

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 667 864**

51 Int. Cl.:

C07K 14/74 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

C07K 14/005 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C12P 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.06.2012** **PCT/EP2012/061734**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2012** **WO12175508**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.06.2012** **E 12728091 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2018** **EP 2723773**

54 Título: **Eliminación de células diana mediante linfocitos T citotóxicos específicos de virus en circulación usando complejos que comprenden MHC de clase I**

30 Prioridad:

22.06.2011 EP 11171027

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

14.05.2018

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

KNOETGEN, HENDRIK

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 667 864 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

Eliminación de células diana mediante linfocitos T citotóxicos específicos de virus en circulación usando complejos que comprenden MHC de clase I

En el presente documento se informa de un polipéptido de fusión que comprende un anticuerpo y un componente de MHC de clase I y de su uso para la eliminación de células tumorales mediante atracción dirigida de linfocitos T citotóxicos específicos de virus en circulación.

Antecedentes de la invención

La proteína MHC de clase I consiste en una cadena α (α -1 a 3 y un dominio transmembranario) y microglobulina β_2 . Es poligénica (locus de 3 genes para la proteína MHC de clase I en el genoma haploide) lo que da lugar a seis cadenas α de proteína MHC de clase I diferentes (en seres humanos dos HLA-A, dos HLA-B, dos HLA-C). El MHC es adicionalmente polimórfico. El alelo A*0201 de HLA-A humana es prevalente en aproximadamente un 30 % a un 50 % de la población de raza blanca (Player, *et al.*, J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol. 19 (1996) 357-363).

El citomegalovirus humano HCMV (= herpesvirus humano 5, HHV-5) es uno de los virus humanos más grandes. Su genoma comprende alrededor de 230.000 pb de ADN bicatenario lineal y codifica más de 160 proteínas (Davison, AJ, *et al.*, J. Gen. Virol. 84 (2003) 17-28).

El CMV ha evolucionado para convertirse en un parásito sublime del genoma humano y es un inmunógeno potente y desencadena respuestas inmunitarias fuertes de todas las ramas del sistema inmunitario. Este virus parece estar entre los antígenos más inmunodominantes conocidos por el sistema inmunitario humano y estimula las respuestas de los linfocitos T CD8⁺ de una magnitud sin precedentes.

La "latencia" del CMV depende de la supresión inmunitaria crónica de los virus CMV en lugar de un cambio en el patrón de transcripción vírico (Moss y Khan, Human Immunology 65 (2004) 456-464).

Las respuestas inmunitarias de los linfocitos T CD8⁺ no se dirigen de manera uniforme contra todas las proteínas del CMV, pero se centran en ellas. Las proteínas del CMV pp65 e IE-1 son las dianas predominantes (McLaughlin-Taylor, E., *et al.*, J. Med. Virol. 43 (1994) 103-110; Moss y Khan, Human Immunology 65 (2004) 456-464).

La frecuencia real de linfocitos T específicos de CMV es muy alta con frecuencias para péptidos individuales del orden de hasta un 1 a un 2 % del repertorio de linfocitos T CD8⁺ totales (Moss y Khan, Human Immunology *supra*; Wills, M.R., *et al.*, J. Virol. 70 (1996) 7569-7579).

La respuesta de los linfocitos T CD8⁺ específicos de CMV aumenta notablemente con la edad y los tetrámeros de HLA-péptidos individuales se tiñen con frecuencia en un exceso de un 10 % del conjunto de linfocitos T CD8⁺ totales (Khan, N., *et al.*, J. Immunol. 169 (2002) 1984-1992).

La respuesta de linfocitos T CD8⁺ totales en donantes sanos de edad avanzada podría constituir aproximadamente un 50 % del repertorio de linfocitos T CD8⁺.

Las enormes expansiones de linfocitos T CD8⁺ a menudo están muy restringidas a nivel clonal, y se estima que el CMV es la causa de al menos un 30 % de las expansiones de linfocitos T CD8⁺ clonales que se observan en la sangre periférica con el envejecimiento. El recuento de linfocitos T CD8⁺ totales es dos veces más alto en donantes seropositivos a CMV mayores de 60 años en comparación con una cohorte seronegativa a CMV (Looney, R.J., *et al.*, Clin. Immunol. 90 (1999) 213-219).

Se informa de una fusión de HLA soluble y microglobulina β_2 por Mottez *et al.* (Eur. J. Immunol. 21 (1991) 467-471); Godeau *et al.* (J. Biol. Chem. 267 (1992) 24223-24229) y Mage *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. 89 (1992) 10658-10662). Se informa de una fusión de péptido derivado vírico con HLA soluble y microglobulina β_2 por Mottez *et al.* (J. Exp. Med. 181 (1995) 493-502). Se informa de una fusión de una cadena pesada de inmunoglobulina con HLA soluble y microglobulina β_2 coexpresada por Dal Porto *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 6671-6675). Un complejo tetramérico de péptido-HLA soluble biotinilado y microglobulina β_2 con estreptavidina acoplada químicamente a un Fab se describe por Robert *et al.* (Eur. J. Immun. 30 (2000) 3165-3170). Se informa de un Fab acoplado químicamente con una fusión de péptido derivado vírico con HLA soluble y microglobulina β_2 por Robert *et al.* (Cancer Immunity 1 (2001) 2). Se informa de una fusión de un péptido derivado vírico con HLA soluble y microglobulina β_2 a una cadena pesada de anticuerpo monoclonal murino por Greten *et al.* (J. Immunol. Methods 271 (2002) 125-135). Se informa de una expresión de *E. coli* de fusiones de scFv sin péptido, replegamiento *in vitro* y carga de péptidos por Lev *et al.* (J. Immunol. 169 (2002) 2988-2996), Lev *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. 101 (2004) 9051-9056), y Novak *et al.* (Int. J. Cancer 120 (2006) 329-336). Se informa del uso de MHC soluble biotinilado cargado con péptidos y acoplado a anticuerpos Fab o scFv fusionados con estreptavidina por Mous *et al.* (Leukemia 20 (2006) 1096-1102).

En el documento WO 2005/099361 se informa de conjugados péptido-anticuerpo de MHC de clase I con microglobulina beta₂ modificada. Los conjugados ejemplares como se informa en el documento WO 2005/099361 se obtienen mediante conjugación *in vitro* de la cadena alfa del complejo MHC (HLA) o mediante la coexpresión a partir de genes separados en la misma célula.

En el documento US 2004/0091488 se informa de construcciones antigénicas de antígenos del complejo principal de histocompatibilidad de clase I con moléculas transportadoras específicas. En el presente documento se informa de polipéptidos de fusión que carecen de una región bisagra.

Sumario de la invención

En el presente documento se informa de un procedimiento para producir de manera recombinante un complejo que comprende como primera parte una parte derivada de anticuerpo que se une específicamente a un antígeno diana, y como segunda parte un péptido derivado de virus unido covalentemente a un complejo de proteína MHC de clase I así como al propio complejo.

Con el complejo como se informa en el presente documento, los linfocitos T citotóxicos en circulación específicos de virus existentes (linfocitos T de memoria y/o linfocitos T efector) de un individuo se pueden dirigir a células que expresan el antígeno diana, al cual se une específicamente la parte derivada de anticuerpo del complejo, revistiendo estas células con complejos de MHC de clase I que imitan una infección vírica aguda por el péptido derivado de virus unido al complejo de proteína MHC de clase I.

Un aspecto de la invención es un procedimiento para la producción recombinante de un complejo que comprende i) un polipéptido de fusión que comprende en dirección de extremo N a C un péptido que provoca respuesta de linfocitos T, (microglobulina β_2 y los dominios extracelulares α_1 , α_2 y α_3 de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de un 1 % o más; ii) un par de cadenas polipeptídicas unidas por disulfuro derivadas de una región bisagra de anticuerpo, y en las que cada cadena polipeptídica unida por disulfuro comprende un dominio CH2 y un dominio CH3 de origen humano, en las que un dominio CH3 comprende la mutación T366W y el otro dominio CH3 comprende las mutaciones T366S, L368A e Y407V (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat); y iii) al menos un par de un dominio variable de la cadena ligera de anticuerpo y un dominio variable de la cadena pesada de anticuerpo en una célula eucariota. El procedimiento comprende las siguientes etapas: (i) cultivar una célula eucariota que comprende uno o más ácidos nucleicos que codifican el complejo, y (ii) recuperar el complejo de la célula o del medio de cultivo. De acuerdo con la invención, el complejo comprende exactamente un polipéptido de fusión de un péptido que provoca respuesta de linfocitos T, microglobulina β_2 y los dominios extracelulares α_1 , α_2 y α_3 de una molécula de MHC de clase I. Dentro del complejo, el polipéptido de fusión (a) se une covalentemente ya sea al extremo C o al extremo N de una de las cadenas polipeptídicas unidas por disulfuro, o (b) se une covalentemente al extremo N de un dominio variable de anticuerpo que es el dominio variable de la cadena pesada o ligera complementario al comprendido en la primera cadena polipeptídica unida por disulfuro, o (c) se une covalentemente al extremo C de un dominio constante de anticuerpo que es el dominio constante de la cadena pesada o ligera complementario al comprendido en la primera cadena polipeptídica unida por disulfuro.

En un modo de realización, el complejo comprende exactamente un polipéptido derivado de MHC o exactamente un polipéptido de fusión que comprende una molécula derivada de MHC.

En un modo de realización, el complejo se obtiene con una concentración de 1 mg/ml o más en el medio de cultivo. En un modo de realización, el complejo se obtiene con una concentración de 4 mg/ml o más en el medio de cultivo.

En un modo de realización, la célula eucariota es una célula de mamífero. En un modo de realización, la célula de mamífero es una célula de riñón embrionario humana, o una célula de ovario de hámster chino, o una célula de riñón de cría de hámster, o una célula de mieloma de ratón.

En un modo de realización, los polipéptidos del par de la cadenas polipeptídicas unidas por disulfuro derivados de una región bisagra de anticuerpo i) se unen mediante uno o más enlaces disulfuro, ii) la primera cadena polipeptídica unida por disulfuro comprende en dirección de extremo N a C un dominio variable de la cadena ligera o pesada de inmunoglobulina, un dominio constante de la cadena ligera o pesada de inmunoglobulina, y un polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo, y la segunda cadena de polipéptido unida por disulfuro comprende un polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo.

En un modo de realización, el péptido que provoca respuesta de linfocitos T es un péptido derivado de virus.

