHQRSTYPLTFGCGTKLEL

Fig. 2e

Secuencia de ácidos nucleicos de aTacVH (SEQ ID NO: 6)

CAGGTCCAAtCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAAGTGGCAAAACCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAG
GCTTCTGGCTACACCTTTACTAGCTACAGGATGCAGTGGGTAAAACAGAGGCCTGGACAGGGTCTGGAA
TGGATTGGATATATTAATCCTAGCACTGGGTATACTGAATACAATCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACA
TTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTGAGCAGCCTGACATTTGAGGACTCTGCA
GTCTATTACTGTGCAAGAGGGGGGGGGTCTTTGACTACTGGGGCCAAGGAACCACTCTCACAGTCTCC
TCA

Secuencia de aminoácidos de aTacVH (SEQ ID NO: 7)

QVHLQQSGAELAKPGASVKMSCKASGYTFTSYRMHWVKQRPQGGLWIGYINPSTGYTEYNQKFKDKAT
LTADKSSSTAYMQLSSLTFEDSAVYYCARGGGVFDYWGGQTTTLTVSS

Fig. 2f

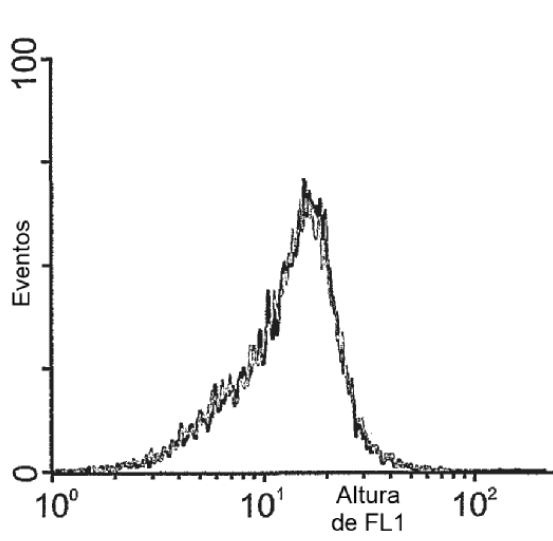


Fig. 3a

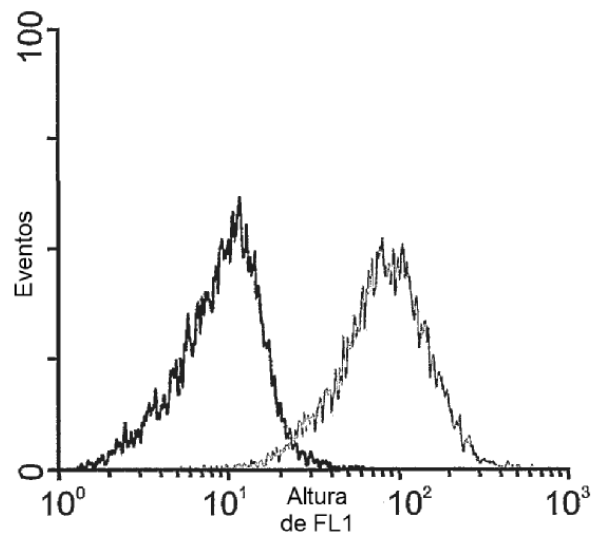


Fig. 3b

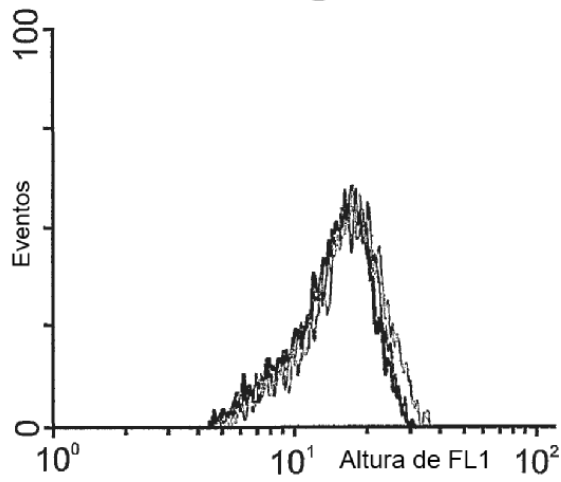


Fig. 3c