En un modo de realización, el polipéptido de fusión comprende en dirección de extremo N a C

- (i) un péptido derivado de virus que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 01 a SEQ ID NO: 09,

- (ii) un primer péptido enlazador que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 16, 17, 18, 21, 22 y 23,
- (iii) una microglobulina β_2 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10,
- (iv) un segundo péptido enlazador que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 16, 17, 18, 21, 22 y 23,
- (v) los dominios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de una molécula de MHC de clase I que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, y
- (vi) un tercer péptido enlazador que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 12, 16, 17, 18, 21, 22 y 23.
- En un modo de realización, la primera cadena polipeptídica unida por disulfuro y la segunda cadena polipeptídica unida por disulfuro comprenden i) un dominio CH2 de IgG1 humana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 31, 32 y 33, y un dominio CH3 de IgG1 humana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 34, 35 y 36.
- En un modo de realización, el complejo comprende i) un primer péptido enlazador que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21, y/o ii) un segundo péptido enlazador que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22, y/o iii) un tercer péptido enlazador que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, y/o iv) un dominio CH2 de IgG1 humana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32 o 33, y/o v) en el primer polipéptido unido por disulfuro un dominio CH3 de IgG1 humana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 y en el segundo polipéptido unido por disulfuro un dominio CH3 de IgG1 humana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36.
- Un aspecto de la invención es un complejo, caracterizado por que comprende
- un polipéptido de fusión que comprende en dirección de extremo N a C
 - (i) un péptido que provoca respuesta de linfocitos T,
 - (ii) una microglobulina β_2 , y
 - (iii) los dominios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de un 1 % o más,
- y
- dos cadenas polipeptídicas, que se unen mediante uno o más enlaces disulfuro,
- en el que la primera cadena polipeptídica unida por disulfuro comprende en dirección de extremo N a C
- (i) un dominio variable de la cadena ligera o pesada de inmunoglobulina,
 - (ii) un dominio constante de la cadena ligera o pesada de inmunoglobulina, y
 - (iii) un polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo,
- y
- en el que la segunda cadena polipeptídica unida por disulfuro comprende un polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo, en el que la primera cadena polipeptídica unida por disulfuro y la segunda cadena polipeptídica unida por disulfuro comprenden ambas un dominio CH2 y un dominio CH3 de origen humano, en las que un dominio CH3 comprende la mutación T366W y el otro dominio CH3 comprende las mutaciones T366S, L368A e Y407V (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat);
- en el que el polipéptido de fusión
- se une covalentemente ya sea al extremo C o al extremo N de una de las cadenas polipeptídicas unidas por disulfuro, o
 - se une covalentemente al extremo N de un dominio variable de anticuerpo que es el dominio variable de la cadena pesada o ligera complementario al comprendido en la primera cadena polipeptídica unida por

disulfuro, o

- se une covalentemente al extremo C de un dominio constante de anticuerpo que es el dominio constante de la cadena pesada o ligera complementario al comprendido en la primera cadena polipeptídica unida por disulfuro

con la condición de que el complejo comprenda exactamente un polipéptido de fusión.

En un modo de realización de todos los aspectos, el complejo es un complejo de unión a antígeno.

En un modo de realización de todos los aspectos, el complejo es un complejo covalente.

En un modo de realización de todos los aspectos, la molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de un 1 % o más tiene una frecuencia relativa de un 10 % o más. En un modo de realización, la molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de un 10 % o más es HLA-A*0201, o HLA-A*1101, o HLA-A*2402, o HLA-A*340101, o HLA-C*0304, o HLA-C*0401, o HLA-C*0702.

En un modo de realización de todos los aspectos, la molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de un 10 % o más se selecciona dependiendo de la región del individuo a quien se le va a administrar el complejo de la siguiente manera:

- para un individuo de origen europeo, la molécula de MHC de clase I se selecciona del grupo que comprende HLA-A*0101, HLA-A*0201, HLA-A*0301, HLA-B*0702, HLA-B*0801, HLA-B*4402, HLA-C*0401, HLA-C*0501, HLA-C*0701 y HLA-C*0702,
- para un individuo de origen australiano, la molécula de MHC de clase I se selecciona del grupo que comprende HLA-A*0201, HLA-A*1101, HLA-A*2402, HLA-A*340101, HLA-B*1301, HLA-B*1521, HLA-B*5601, HLA-B*5602, HLA-C*0102, HLA-C*0401, HLA-C*0403 y HLA-C*502,
- para un individuo de origen norteamericano, la molécula de MHC de clase I se selecciona del grupo que comprende HLA-A*0201, HLA-A*2402, HLA-C*0202, HLA-C*0304, HLA-C*0401, y HLA-C*0702, y
- para un individuo de origen sudeste asiático, la molécula de MHC de clase I se selecciona del grupo que comprende HLA-A*1101, HLA-A*2402, HLA-B*1504, HLA-C*0102, HLA-C*0304, HLA-C*0702 y HLA-C*0801.

En un modo de realización de todos los aspectos, la molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de un 10 % o más se selecciona dependiendo de la región del individuo a quien se le va a administrar el complejo de la siguiente manera:

- para un individuo de origen europeo, la molécula de MHC de clase I es HLA-A*0201,
- para un individuo de origen australiano, la molécula de MHC de clase I se selecciona del grupo que comprende HLA-A*2402, HLA-B*1301, HLA-C*0102 y HLA-C*0401,
- para un individuo de origen norteamericano, la molécula de MHC de clase I se selecciona del grupo que comprende HLA-A*2402 y HLA-C*0304, y
- para un individuo de origen sudeste asiático, la molécula de MHC de clase I es HLA-A*2402.

En un modo de realización de todos los aspectos, el péptido que provoca respuesta de linfocitos T es un péptido que provoca respuesta de linfocitos T CD8⁺. En un modo de realización, el péptido que provoca respuesta de linfocitos T es un péptido derivado de virus.

En un modo de realización de todos los aspectos, el polipéptido de fusión comprende

- (i) un péptido derivado de virus,
- (ii) microglobulina β_2 , y
- (iii) el alelo de HLA-A soluble A*0201.

En un modo de realización de todos los aspectos, el virus se selecciona de adenovirus, herpesvirus humano 1, herpesvirus humano 2, herpesvirus humano 4 (virus de Epstein-Barr), virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, citomegalovirus humano, virus de la inmunodeficiencia humana, papilomavirus humano de tipo 16, papilomavirus humano de tipo 18, papilomavirus humano de tipo 31, papilomavirus humano de tipo 33, papilomavirus humano de

tipo 35, papilomavirus humano de tipo 39, papilomavirus humano de tipo 45, papilomavirus humano de tipo 51, papilomavirus humano de tipo 52, papilomavirus humano de tipo 56, papilomavirus humano de tipo 58, papilomavirus humano de tipo 59, papilomavirus humano de tipo 68, papilomavirus humano de tipo 73, papilomavirus humano de tipo 82, virus linfotrópico de linfocitos T humano de tipo I, virus de la gripe A humano, virus de la gripe B humano, virus de la variolovacuna, virus del dengue.

En un modo de realización de todos los aspectos, el péptido derivado de virus se selecciona de

NLVPMVATV (SEQ ID NO: 01), SLYNTVATL (SEQ ID NO: 02), GLCTLVAML (SEQ ID NO: 03), GILGFVFTL (SEQ ID NO: 04), STNRQSGRQ (SEQ ID NO: 05), LLFGYPVYV (SEQ ID NO: 06), FAEGFVRAL (SEQ ID NO: 07), LIVIGILIL (SEQ ID NO: 08), o ILHTPGCV (SEQ ID NO: 09), WYAQIQPHW (SEQ ID NO: 52), AFSGVSWTM (SEQ ID NO: 53), ILIGVVITW (SEQ ID NO: 54), MMIPTVVAF (SEQ ID NO: 55), PFPQSNAPI (SEQ ID NO: 56), LLLTLLATV (SEQ ID NO: 57), IVLEHGSCV (SEQ ID NO: 58), LLFKTENG (SEQ ID NO: 59), PLNEAIMAV (SEQ ID NO: 60), NLVRLQSGV (SEQ ID NO: 61), LVISGLFPV (SEQ ID NO: 62), LLLVAHYAI (SEQ ID NO: 63), LALLAAFVK (SEQ ID NO: 64), VILAGPMPV (SEQ ID NO: 65), HVLGRLITV (SEQ ID NO: 66), VTEHDTLLY (SEQ ID NO: 67), NTDFRVLEL (SEQ ID NO: 68), CVETMCNEY (SEQ ID NO: 69), VLEETSVML (SEQ ID NO: 70), NLVPMVATV (SEQ ID NO: 71), RIFAELEGV (SEQ ID NO: 72), IYTRNHEV (SEQ ID NO: 73), VLAELVKQI (SEQ ID NO: 74), AVGGAVASV (SEQ ID NO: 75), TVRSHCVSK (SEQ ID NO: 76), IMREFNSYK (SEQ ID NO: 77), GPISHGHVLK (SEQ ID NO: 78), ATVQGQNLK (SEQ ID NO: 79), VYALPLKML (SEQ ID NO: 80), AYAQKIFKIL (SEQ ID NO: 81), QYDPVAALF (SEQ ID NO: 82), YVKVYLESF (SEQ ID NO: 83), DIYRIFAEI (SEQ ID NO: 84), VFETSGGLVV (SEQ ID NO: 85), KARDHLAVL (SEQ ID NO: 86), QARLTVSGL (SEQ ID NO: 87), KARAKKDEL (SEQ ID NO: 88), QIKVRVDMV (SEQ ID NO: 89), RRRHRQDAL (SEQ ID NO: 90), ARVYEIKCR (SEQ ID NO: 91), KMQVIGDQY (SEQ ID NO: 92), NVRRSWEEL (SEQ ID NO: 93), CPSQEPMSIYVY (SEQ ID NO: 94), KPGKISHIMLDVA (SEQ ID NO: 95), ELRRKMMYM (SEQ ID NO: 96), IPSINVHHY (SEQ ID NO: 97), FEQPTETPP (SEQ ID NO: 98), YAYIYTTYL (SEQ ID NO: 99), QEFFWDANDIY (SEQ ID NO: 100), YEQHKITSY (SEQ ID NO: 101), QEPMSIYVY (SEQ ID NO: 102), SEHPTFTSQY (SEQ ID NO: 103), QAIRETVEL (SEQ ID NO: 104), TRATKMQVI (SEQ ID NO: 105), DALPGPCI (SEQ ID NO: 106), CEDVPSGKL (SEQ ID NO: 107), HERNGFTVL (SEQ ID NO: 108), PTFTSQYRIQGKL (SEQ ID NO: 109), QMWQARLTV (SEQ ID NO: 110), HELLVLVKKACL (SEQ ID NO: 111), o DDYSNTHSTRYV (SEQ ID NO: 112),

o una variante de la misma que comprende desde 1 a 3 intercambios, adiciones y/o deleciones de aminoácidos.

- En un modo de realización de todos los aspectos, la microglobulina β_2 es microglobulina β_2 humana. En un modo de realización, la microglobulina β_2 es microglobulina β_2 humana natural. En un modo de realización, la microglobulina β_2 consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o es una variante de la misma que comprende de desde 1 a 10 intercambios, adiciones y/o deleciones de aminoácidos.
- En un modo de realización de todos los aspectos, la microglobulina β_2 es microglobulina β_2 humana y la molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de un 10 % o más es HLA-A*0201 humana. En un modo de realización, los dominios extracelulares α_1 , α_2 y α_3 de una molécula de MHC de clase I consisten en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 o es una variante de la misma que comprende de desde 1 a 10 intercambios, adiciones y/o deleciones de aminoácidos.
- En un modo de realización de todos los aspectos, el péptido derivado de virus se fusiona con la microglobulina β_2 a través de un primer péptido enlazador. En un modo de realización, el péptido derivado de virus se fusiona con el extremo N de la microglobulina β_2 .
- En un modo de realización de todos los aspectos, la microglobulina β_2 se fusiona con el dominio extracelular α_1 de una molécula de MHC de clase I a través de un segundo péptido enlazador.
- En un modo de realización de todos los aspectos, los dominios extracelulares α_3 de una molécula de MHC de clase I se fusionan con una de las cadenas polipeptídicas unidas por disulfuro a través de un tercer péptido enlazador.
- En un modo de realización de todos los aspectos, el primer, segundo y tercer péptido enlazador es el mismo o diferente.
- En un modo de realización de todos los aspectos, el primer péptido enlazador, el segundo péptido enlazador y el tercer péptido enlazador se seleccionan independientemente entre sí de las secuencias de aminoácidos
GS (SEQ ID NO: 12), GGS (SEQ ID NO: 13), GGS (SEQ ID NO: 14), GGS (SEQ ID NO: 15), GGS (SEQ ID NO: 16), GGS (SEQ ID NO: 17), GGS (SEQ ID NO: 18), GGS (SEQ ID NO: 19), GGS (SEQ ID NO: 20), GGS (SEQ ID NO: 21), GGS (SEQ ID NO: 22), y GGS (SEQ ID NO: 23).
- En un modo de realización de todos los aspectos, el primer péptido enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21.
- En un modo de realización de todos los aspectos, el segundo péptido enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22.
- En un modo de realización de todos los aspectos, el tercer péptido enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12.
- En un modo de realización de todos los aspectos, el polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo se selecciona de un polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo humano de la clase IgG o de la clase IgE.
- En un modo de realización de todos los aspectos, el polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo se selecciona de un polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo humano de la subclase IgG1 o IgG2 o IgG3 o IgG4.
- En un modo de realización de todos los aspectos, el polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de

EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 24), EPKSADKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 25), ERKCCVECPCPCP (SEQ ID NO: 26), ERKCAVECPCCP (SEQ ID NO: 27), ERKACVECPCCP (SEQ ID NO: 28), ELKTPLGDTTHTCPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP)₃ (SEQ ID NO: 29), ESKYGPPCPSCP (SEQ ID NO: 30), DKHTHTCPPCP (SEQ ID NO: 47), VECPCPCP (SEQ ID NO: 48), AVECPCCP (SEQ ID NO: 49), DTTHTCPRCP (SEQ ID NO: 50), o PPCPSCP (SEQ ID NO: 51).

En un modo de realización de todos los aspectos, el primer polipéptido unido por disulfuro y/o el segundo polipéptido unido por disulfuro comprende un dominio CH2 y/o un dominio CH3 de origen humano. En un modo de realización, el dominio CH2 y el CH3 de origen humano es de un anticuerpo humano de la clase IgG o IgE. En un modo de realización, el dominio CH2 y el dominio CH3 es de un anticuerpo humano de la subclase IgG1 o IgG2 o IgG3 o IgG4. En un modo de realización, el dominio CH2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31. En un modo de realización, el dominio CH2 es de un anticuerpo humano de la subclase IgG1 o IgG2 y comprende al menos una mutación en E233, L234, L235, G236, D265, D270, N297, E318, K320, K322, A327, P329, A330 y/o P331 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). En un modo de realización, el dominio CH2 es de un anticuerpo de la subclase IgG1 humana o de la subclase IgG2 humana con las mutaciones L234A y L235A, y/o las mutaciones D265A y N297A, y/o contiene la mutación PVA236, y/o contiene la mutación P329G. En un modo de realización, el dominio CH2 es de un anticuerpo humano de la subclase IgG1 con las mutaciones L234A y L235A y/o P329G. En un modo de realización, el dominio CH2 es de un anticuerpo humano de la subclase IgG4 con la mutación S228P y/o L235E. En un modo de realización, el dominio CH2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32 o SEQ ID NO: 33. En un modo de realización, el dominio CH3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34.

En un modo de realización de todos los aspectos, el primer polipéptido unido por disulfuro comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 y el segundo polipéptido unido por disulfuro comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36.

En un modo de realización de todos los aspectos, el primer y el segundo polipéptido unido por disulfuro comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 o SEQ ID NO: 38.

En un modo de realización de todos los aspectos, el primer polipéptido unido por disulfuro o el segundo polipéptido unido por disulfuro consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 o SEQ ID NO: 38.

En un modo de realización de todos los aspectos, el primer polipéptido unido por disulfuro comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39 y el segundo polipéptido unido por disulfuro comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40.

En un modo de realización de todos los aspectos, las cadenas polipeptídicas, que se unen mediante uno o más enlaces disulfuro, se unen mediante dos, tres o cuatro enlaces disulfuro.

En un modo de realización de todos los aspectos, el complejo se caracteriza por que el polipéptido de fusión comprende en dirección de extremo N a C

- (i) un péptido derivado de virus que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende SEQ ID NO: 01 a SEQ ID NO: 09,
- (ii) un primer péptido enlazador que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende SEQ ID NO: 16, 17, 18, 21, 22 y 23.
- (iii) una microglobulina β_2 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o es una variante de la misma que comprende de desde 1 a 10 intercambios, adiciones y/o deleciones de aminoácidos,
- (iv) un segundo péptido enlazador que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende SEQ ID NO: 16, 17, 18, 21, 22 y 23.
- (v) los dominios extracelulares α_1 , α_2 y α_3 de una molécula de MHC de clase I que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 o es una variante de la misma que comprende de desde 1 a 10 intercambios, adiciones y/o deleciones de aminoácidos, y

- (vi) un tercer péptido enlazador que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende SEQ ID NO: 12, 16, 17, 18, 21, 22 y 23.

5 En un modo de realización de todos los aspectos, el primer polipéptido unido por disulfuro y el segundo polipéptido unido por disulfuro comprenden adicionalmente

- un dominio CH2 de IgG1 humana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 31, 32 y 33, y
- un dominio CH3 de IgG1 humana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 34, 35 y 36.

En un modo de realización de todos los aspectos, el complejo se caracteriza por que comprende

- un polipéptido de fusión que comprende en dirección de extremo N a C
 - (i) un péptido derivado de virus que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 01 a SEQ ID NO: 09,
 - (ii) un primer péptido enlazador que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 16, 17, 18, 21, 22 y 23.
 - (iii) una microglobulina β_2 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o es una variante de la misma que comprende de desde 1 a 10 intercambios, adiciones y/o deleciones de aminoácidos,
 - (iv) un segundo péptido enlazador que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 16, 17, 18, 21, 22 y 23.
 - (v) los dominios extracelulares α_1 , α_2 y α_3 de una molécula de MHC de clase I que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 o es una variante de la misma que comprende de desde 1 a 10 intercambios, adiciones y/o deleciones de aminoácidos, y
 - (vi) un tercer péptido enlazador que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 12, 16, 17, 18, 21, 22 y 23,

y

- dos cadenas polipeptídicas, que se unen mediante uno o más enlaces disulfuro, en el que la primera cadena polipeptídica unida por disulfuro comprende en dirección de extremo N a C
 - (i) un dominio variable de la cadena ligera o pesada de inmunoglobulina,
 - (ii) un dominio constante de la cadena ligera o pesada de inmunoglobulina,
 - (iii) un polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 24 a SEQ ID NO: 30 y SEQ ID NO: 47-51,
 - (iv) un dominio CH2 de IgG1 humana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 31, 32 y 33, y
 - (v) un dominio CH3 de IgG1 humana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 34, 35 y 36,

y la segunda cadena polipeptídica unida por disulfuro comprende en dirección de extremo N a C

- (i) un polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 24 a SEQ ID NO: 30 y SEQ ID NO: 47-51,
- (ii) un dominio CH2 de IgG1 humana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 31, 32 y 33, y
- (iii) un dominio CH3 de IgG1 humana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 34, 35 y 36,

en el que el polipéptido de fusión

- se une covalentemente ya sea al extremo C o al extremo N de la segunda cadena polipeptídica unida por disulfuro.

En un modo de realización de todos los aspectos, la primera y la segunda cadena polipeptídica unida por disulfuro comprenden el mismo polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo.

En un modo de realización de todos los aspectos, el polipéptido derivado de virus comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 01, el primer péptido enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21, el segundo péptido enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22, el tercer péptido enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 12, el dominio CH2 de IgG1 humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 32 o 33, y el dominio CH3 de IgG1 humana de un polipéptido unido por disulfuro comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 y el dominio CH3 de IgG1 humana del otro polipéptido unido por disulfuro comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36.

En un modo de realización de todos los aspectos, el complejo se caracteriza por que comprende

- un polipéptido de fusión que comprende en dirección de extremo N a C
 - (i) un péptido derivado de virus que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 01 a SEQ ID NO: 09,
 - (ii) un primer péptido enlazador que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 16, 17, 18, 21, 22 y 23.
 - (iii) una microglobulina β_2 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o es una variante de la misma que comprende de desde 1 a 10 intercambios, adiciones y/o deleciones de aminoácidos,
 - (iv) un segundo péptido enlazador que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 16, 17, 18, 21, 22 y 23.
 - (v) los dominios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de una molécula de MHC de clase I que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 o es una variante de la misma que comprende de desde 1 a 10 intercambios, adiciones y/o deleciones de aminoácidos, y
 - (vi) un tercer péptido enlazador que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 12, 16, 17, 18, 21, 22 y 23,

y

- dos cadenas polipeptídicas, que se unen mediante uno o más enlaces disulfuro,

en el que la primera cadena polipeptídica unida por disulfuro comprende en dirección de extremo N a C

- (i) un dominio variable de la cadena ligera o pesada de inmunoglobulina,
- (ii) un dominio constante de la cadena ligera o pesada de inmunoglobulina,
- (iii) un polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 24 a SEQ ID NO: 30 y SEQ ID NO: 47-51,
- (iv) un dominio CH2 de IgG1 humana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 31, 32 y 33, y
- (v) un dominio CH3 de IgG1 humana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 34, 35 y 36,

y la segunda cadena polipeptídica unida por disulfuro comprende un polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 24 a SEQ ID NO: 30 y SEQ ID NO: 47-51,

en el que el polipéptido de fusión

- se une covalentemente ya sea al extremo C o al extremo N de la primera cadena polipeptídica unida por

disulfuro, o

- se une covalentemente al extremo N de un dominio variable de anticuerpo que es el dominio variable de la cadena pesada o ligera complementario al comprendido en la primera cadena polipeptídica unida por disulfuro, o
- se une covalentemente al extremo C de un dominio constante de anticuerpo que es el dominio constante de la cadena pesada o ligera complementario al comprendido en la primera cadena polipeptídica unida por disulfuro.