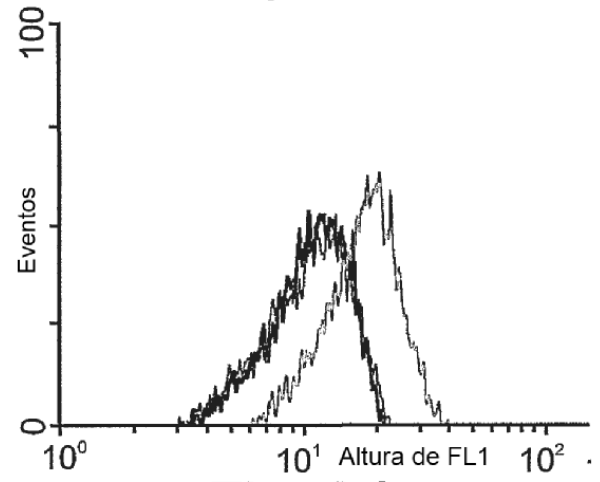


Fig. 3d

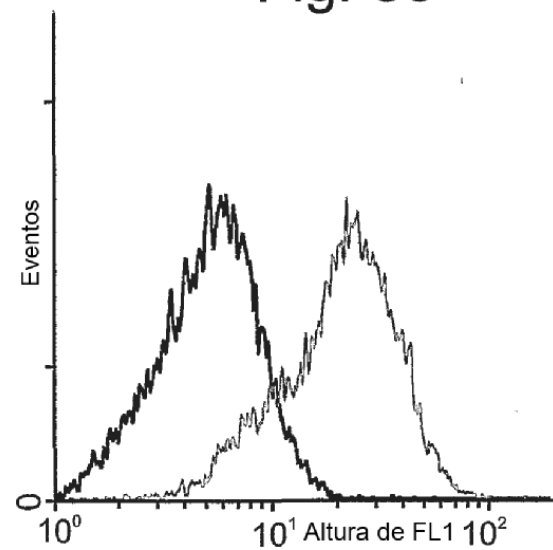


Fig. 3e

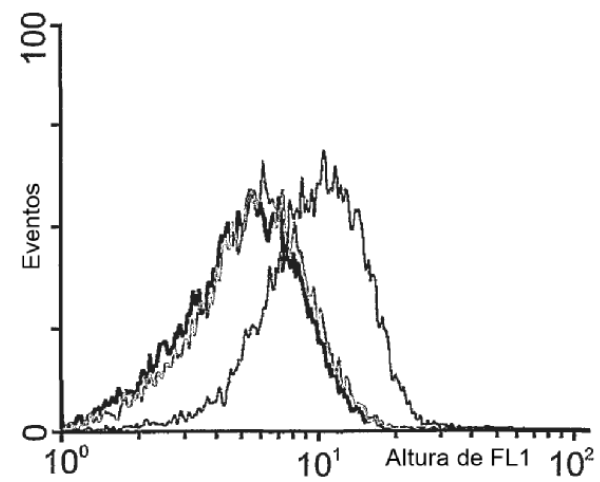


Fig. 3f

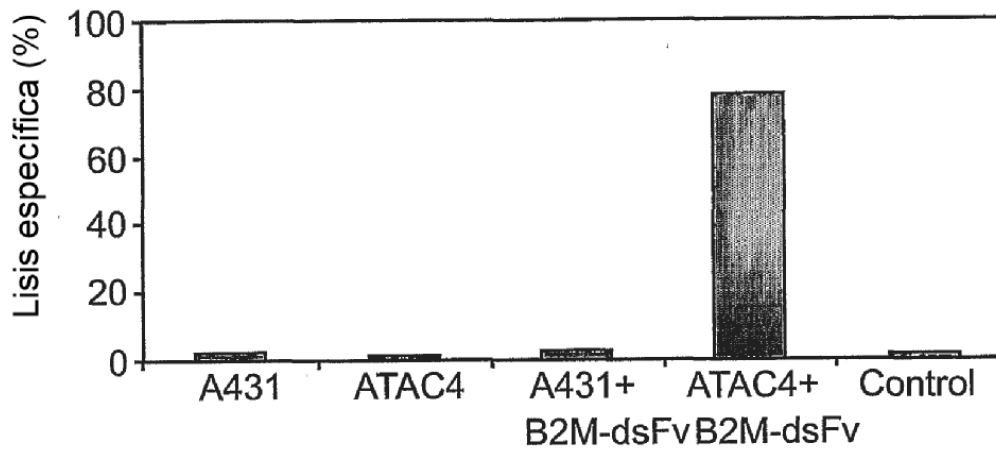


Fig. 4a

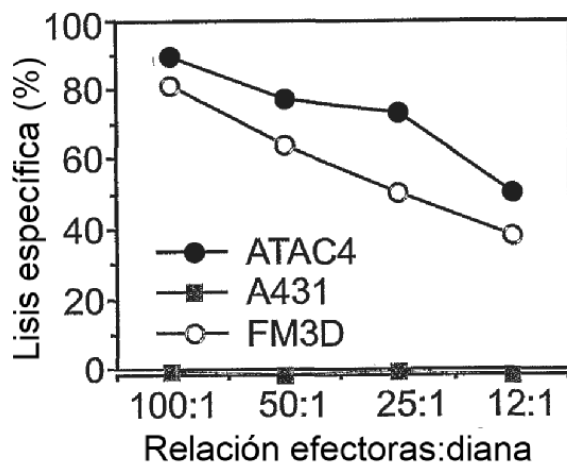


Fig. 4b

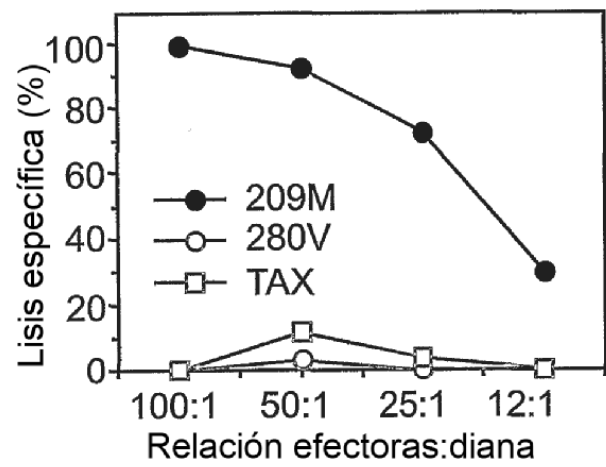