En un modo de realización de todos los aspectos, el polipéptido derivado de virus comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 01, el primer péptido enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21, el segundo péptido enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22, el tercer péptido enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 12, el dominio CH2 de IgG1 humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 32 o 33, y el dominio CH3 de IgG1 humana de un polipéptido unido por disulfuro comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 y el dominio CH3 de IgG1 humana del otro polipéptido unido por disulfuro comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36.

En un modo de realización de todos los aspectos, el complejo se caracteriza por que comprende

- un polipéptido de fusión que comprende en dirección de extremo N a C
 - (i) un péptido derivado de virus que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 01 a SEQ ID NO: 09,
 - (ii) un primer péptido enlazador que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 16, 17, 18, 21, 22 y 23.
 - (iii) una microglobulina β_2 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o es una variante de la misma que comprende de desde 1 a 10 intercambios, adiciones y/o deleciones de aminoácidos,
 - (iv) un segundo péptido enlazador que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 16, 17, 18, 21, 22 y 23.
 - (v) los dominios extracelulares α_1 , α_2 y α_3 de una molécula de MHC de clase I que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 o es una variante de la misma que comprende de desde 1 a 10 intercambios, adiciones y/o deleciones de aminoácidos, y
 - (vi) un tercer péptido enlazador que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 12, 16, 17, 18, 21, 22 y 23,

y

- dos cadenas polipeptídicas, que se unen mediante uno o más enlaces disulfuro, en el que la primera y la segunda cadena polipeptídica unida por disulfuro comprende cada una en dirección de extremo N a C
 - (i) un dominio variable de la cadena ligera o pesada de inmunoglobulina,
 - (ii) un dominio constante de la cadena ligera o pesada de inmunoglobulina,
 - (iii) un polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 24 a SEQ ID NO: 30 y SEQ ID NO: 47-51,
 - (iv) un dominio CH2 de IgG1 humana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 31, 32 y 33, y
 - (v) un dominio CH3 de IgG1 humana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 34, 35 y 36,

en el que el polipéptido de fusión

- se une covalentemente ya sea al extremo C o al extremo N de la segunda cadena polipeptídica unida por disulfuro, o

- se une covalentemente al extremo N de un dominio variable de anticuerpo que es el dominio variable de la cadena pesada o ligera complementario al comprendido en la primera cadena polipeptídica unida por disulfuro, o

- 5
- se une covalentemente al extremo C de un dominio constante de anticuerpo que es el dominio constante de la cadena pesada o ligera complementario al comprendido en la primera cadena polipeptídica unida por disulfuro.

10 En un modo de realización de todos los aspectos, el polipéptido derivado de virus comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 01, el primer péptido enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21, el segundo péptido enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22, el tercer péptido enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 12, el dominio CH2 de IgG1 humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 32 o 33, y el dominio CH3 de IgG1 humana de un polipéptido unido por disulfuro comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 y el dominio CH3 de IgG1 humana del otro polipéptido unido por disulfuro comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36.

En un modo de realización de todos los aspectos

- 20
- el primer péptido enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21, y/o
 - el segundo péptido enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22, y/o
 - el tercer péptido enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, y/o
- 25
- el dominio CH2 de IgG1 humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32 o 33, y/o
 - el dominio CH3 de IgG1 humana de un polipéptido unido por disulfuro comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 y el dominio CH3 de IgG1 humana del otro polipéptido unido por disulfuro comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36.

30 En un modo de realización de todos los aspectos, el péptido derivado de virus se selecciona del grupo que comprende SEQ ID NO: 01 a SEQ ID NO: 09, SEQ ID NO: 52 a SEQ ID NO: 112, o es una variante del mismo que comprende de 1 a 3 intercambios, adiciones y/o deleciones de aminoácidos.

35 Un aspecto como se informa en el presente documento es un ácido nucleico que codifica el complejo como se informa en el presente documento.

En un modo de realización, el ácido nucleico comprende de dos a cuatro casetes de expresión que comprenden genes estructurales que codifican polipéptidos con diferentes secuencias de aminoácidos.

40 Un aspecto como se informa en el presente documento es una célula huésped que comprende el ácido nucleico como se informa en el presente documento.

45 Un aspecto como se informa en el presente documento es un procedimiento de producción de un complejo como se informa en el presente documento que comprende cultivar la célula huésped como se informa en el presente documento, de modo que se produzca el complejo.

En un modo de realización, el complejo se recupera de las células o del medio de cultivo y de ese modo se produce el complejo.

50 Un aspecto como se informa en el presente documento es un inmunconjugado que comprende el complejo como se informa en el presente documento y un agente citotóxico.

55 Un aspecto como se informa en el presente documento es una formulación farmacéutica que comprende el complejo como se informa en el presente documento y opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En un modo de realización, la formulación farmacéutica comprende adicionalmente un agente terapéutico adicional.

60 Un aspecto como se informa en el presente documento es el complejo como se informa en el presente documento para su uso como medicamento.

Un aspecto como se informa en el presente documento es el complejo como se informa en el presente documento para su uso en el tratamiento del cáncer o de una infección vírica crónica.

65 Un aspecto como se informa en el presente documento es el complejo como se informa en el presente documento para su uso en el tratamiento mediante linfocitos T citotóxicos específicos de virus de un individuo con respecto a

una diana.

Un aspecto como se informa en el presente documento es el complejo como se informa en el presente documento para su uso en el tratamiento mediante la eliminación de células cancerosas o de células infectadas por virus.

5

Descripción detallada de la invención

Breve descripción de las figuras

- Figura 1** Esquema con anotaciones de los complejos como se informa en el presente documento.
- Figura 2** Polipéptidos ejemplares comprendidos en el complejo como se informa en el presente documento: los polipéptidos de fusión se fusionaron en el extremo N o bien con una cadena ligera de anticuerpo o con una región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo que comprende el polipéptido.
- Figura 3** Inmunoelctrotransferencia en un gel de poliacrilamida con SDS de sobrenadante de cultivo celular de células HEK 293 transfectadas con los plásmidos de expresión correspondientes. La tinción se realizó con anticuerpo de cadena ligera κ antihumano de conejo policlonal conjugado con peroxidasa y anticuerpo anti-IgG humana de conejo policlonal conjugado con peroxidasa de rábano picante.
- Carriles: 1: péptido de dos brazos-microglobulina β_2 -HLA-A0201-IgG-Fc; 2: péptido de un brazo-microglobulina β_2 -HLA-A0201-IgG-Fc + IgG-Fc; 3: péptido de un brazo-microglobulina β_2 -HLA-A0201-cadena pesada de IgG + cadena ligera de IgG + IgG-Fc; 4: péptido de un brazo-microglobulina β_2 -HLA-A0201-cadena pesada de IgG + cadena pesada de IgG + cadena ligera de IgG; 5: microglobulina β_2 de dos brazos-HLA-A0201-cadena ligera de IgG + cadena pesada de IgG; 6: péptido de dos brazos-microglobulina β_2 -HLA-A0201-cadena ligera de IgG + cadena pesada de IgG; 7: péptido de dos brazos-microglobulina β_2 -HLA-A0201-cadena pesada de IgG + cadena ligera de IgG; 8: péptido de dos brazos-microglobulina β_2 -HLA-A0201-IgG-Fc-scFv; 9: péptido de un brazo-microglobulina β_2 -HLA-A0201-IgG-Fc + IgG de un brazo (cadena pesada y ligera); 10: marcador de peso molecular; 11: anticuerpo de IgG1 estándar de referencia.
- Figura 4** Análisis de citometría de flujo para determinar el número de linfocitos T citolíticos específicos de CMV de diferentes donantes antes y después de la estimulación *in vitro* con péptido específico: Análisis de 4 linfocitos de sangre periférica (PBL) derivados de donantes humanos; tinción de anticuerpo anti-CD8 conjugado con marcador de FITC (BD, n.º de cat. 345772) combinado con TCR teñido con pentámero APC Pro5 (Prolimmune, n.º de cat. F008-4A-E) que reconoce MHC de clase I (HLA-A*0201) cargado con péptido derivado de CMV (NLVPMVATV, SEQ ID NO: 01); círculo: linfocitos T CD8⁺ específicos de CMV.
- Figura 5** Análisis de citometría de flujo para analizar la capacidad citolítica de CTL estimulados a través de la lisis de células tumorales MN60 cargadas con péptido de CMV.
- Figura 6** Eliminación específica de linfocitos T de linfocitos T pulsados de CMV: Análisis de citometría de flujo para analizar la capacidad citolítica de CTL estimulados a través de la lisis de células tumorales MN60 cargadas con péptido CMV que depende de la proporción de células efectoras con respecto a dianas; negro: células MN60 cargadas con péptido de CMV, blanco: células MN60 no cargadas con péptido de CMV.
- Figura 7** A: Gel de SDS-PAGE con tinción de Coomassie: carril 1: estándar de peso molecular, carril 2: complejo de péptido de un brazo-microglobulina β_2 -HLA-A0201-IgG-Fc + IgG de un brazo (cadena pesada y ligera), condiciones no reductoras; carril 3: complejo de péptido de un brazo-microglobulina β_2 -HLA-A0201-IgG-Fc + IgG de un brazo (cadena pesada y ligera), condiciones reductoras.
- B: Cromatograma de cromatografía de exclusión por tamaño; 1: formas de alto peso molecular (0,7 % de área); 2: complejo monomérico (99,3 % de área).
- Figura 8** A: Gel de SDS-PAGE con tinción de Coomassie: carril 1: estándar de peso molecular, carril 2: complejo de péptido de un brazo-microglobulina β_2 -HLA-A0201-cadena pesada de IgG + cadena ligera de IgG + IgG-Fc, condiciones no reductoras; carril 3: complejo de péptido de un brazo-microglobulina β_2 -HLA-A0201-cadena pesada de IgG + cadena ligera de IgG + IgG-Fc, condiciones reductoras.

B: Cromatograma de cromatografía de exclusión por tamaño; 1: formas de alto peso molecular (1,8 % de área); 2: complejo monomérico (98,2 % de área).

Figura 9

Análisis de la unión de un complejo como se informa en el presente documento con respecto a la línea celular positiva para IGF-1R humano usando FACS.

1: Células H460M2 incubadas con complejo de péptido de un brazo-microglobulina β_2 -HLA-A0201-cadena pesada de IgG + cadena ligera de IgG + IgG-Fc, no teñido;

2: células H460M2 incubadas con complejo de péptido de un brazo-microglobulina β_2 -HLA-A0201-cadena pesada de IgG + cadena ligera de IgG + IgG-Fc a 4 °C, teñido con anticuerpo anti-IgG humana marcado de manera fluorescente;

3: células H460M2 incubadas con complejo de péptido de un brazo-microglobulina β_2 -HLA-A0201-cadena pesada de IgG + cadena ligera de IgG + IgG-Fc a 37 °C, teñido con anticuerpo anti-IgG humana marcado de manera fluorescente;

4: células H460M2 incubadas con complejo de péptido de un brazo-microglobulina β_2 -HLA-A0201-cadena pesada de IgG + cadena ligera de IgG + IgG-Fc, teñido con anticuerpo de control marcado de manera fluorescente (anticuerpo anti-DIG);

5: células H460M2 teñidas con anticuerpo anti-IgG humana marcado de manera fluorescente;

6: células H460M2 teñidas con anticuerpo anti-IGF-1R humano marcado de manera fluorescente.

Figura 10

Imágenes de microscopio del complejo de unión a antígeno como se informa en el presente documento de lisis mediada de células I24 3T3 que expresan IGF-1R humano (células grandes proliferativas con adherencia, punta de flecha blanca). La lisis está mediada por linfocitos T específicos de CMV humano (células pequeñas ya sea con forma redonda, flecha blanca, o células migratorias de ameboides, flecha negra).

Figura 11

Imágenes de microscopio de células I24 3T3 (grandes células proliferativas con adherencia, punta de flecha blanca) incubadas con linfocitos T específicos de CMV humano (células pequeñas ya sea células migratorias con forma redonda, flecha blanca, o de ameboides, flecha negra) en ausencia de un complejo como se informa en el presente documento.

Figura 12

Ensayo de citotoxicidad: el complejo de unión a antígeno como se informa en el presente documento desencadena la lisis de células tumorales H460M2 a través de linfocitos T específicos de CMV humanos. a) (6h) Células diana:linfocitos T efectores específicos de CMV 1:1,5; b) (6h) Células diana:linfocitos T efectores específicos de CMV 1:0,75; c) (6h) Células diana:linfocitos T efectores específicos de CMV 1:0,5; barra izquierda: complejo como se informa en el presente documento; barra derecha MAB IGF-1R-afucosilado.

Figura 13

Ensayo de citotoxicidad: el complejo de unión a antígeno como se informa en el presente documento desencadena la lisis de células tumorales I24 3T3 a través de linfocitos T específicos de CMV humanos; a) (9h) Células diana:linfocitos T efectores específicos de CMV 1:1,5; b) (9h) Células diana:linfocitos T efectores específicos de CMV 1:0,75; c) 9h) Células diana:linfocitos T efectores específicos de CMV 1:0,5; barra izquierda: complejo como se informa en el presente documento; barra central: MAB IGF-1R-afu; barra derecha: MAB ed; barra derecha: anticuerpo anti-digoxigenina.

Figura 14

Análisis de FACS de unión del anticuerpo anti-IGF-1R y de los complejos como se informa en el presente documento a la línea celular de adenocarcinoma de pulmón H460M2; a) anticuerpo secundario solamente (anti-IgG humana (H+L) de cabra (Jackson Laboratories, n.º de cat. 109-116-088)); b) complejo como se informa en el presente documento en el que el polipéptido de fusión se fusiona con el extremo N de la cadena pesada de un anticuerpo anti-IGF-1R que comprende solamente un par de dominios variables; c) anticuerpo anti-IGF-1R.

Figura 15

Eficacia y especificidad *in vitro* (ensayo de citotoxicidad) de diferentes complejos como se informa en el presente documento; a) complejo que comprende un anticuerpo anti-IGF1R monovalente y un péptido derivado de CMV; b) complejo que comprende un anticuerpo anti-IGF1R monovalente y un péptido derivado de EBV (control); c) complejo que comprende un anticuerpo anti-IGF1R bivalente y un péptido derivado de CMV; d) anticuerpo anti-IGF-1R (control); e) anticuerpo anti-digoxigenina (control).

Figura 16 Eficacia y especificidad *in vitro* (valor de CE50) de un complejo como se informa en el presente documento en el que el polipéptido de fusión se fusiona con el extremo N de la cadena pesada de un anticuerpo anti-IGF-1R completo determinado a diferentes proporciones de célula diana (T) con respecto a efectora (E).

Figura 17 Lisis de células diana después de 6 horas de incubación con a) un complejo que comprende un anticuerpo anti-IGF1R monovalente y un polipéptido de fusión que comprende un péptido derivado de CMV y b) un anticuerpo anti-IGF-1R a una proporción de células diana con respecto a efectoras de 1:1,5.

Breve descripción de las secuencias

SEQ ID NO: 01	Péptido derivado de citomegalovirus humano.
SEQ ID NO: 02	Péptido derivado del virus de inmunodeficiencia humana.
SEQ ID NO: 03	Péptido derivado del herpesvirus humano 4.
SEQ ID NO: 04	Péptido derivado del virus de la gripe A.
SEQ ID NO: 05	Péptido derivado del virus de la hepatitis B.
SEQ ID NO: 06	Péptido derivado del virus linfotrópico de linfocitos T humano tipo 1.
SEQ ID NO: 07	Péptido derivado del homólogo del oncogén del virus de sarcoma V-jun 17 (JUN).
SEQ ID NO: 08	Péptido derivado del adenovirus humano de tipo 3.
SEQ ID NO: 09	Péptido derivado del virus de la hepatitis C.
SEQ ID NO: 10	Secuencia de aminoácidos de microglobulina β_2 humana.
SEQ ID NO: 11	Secuencia de aminoácidos de la cadena $\alpha 1 - \alpha 3$ de HLA-A*0201 humana.
SEQ ID NO: 12-23	Secuencias de aminoácidos del péptido enlazador.
SEQ ID NO: 24	Secuencia de aminoácidos del polipéptido de bisagra de la cadena pesada de IgG1 humana.
SEQ ID NO: 25	Secuencia de aminoácidos del polipéptido variante de bisagra de la cadena pesada de IgG1 humana.
SEQ ID NO: 26	Secuencia de aminoácidos del polipéptido de bisagra de la cadena pesada de IgG2 humana.
SEQ ID NO: 27	Secuencia de aminoácidos del polipéptido variante de bisagra de la cadena pesada de IgG2 humana.
SEQ ID NO: 28	Secuencia de aminoácidos del polipéptido variante de bisagra de la cadena pesada de IgG2 humana.
SEQ ID NO: 29	Secuencia de aminoácidos del polipéptido de bisagra de la cadena pesada de IgG3 humana.
SEQ ID NO: 30	Secuencia de aminoácidos del polipéptido de bisagra de la cadena pesada de IgG4 humana.
SEQ ID NO: 31	Secuencia de aminoácidos del dominio CH2 de IgG1 humana.
SEQ ID NO: 32	Secuencia de aminoácidos mutante L234A, L235A del dominio CH2 de IgG1 humana.
SEQ ID NO: 33	Secuencia de aminoácidos L234A, L235A, P329G del dominio CH2 de IgG1 humana.
SEQ ID NO: 34	Secuencia de aminoácidos del dominio CH3 de IgG1 humana.
SEQ ID NO: 35	Secuencia de aminoácidos variante de botón del dominio CH3 de IgG1 humana.
SEQ ID NO: 36	Secuencia de aminoácidos variante de ojal del dominio CH3 de IgG1 humana.

SEQ ID NO: 37	Secuencia de aminoácidos de la región Fc de IgG1 humana.
SEQ ID NO: 38	Secuencia de aminoácidos mutante L234A, L235A de la región Fc de IgG1 humana.
SEQ ID NO: 39	Secuencia de aminoácidos variante de ojal y mutante L234A, L235A de la región Fc de IgG1 humana.
SEQ ID NO: 40	Secuencia de aminoácidos variante de botón y mutante L234A, L235A de la región Fc de IgG1 humana.
SEQ ID NO: 41	Secuencia de aminoácidos de anticuerpo de cadena ligera monoclonal anti-IGF-1R humanizada (kappa).
SEQ ID NO: 42	Secuencia de aminoácidos de anticuerpo de cadena pesada monoclonal anti-IGF-1R humanizada (mutante L234A, L235A de IgG1).
SEQ ID NO: 43	Secuencia de aminoácidos de anticuerpo de cadena pesada monoclonal anti-IGF-1R humanizada (mutante L234A, L235A y variante de botón de IgG1).
SEQ ID NO: 44	Secuencia de aminoácidos de anticuerpo de cadena pesada monoclonal anti-IGF-1R humanizada (mutante L234A, L235A y variante de ojal de IgG1).
SEQ ID NO: 45	Región bisagra mutante y mutante L234A, L235A y variante de botón de la región Fc de IgG1 humana.
SEQ ID NO: 46	Fv monocatenario estabilizado con disulfuro de anticuerpo monoclonal anti-IGF-1R humanizado.
SEQ ID NO: 47-51	Secuencias de aminoácidos del polipéptido de bisagra de la cadena pesada de anticuerpo humano acortadas.
SEQ ID NO: 52-66	Péptidos derivados del virus del dengue.
SEQ ID NO: 67-112	Péptidos derivados de citomegalovirus humano.

I. Definiciones

5 “Afinidad” se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su ligando de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, como se usa en el presente documento, “afinidad de unión” se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre los miembros de una pareja de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su ligando Y se puede representar, en general, por la constante de disociación (Kd).
10 La afinidad se puede medir mediante procedimientos comunes conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en el presente documento. Los modos de realización ilustrativos y ejemplares específicos para medir la afinidad de unión se describen a continuación.

El término “aminoácido” como se usa dentro de esta solicitud denota el grupo de carboxi α -aminoácidos, que directamente o en forma de un precursor se pueden codificar por un ácido nucleico. Los aminoácidos individuales se
15 codifican por ácidos nucleicos que consisten en tres nucleótidos, denominados codones o tripletes de bases. Cada aminoácido se codifica por al menos un codón. Esto se conoce como “degeneración del código genético”. El término “aminoácido” como se usa dentro de esta solicitud denota los carboxi α -aminoácidos naturales que comprenden alanina (código de tres letras: ala, código de una letra: A), arginina (arg, R), asparagina (asn, N), ácido aspártico (asp, D), cisteína (cys, C), glutamina (gln, Q), ácido glutámico (glu, E), glicina (gly, G), histidina (his, H), isoleucina
20 (ile, I), leucina (leu, L), lisina (lys, K), metionina (met, M), fenilalanina (phe, F), prolina (pro, P), serina (ser, S), treonina (thr, T), triptófano (trp, W), tirosina (tyr, Y) y valina (val, V).