Fig. 4c

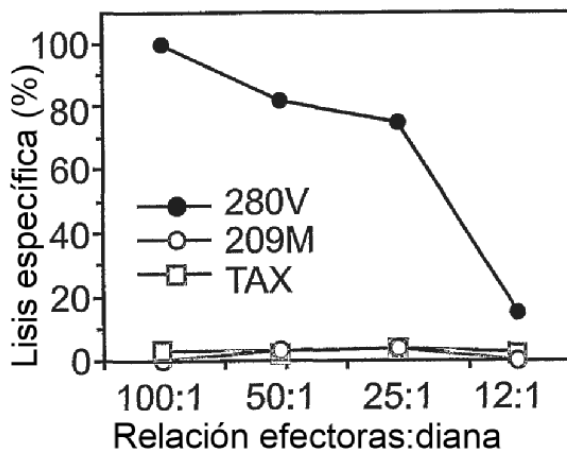


Fig. 4d

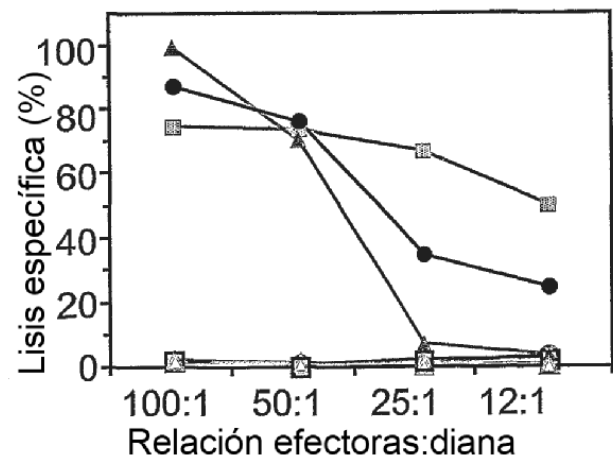


Fig. 4e

● R6C12 con □ R1E2 con ▲ CR11-2 con
 ○ R6C12 sin □ R1E2 sin △ CR11-2 sin

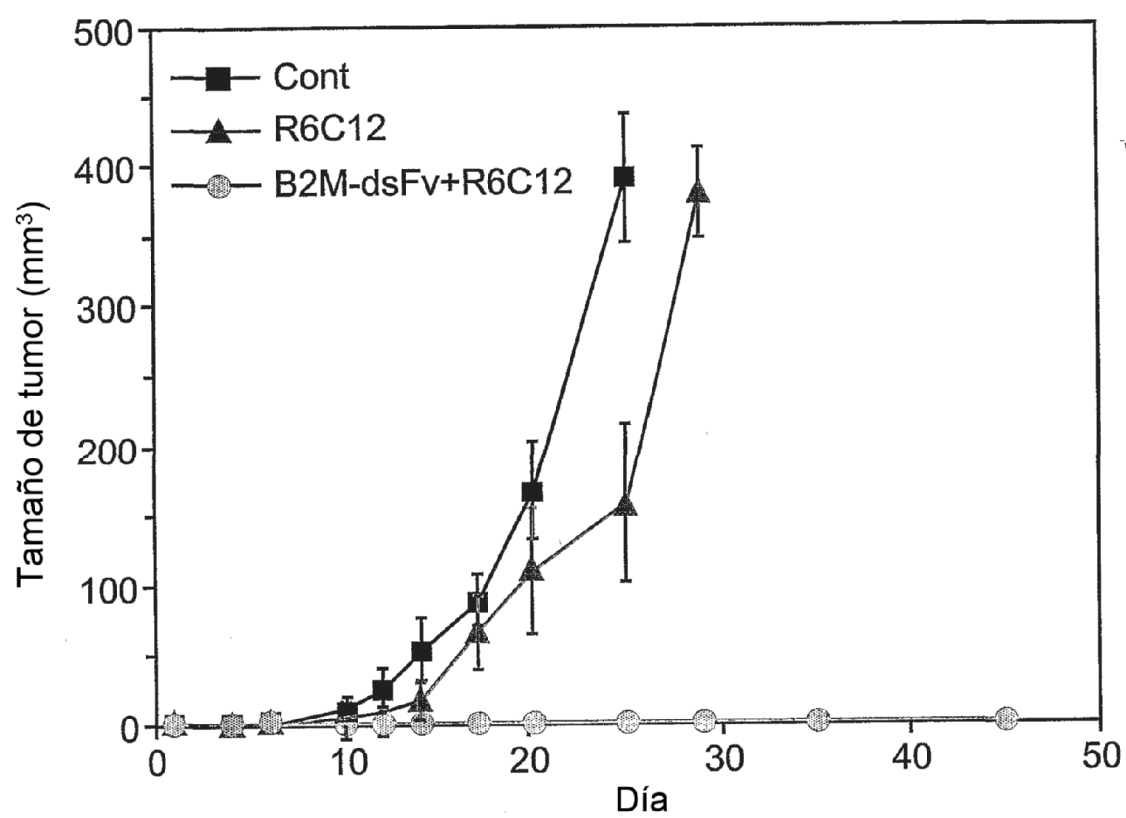


Fig. 5

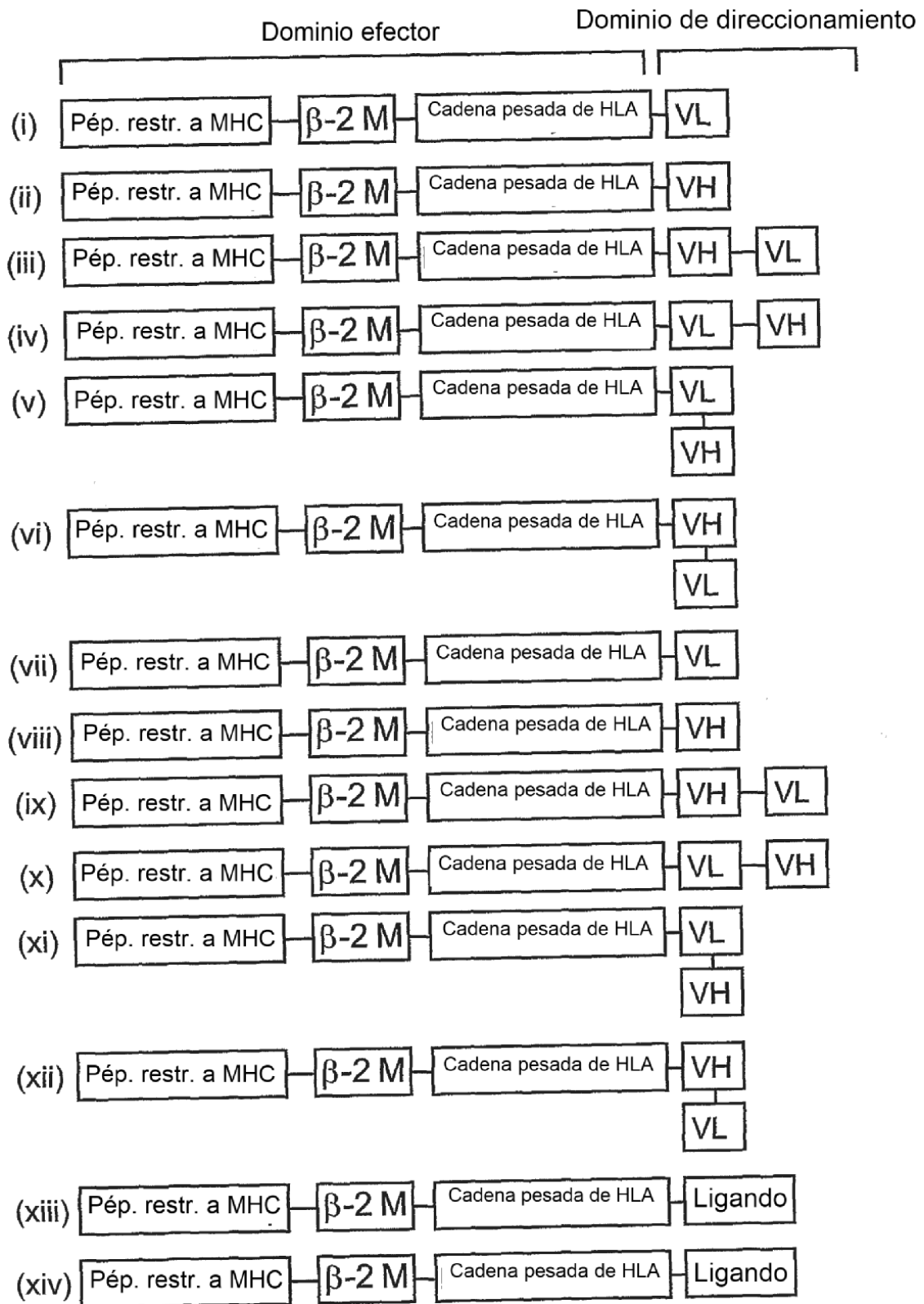


Fig. 6