Los términos “anticuerpo anti-diana” y “un anticuerpo que se une a una diana” se refieren a un anticuerpo que se puede unir a una diana con una afinidad suficiente para que el anticuerpo sea útil como agente de diagnóstico y/o
25 terapéutico al dirigirse contra la diana. En determinados modos de realización, un anticuerpo que se une a la diana tiene una constante de disociación (Kd) de ≤ 10 nM, ≤ 1 nM, $\leq 0,1$ nM, $\leq 0,01$ nM o $\leq 0,001$ nM (por ejemplo, 10^{-8} M o menos, por ejemplo, de desde 10^{-8} M a 10^{-13} M, por ejemplo, de desde 10^{-9} M a 10^{-13} M).

El término “anticuerpo” en el presente documento se usa en el sentido más amplio y abarca diversas estructuras de anticuerpos, incluyendo, pero no limitadas a, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos
30 multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo siempre que presenten la actividad de unión a antígeno deseada.

Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo intacto que comprende una porción de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenario (por ejemplo, scFv); anticuerpos de único dominio y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

La "clase" de un anticuerpo se refiere al tipo de dominio constante o región constante que posee su cadena pesada. Hay cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas se pueden dividir, adicionalmente, en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden con las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente.

El término "molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de" denota que la molécula de MHC de clase I respectiva tiene una frecuencia de aparición en una población específica de seres humanos o dentro de todos los seres humanos de la frecuencia relativa dada. Es decir, una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de un 10 % o más se puede hallar en un 10 % o más de todos los seres humanos de una población específica, tal como por ejemplo, en un 27,2 % de todos los seres humanos de origen europeo.

La "conjugación" de un complejo con su ligando de conjugación se puede realizar mediante diferentes procedimientos, tales como unión química, o unión a través de un par de unión específico. El término "ligando de conjugación" denota, por ejemplo, polipéptidos, marcadores detectables, miembros de pares de unión específicos. En un modo de realización, la conjugación del complejo con su ligando de conjugación se realiza mediante unión química a través de grupos de extremo N y/o ϵ -amino (lisina), grupos ϵ -amino de diferentes lisinas, grupos funcionales carboxi, sulfhidrilo, hidroxilo y/o fenólicos de la secuencia de aminoácidos de las partes del complejo, y/o grupos alditol de la estructura glucídica del complejo. En un modo de realización, el complejo se conjuga con su ligando de conjugación a través de un par de unión específico.

El término "agente citotóxico", como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia que inhibe o previene una función celular y/o provoca muerte o destrucción celular. Los agentes citotóxicos incluyen, pero no se limitan a, isótopos radioactivos (por ejemplo, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² y los isótopos radioactivos de Lu); agentes o fármacos quimioterápicos (por ejemplo, metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorrubicina u otros agentes intercalantes); agentes inhibidores del crecimiento; enzimas y fragmentos de las mismas tales como enzimas nucleolíticas; antibióticos; toxinas tales como toxinas de micromolécula o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de los mismos; y los diversos antineoplásicos o antitumorales.

Los cromógenos (grupos y colorantes fluorescentes o luminiscentes), las enzimas, los grupos o partículas metálicas activos en RMN, los haptenos, por ejemplo, la digoxigenina, son ejemplos de "marcadores detectables". El marcador detectable también puede ser un grupo de reticulación fotoactivable, por ejemplo, un grupo azido o azirina. Los quelatos metálicos que se pueden detectar mediante electroquimioluminiscencia también son grupos emisores de señales adecuados, dándose particular preferencia a quelatos de rutenio, por ejemplo, un quelato de rutenio (bispiridilo)₃²⁺. Los grupos marcadores de rutenio adecuados se describen, por ejemplo, en los documentos EP 0 580 979, WO 90/05301, WO 90/11511 y WO 92/14138. Para la detección directa, el grupo marcador se puede seleccionar de cualquier grupo de marcadores detectables conocidos, tales como colorantes, grupos marcadores luminiscentes tales como grupos quimioluminiscentes, por ejemplo, ésteres de acridinio o dioxetanos, o colorantes fluorescentes, por ejemplo, fluoresceína, cumarina, rodamina, oxazina, resorufina, cianina y derivados de los mismos. Otros ejemplos de grupos marcadores son complejos metálicos luminiscentes, tales como complejos de rutenio o europio, enzimas, por ejemplo, las usadas para ELISA o para CEDIA (inmunoensayo donante con enzima clonada, por ejemplo, el documento EP-A-0 061 888) y radioisótopos.

Las "funciones efectoras" se refieren a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo, que varían con el isotipo del anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de los anticuerpos incluyen: la unión a C1q y la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); la unión al receptor de Fc; la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC); la fagocitosis; la regulación por disminución de receptores de la superficie celular (por ejemplo, el receptor de linfocitos B); y la activación de linfocitos B.

Una "cantidad eficaz" de un agente, por ejemplo, una formulación farmacéutica, se refiere a una cantidad eficaz, en las dosis y durante los periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

El término "expresión", como se usa en el presente documento, se refiere a procesos de transcripción y/o traducción y secreción que se producen dentro de una célula. El nivel de transcripción de una secuencia de ácido nucleico de interés en una célula se puede determinar basándose en la cantidad de ARNm correspondiente que está presente en la célula. Por ejemplo, el ARNm transcrito de una secuencia de interés se puede cuantificar mediante RT-PCR o mediante hibridación Northern (véase Sambrook, *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición,

Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Los polipéptidos codificados por un ácido nucleico se pueden cuantificar mediante diversos procedimientos, por ejemplo, mediante ELISA, mediante el ensayo de la actividad biológica del polipéptido, o empleando ensayos que son independientes de dicha actividad, tales como inmunoelctrotransferencia o radioinmunoensayo, usando inmunoglobulinas que reconocen y se unen al polipéptido (véase Sambrook, *et al.*, (1989), *supra*).

Un "casete de expresión" denota una construcción que contiene los elementos reguladores necesarios, tales como promotor y sitio de poliadenilación, para la expresión de al menos el ácido nucleico contenido en una célula.

El término "mecanismo de expresión" denota la suma de las enzimas, cofactores, etc., de una célula que participa en las etapas que comienzan con la etapa de transcripción de un ácido nucleico o gen (es decir, también denominado "mecanismo de expresión génica") para la modificación postraducciona del polipéptido codificado por el ácido nucleico. El mecanismo de expresión, por ejemplo, comprende las etapas de transcripción de ADN en pre-ARNm, corte y empalme de pre-ARNm para ARNm maduro, traducción en un polipéptido del ARNm y modificación postraducciona del polipéptido.

Un "plásmido de expresión" es un ácido nucleico que proporciona todos los elementos requeridos para la expresión del/de los gen(es) estructural(es) comprendido(s) en una célula huésped. Típicamente, un plásmido de expresión comprende una unidad de propagación de plásmidos procariotas, por ejemplo, para *E. coli*, que comprende un origen de replicación, y un marcador seleccionable, un marcador de selección eucariótico, y uno o más casetes de expresión para la expresión del/de los gen(es) estructural(es) de interés, comprendiendo cada uno un promotor, un gen estructural y un terminador de la transcripción que incluye una señal de poliadenilación. La expresión génica se coloca normalmente bajo el control de un promotor y dicho gen estructural se dice que se "une funcionalmente al" promotor. De forma similar, un elemento regulador y un promotor mínimo se unen funcionalmente si el elemento regulador modula la actividad del promotor mínimo.

El término "región Fc" en el presente documento se usa para definir una región de extremo C de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos una porción de la región constante. El término incluye regiones Fc de secuencia natural y regiones Fc variantes. En un modo de realización, una región Fc de la cadena pesada de IgG humana se extiende desde Cys226, o desde Pro230, al extremo carboxilo de la cadena pesada. Sin embargo, puede estar presente o no la lisina de extremo C (Lys447) de la región Fc. A menos que se especifique de otro modo en el presente documento, la numeración de los residuos de aminoácidos en la región Fc o región constante es de acuerdo con el sistema de numeración de EU, también denominado el índice EU, como se describe en Kabat, E.A. *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242.

Una "región Fc" es un término bien conocido y definido en base a la escisión de papaína de una cadena pesada de anticuerpo. Los complejos como se informa en el presente documento pueden comprender en un modo de realización como polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo una región Fc humana o una región Fc derivada de origen humano. En un modo de realización adicional, la región Fc es ya sea una región Fc de un anticuerpo humano de la subclase IgG4 o una región Fc de un anticuerpo humano de la subclase IgG1, IgG2 o IgG3, que se modifica de tal manera que no se puede detectar la unión al receptor Fc γ (por ejemplo, Fc γ R1IIa) y/o la unión a C1q. En un modo de realización, la región Fc es una región Fc de humano y especialmente ya sea de la subclase IgG4 humana o una región Fc mutada de la subclase IgG1 humana. En un modo de realización, la región Fc es de la subclase IgG1 humana con las mutaciones L234A y L235A. Mientras que la IgG4 muestra una unión al receptor Fc γ reducida (Fc γ R1IIa), los anticuerpos de otras subclases de IgG muestran una unión fuerte. Sin embargo, Pro238, Asp265, Asp270, Asn297 (pérdida de carbohidrato de Fc), Pro329, Leu234, Leu235, Gly236, Gly237, Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434 y/o His435 son residuos que, si se alteran, proporcionan también una unión al receptor Fc γ reducida (Shields, R.L., *et al.*, J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604; Lund, J., *et al.*, FASEB J. 9 (1995) 115-119; Morgan, A., *et al.*, Immunology 86 (1995) 319-324; documento EP 0 307 434). En un modo de realización, un complejo como se informa en el presente documento se refiere a la unión al receptor Fc γ de la subclase IgG4 o de la subclase IgG1 o IgG2, con una mutación en L234, L235 y/o D265, y/o contiene la mutación PVA236. En un modo de realización, las mutaciones son S228P, L234A, L235A, L235E y/o PVA236 (PVA236 denota que la secuencia de aminoácidos ELLG (dada en un código de aminoácidos de una letra) desde la posición de aminoácidos 233 a 236 de la IgG1 o EFLG de la IgG4 se reemplaza por PVA). En un modo de realización, las mutaciones son S228P de la IgG4, y L234A y L235A de la IgG1. La región Fc de un anticuerpo participa directamente en ADCC (citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo) y CDC (citotoxicidad dependiente de complemento). Un complejo que no une el receptor Fc γ y/o el factor de complemento C1q no provoca citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

Los términos "célula huésped", "línea celular huésped" y "cultivo de células huésped" se usan indistintamente y se refieren a células en las que se ha introducido el ácido nucleico exógeno, incluyendo la descendencia de dichas células. Las células huésped incluyen "transformantes" y "células transformadas", que incluyen la célula transformada primaria y la descendencia derivada de la misma independientemente del número de pases. La

descendencia puede no ser completamente idéntica en el contenido de ácido nucleico a una célula precursora, pero puede contener mutaciones. La descendencia mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la cribada o seleccionada en la célula originalmente transformada se incluye en el presente documento.

El término "célula" incluye tanto las células procariotas, que se usan para la propagación de plásmidos, como las células eucariotas, que se usan para la expresión de un ácido nucleico. En un modo de realización, la célula eucariota es una célula de mamífero. En un modo de realización, la célula de mamífero se selecciona del grupo de células de mamífero que comprende células CHO (por ejemplo, CHO K1, CHO DG44), células BHK, células NS0, células Sp2/0, células HEK 293, células HEK 293 EBNA, células PER.C6® y células COS.

Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de aminoácidos que se corresponde con la de un anticuerpo producido por un ser humano o una célula humana o derivado de una fuente no humana que utiliza repertorios de anticuerpos humanos u otras secuencias que codifican anticuerpos humanos. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno no humanos.

Un "inmunoconjugado" denota un complejo como se informa en el presente documento conjugado a una o más moléculas heterólogas incluyendo, pero no limitado a, un agente citotóxico.

Un "individuo" o "sujeto" es un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, animales domesticados (por ejemplo, vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (por ejemplo, seres humanos y primates no humanos tales como monos), conejos y roedores (por ejemplo, ratones y ratas). En determinados modos de realización, el individuo o sujeto es un ser humano.

Un complejo "aislado" es uno que se ha separado de un componente de su entorno natural. En algunos modos de realización, un complejo se purifica hasta más de un 95 % o un 99 % de pureza, como se determina, por ejemplo, mediante electroforesis (por ejemplo, SDS-PAGE, enfoque isoeléctrico (IEF), electroforesis capilar) o cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico o HPLC de fase inversa).

Un ácido nucleico "aislado" se refiere a una molécula de ácido nucleico que se ha separado de un componente de su entorno natural. Un ácido nucleico aislado incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que contienen habitualmente la molécula de ácido nucleico, pero la molécula de ácido nucleico está presente de forma extracromosómica o en una localización cromosómica que es diferente de su localización cromosómica natural.

El término un "polipéptido de fusión" denota exactamente un polipéptido de fusión como se define y excluye la presencia de un polipéptido de fusión adicional como se define. El término "uno" denota "exactamente uno" o "único".

"Unido funcionalmente" se refiere a una yuxtaposición de dos o más componentes, en la que los componentes así descritos están en una relación que les permite funcionar de su manera pretendida. Por ejemplo, un promotor y/o potenciador se unen funcionalmente a una secuencia codificante, si este actúa en cis para controlar o modular la transcripción de la secuencia unida. En general, pero no necesariamente, las secuencias de ADN que se "unen funcionalmente" son contiguas y, si fuera necesario para unir dos regiones codificantes de proteínas tales como un líder secretor y un polipéptido, contiguas y en marco (de lectura). Sin embargo, aunque un promotor unido funcionalmente se localiza en general en dirección 5' de la secuencia codificante, no es necesariamente contiguo con ella. Los potenciadores no tienen que ser contiguos. Un potenciador se enlaza funcionalmente a una secuencia codificante si el potenciador aumenta la transcripción de la secuencia codificante. Los potenciadores unidos funcionalmente se pueden localizar en dirección 5', dentro o en dirección 3' de las secuencias codificantes y a distancia considerable del promotor. Un sitio de poliadenilación se enlaza funcionalmente a una secuencia codificante si se localiza en el extremo en dirección 3' de la secuencia codificante de manera que la transcripción avanza a través de la secuencia codificante hacia la secuencia de poliadenilación. Un codón finalizador de la traducción se enlaza funcionalmente a una secuencia de ácido nucleico exónico si se localiza en el extremo en dirección 3' (extremo 3') de la secuencia codificante de manera que la traducción avanza a través de la secuencia codificante hasta el codón finalizador y allí termina. El enlace se logra mediante procedimientos recombinantes conocidos en la técnica, por ejemplo, usando metodología de PCR y/o mediante ligación en sitios de restricción convenientes. Si no existen sitios de restricción convenientes, entonces se usan los adaptadores o enlazadores oligonucleotídicos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional.

El término "prospecto" se usa para hacer referencia a las instrucciones incluidas habitualmente en envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosis, administración, tratamiento de combinación, contraindicaciones y/o advertencias sobre el uso de dichos productos terapéuticos.

El término "enlazador peptídico" denota secuencias de aminoácidos de origen natural y/o sintético. Consisten en una cadena de aminoácidos lineal en la que los 20 aminoácidos naturales son los componentes básicos monoméricos. El enlazador peptídico tiene una longitud de desde 1 a 50 aminoácidos, en un modo de realización entre 1 y 28 aminoácidos, en un modo de realización adicional entre 2 y 25 aminoácidos. El enlazador peptídico puede

contener secuencias de aminoácidos repetitivas o secuencias de polipéptidos naturales. El enlazador tiene la función de garantizar que polipéptidos conjugados entre sí puedan realizar su actividad biológica permitiendo que los polipéptidos se plieguen correctamente y que se presenten apropiadamente. En un modo de realización, el enlazador peptídico es rico en residuos de glicina, glutamina y/o serina. Estos residuos se disponen, por ejemplo, en pequeñas unidades repetitivas de hasta cinco aminoácidos, tales como GS (SEQ ID NO: 12), GGS (SEQ ID NO: 13), GGGS (SEQ ID NO: 14) y GGGGS (SEQ ID NO: 19). Esta pequeña unidad repetitiva se puede repetir de una a cinco veces. En los extremos amínico y/o carboxílico de la unidad multimérica se pueden añadir hasta seis aminoácidos naturales arbitrarios adicionales. Otros enlazadores peptídicos sintéticos se componen de un único aminoácido, que se repite entre 10 a 20 veces y puede comprender en el extremo amínico y/o carboxílico hasta seis aminoácidos naturales arbitrarios adicionales. Todos los enlazadores peptídicos se pueden codificar por una molécula de ácido nucleico y, por lo tanto, se pueden expresar de forma recombinante. Como los enlazadores son en sí mismos péptidos, el polipéptido conectado por el enlazador se conecta al enlazador a través de un enlace peptídico que se forma entre dos aminoácidos.

El término "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que está en tal forma que permite que la actividad biológica de un principio activo contenido en la misma sea eficaz, y que no contiene componentes adicionales que son inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se administraría la formulación.

Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente de una formulación farmacéutica, distinto de un principio activo, que no es tóxico para un sujeto. Un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye, pero no se limita a, un tampón, un excipiente, un estabilizante o un conservante.

El término "polipéptido" es un polímero que consiste en aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, ya sean producidos natural o sintéticamente. Los polipéptidos de menos de aproximadamente 25 residuos de aminoácidos se pueden denominar "péptidos", mientras que las moléculas que consisten en dos o más polipéptidos o que comprenden un polipéptido de más de 100 residuos de aminoácidos se pueden denominar "proteínas". Un polipéptido también puede comprender componentes no aminoácidos, tales como grupos de carbohidratos, iones metálicos o ésteres de ácido carboxílico. Los componentes no aminoácidos se pueden añadir por la célula en la que se expresa el polipéptido, y pueden variar con el tipo de célula. Los polipéptidos se definen en el presente documento en términos de la estructura de su esqueleto de aminoácidos o del ácido nucleico que codifica los mismos. Las adiciones tales como grupos de carbohidratos, en general, no se especifican, pero no obstante, pueden estar presentes.

Un "gen estructural" denota la región de un gen sin una secuencia señal, es decir, la región codificante.

El término "péptido que provoca respuesta de linfocitos T" denota un péptido que se presenta en el surco de unión a péptido de un complejo de MHC de clase I y que se reconoce por los linfocitos T efectores o de memoria en circulación. El reconocimiento del péptido da como resultado una respuesta inmunitaria que efectúa la eliminación de la célula que presenta dicho complejo de péptido-MHC de clase I.

Como se usa en el presente documento, "tratamiento" (y las variaciones gramaticales del mismo tales como "tratar" o "que trata") se refiere a la intervención clínica en un intento por alterar la evolución natural del individuo que se está tratando, y que se puede realizar ya sea como profilaxis o durante la evolución de una patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, pero no se limitan a, prevención de la aparición o recidiva de la enfermedad, alivio de los síntomas, disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevención de la metástasis, disminución de la tasa de progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado de la enfermedad, y remisión o mejora del pronóstico. En algunos modos de realización, los anticuerpos de la invención se usan para retrasar el desarrollo de una enfermedad o para ralentizar la progresión de una enfermedad.

El término "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena pesada o ligera del anticuerpo que participa en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y de la cadena ligera (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo natural, en general, tienen estructuras similares, comprendiendo cada dominio cuatro regiones estructurales (FR) conservadas y tres regiones hipervariables (HVR). (Véase, por ejemplo, Kindt, T.J., *et al.*, Kubly Immunology, 6.^a ed., W.H. Freeman and Co., N.Y. (2007), página 91). Un único dominio VH o VL puede ser suficiente para conferir especificidad de unión a antígeno. Además, los anticuerpos que se unen a un antígeno particular se pueden aislar usando un dominio VH o VL de un anticuerpo que se une al antígeno para cribar una colección de dominios VL o VH complementarios, respectivamente. Véase, por ejemplo, Portolano, S., *et al.*, J. Immunol. 150 (1993) 880-887; Clackson, T., *et al.*, Nature 352 (1991) 624-628).

El término "vector", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede propagar otro ácido nucleico al que está unido. El término incluye el vector como una estructura de ácido nucleico autorreplicante, así como el vector incorporado en el genoma de una célula huésped en la que se ha introducido. Determinados vectores pueden dirigir la expresión de los ácidos nucleicos a los que se enlazan funcionalmente. Dichos vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión".

II. Composiciones y procedimientos

A. Complejos ejemplares

5 En el presente documento se informa de un complejo de unión a antígeno que comprende, como primera parte, una parte derivada de anticuerpo que se une específicamente a un antígeno diana, y como segunda parte, un péptido derivado de virus unido a un complejo de proteína MHC de clase I.

10 Con el complejo como se informa en el presente documento, los linfocitos T citotóxicos en circulación específicos de virus existentes (linfocitos T de memoria y/o linfocitos T efectoras) de un individuo se pueden dirigir a células que expresan el antígeno diana, al cual se une específicamente la parte derivada de anticuerpo del complejo, revistiendo estas células con complejos de MHC de clase I que imitan una infección vírica aguda.

15 En un aspecto, la invención se basa, en parte, en el hallazgo de que un complejo como se informa en el presente documento, que comprende como primera parte un péptido derivado de virus unido a una proteína MHC de clase I y como segunda parte una molécula unida por disulfuro derivada de anticuerpo, se puede usar para dirigir los linfocitos T citotóxicos específicos de virus existentes de un individuo a células que expresan un antígeno diana que imitan una infección vírica aguda y de ese modo se puede iniciar la eliminación de las células que expresan el antígeno diana.

20 En determinados modos de realización, se proporciona un complejo que comprende un polipéptido de fusión que comprende (i) un péptido derivado de virus, (ii) el alelo A*0201 de HLA-A soluble, y (iii) microglobulina β_2 .

25 Los complejos de la invención son útiles, por ejemplo, para el diagnóstico o tratamiento de diversas enfermedades, como cáncer o infecciones víricas.

30 En el presente documento se divulgan polipéptidos de fusión que se unen (i) a un antígeno de superficie celular y (ii) a linfocitos T citotóxicos. En determinados modos de realización, el polipéptido de fusión se une al antígeno de superficie celular con una afinidad de ≤ 10 nM.

35 Los complejos como se informa en el presente documento aprovechan una respuesta inmunitaria antivírica altamente eficaz natural para eliminar/desintegrar células diana, por ejemplo, células tumorales o células infectadas por virus. La eliminación de células se consigue mediante el uso de los propios linfocitos T en circulación muy poderosos de un individuo que no necesitan ninguna coestimulación para su activación. Adicionalmente, se necesita una pequeña cantidad de moléculas terapéuticas en la superficie celular para el mecanismo de acción (Mottez *et al.*, 1995).

40 Durante el tratamiento, el polipéptido de fusión puede desencadenar la respuesta inmunitaria antivírica del individuo de forma similar a una inmunización y de ese modo potenciar la eficacia con múltiples tratamientos/aplicaciones.

45 Aunque solamente una población de pacientes limitada tiene un alotipo específico (alotipo HLA-A: de un 30 % a un 50 % de la población con alelo A*0201) y la prevalencia de infecciones víricas específicas también es limitada (infección por CMV de un 60 % a un 90 % principalmente dependiendo de la edad), se puede usar una inmunización como pretratamiento con el fin de potenciar la eficacia.

50 De forma alternativa, se puede usar un alotipo cuya frecuencia dentro de la población sea muy baja, en un modo de realización, por debajo de un 1 %. El uso de dicho alotipo puede hacer obsoleto el uso de una etapa de inmunización ya que el sistema inmunitario del individuo reconocerá que el alotipo es extraño y se iniciará una respuesta inmunitaria.

55 El anticuerpo diana debe ser altamente específico a célula o antígeno para limitar la toxicidad y los efectos secundarios.

Por lo tanto, al usar un complejo como se informa en el presente documento

- 55 (i) solamente se activa una población de linfocitos T altamente específica (células efectoras/de memoria positivas para CD8 específicas para un único complejo de MHC-péptido), todas las demás células CD3⁺ no se ven afectadas (linfocitos T CD4⁺: TH1, TH2, TH17, linfocitos T reguladores);
- 60 (ii) se imita la respuesta natural del sistema inmunitario del individuo (eliminación normal de las células infectadas por el virus); y
- 65 (iii) la respuesta a la aplicación será baja al principio pero se puede incrementar durante el tratamiento (los linfocitos T específicos se activarán y se expandirán en número), con lo que inicialmente se pueden reducir las reacciones a la infusión y la liberación inicial de citocinas.

En un modo de realización, el procedimiento comprende la etapa de estimular linfocitos T citotóxicos positivos para CD8 mediante la aplicación de un péptido derivado de virus seleccionado, por ejemplo, un péptido derivado de citomegalovirus humano (HCMV).

- 5 Se ha demostrado que los linfocitos T específicos de péptido de CMV activados podrían mediar la eliminación eficaz de células tumorales *in vitro* (células tumorales cargadas con el péptido derivado de CMV *in vitro*).

- 10 Las células infectadas por virus presentan péptidos derivados de virus con proteínas de MHC de clase I en su superficie celular. Estos se reconocen por linfocitos T CD8⁺ específicos que eliminan/agotan las células presentadoras. Los linfocitos T CD8⁺ (CTL) citolíticos (citotóxicos) reconocen los péptidos en las proteínas de MHC de clase I por su receptor de linfocitos T específico. Los CTL desencadenan la eliminación de células infectadas por virus sin la necesidad de una señal de coestimulación.

- 15 Se pueden usar células efectoras, por ejemplo, células mononucleares de sangre periférica (PBMC) o linfocitos T CD8⁺ ordenados por FACS, que se pueden preestimar con el péptido derivado de CMV como comprende el polipéptido de fusión como se informa en el presente documento.

El alotipo HLA de un individuo que se va a tratar tiene que reconocerse.

- 20 De acuerdo con NCBI, los alotipos HLA con una frecuencia de un 10 % o más se distribuyen como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla.

Alotipo HLA	Frecuencia australiana	Frecuencia europea	Frecuencia de América del Norte	Frecuencia del sudeste asiático
HLA-	[%]	[%]	[%]	[%]
A*01:01		16,4		
A*02:01	12,7	27,2	19,7	
A*02:04				
A*03:01		14,1		
A*11:01	13,5			20,4
A*24:02	25,9		37,7	29,9
A*31:01:02				
A*34:01:01	40,1			
B*07:02		13,9		
B*08:01		11,8		
B*13:01	23,8			
B*15:04				11,7
B*15:21	10,6			
B*44:02		10,6		
B*56:01	16,1			
B*56:02	10,3			
C*01:02	24,6			13,3
C*02:02			12,7	
C*03:03				
C*03:04			20,4	17,3
C*04:01	26,0	10,1	15,0	
C*04:03	13,9			

C*05:01		10,6		
C*06:02				
C*07:01		17,0		
C*07:02		15,9	10,2	18,9
C*08:01				12,8
C*15:02	16,5			

Por lo tanto, un aspecto como se informa en el presente documento es un complejo de unión a antígeno, caracterizado por que comprende

- 5 - un único polipéptido de fusión que comprende en dirección de extremo N a C ya sea
- (i) una microglobulina β_2 , y
- 10 (ii) los dominios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de menos de un 10 %,
- o
- (i) un péptido que provoca respuesta de linfocitos T,
- 15 (ii) una microglobulina β_2 , y
- (iii) los dominios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de un 10 % o más,
- 20 y
- dos cadenas polipeptídicas, que se unen mediante uno o más enlaces disulfuro, en el que la primera cadena polipeptídica unida por disulfuro comprende en dirección de extremo N a C
- 25 (i) un dominio variable de la cadena ligera o pesada de inmunoglobulina,
- (ii) un dominio constante de la cadena ligera o pesada de inmunoglobulina, y
- 30 (iii) un polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo,
- en el que el dominio variable de la cadena ligera o pesada, ya sea solo o en combinación con el dominio variable de la cadena pesada o ligera complementario respectivo, se une específicamente a un antígeno,
- 35 y la segunda cadena polipeptídica unida por disulfuro comprende un polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo,
- en el que el polipéptido de fusión
- 40 - se une covalentemente ya sea al extremo C o al extremo N de una de las cadenas polipeptídicas unidas por disulfuro, o
- se une covalentemente al extremo N de un dominio variable de anticuerpo que es el dominio variable de la cadena pesada o ligera complementario al comprendido en la primera cadena polipeptídica unida por disulfuro, o
- 45 - se une covalentemente al extremo C de un dominio constante de anticuerpo que es el dominio constante de la cadena pesada o ligera complementario al comprendido en la primera cadena polipeptídica unida por disulfuro.

50 En un modo de realización, el polipéptido de fusión que comprende en dirección de extremo N a C una microglobulina β_2 y los dominios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de menos de un 1 % comprende adicionalmente en su extremo N un péptido que se une al surco de unión a péptido de MHC. En un modo de realización, el péptido es un péptido que provoca respuesta de linfocitos T.

55 En un modo de realización, el complejo se caracteriza por que comprende

- un polipéptido de fusión que comprende en dirección de extremo N a C ya sea

(i) una microglobulina β_2 , y

(ii) los dominios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de menos de un 10 %,

o

(i) un péptido que provoca respuesta de linfocitos T,

(ii) una microglobulina β_2 , y

(iii) los dominios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de un 10 % o más,

y

- dos cadenas polipeptídicas, que se unen mediante uno o más enlaces disulfuro, en el que la primera cadena polipeptídica unida por disulfuro comprende en dirección de extremo N a C

(i) un dominio variable de la cadena ligera o pesada de inmunoglobulina,

(ii) un dominio constante de la cadena ligera o pesada de inmunoglobulina, y

(iii) un polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo,

en el que el dominio variable de la cadena ligera o pesada, ya sea solo o en combinación con el dominio variable de la cadena pesada o ligera complementario respectivo, se une específicamente a un antígeno,

y la segunda cadena polipeptídica unida por disulfuro comprende un polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo,

en el que el polipéptido de fusión

- se une covalentemente ya sea al extremo C o al extremo N de una de las cadenas polipeptídicas unidas por disulfuro, o

- se une covalentemente al extremo N de un dominio variable de anticuerpo que es el dominio variable de la cadena pesada o ligera complementario al comprendido en la primera cadena polipeptídica unida por disulfuro, o

- se une covalentemente al extremo C de un dominio constante de anticuerpo que es el dominio constante de la cadena pesada o ligera complementario al comprendido en la primera cadena polipeptídica unida por disulfuro.

En un modo de realización, el complejo se caracteriza por que comprende

- un polipéptido de fusión que comprende en dirección de extremo N a C

(i) un péptido que provoca respuesta de linfocitos T,

(ii) una microglobulina β_2 , y

(iii) los dominios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de un 10 % o más,

y

- dos cadenas polipeptídicas, que se unen mediante uno o más enlaces disulfuro, en el que la primera cadena polipeptídica unida por disulfuro comprende en dirección de extremo N a C

(i) un dominio variable de la cadena ligera de inmunoglobulina (VL) y un dominio constante seleccionado del dominio constante de la cadena ligera de inmunoglobulina (CL) y el primer

dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina (CH1),

o

5 un dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (VH) y un dominio constante seleccionado del primer dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina (CH1) y el dominio constante de la cadena ligera de inmunoglobulina (CL), y

10 (ii) un polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo,
en el que el dominio variable de la cadena ligera o pesada, ya sea solo o en combinación con el dominio variable de la cadena pesada o ligera complementario respectivo, se une específicamente a un antígeno,

15 y la segunda cadena polipeptídica unida por disulfuro comprende un polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo,

en el que el polipéptido de fusión

- 20 - se une covalentemente ya sea al extremo C o al extremo N de una de las cadenas polipeptídicas unidas por disulfuro, o
- se une covalentemente al extremo N de un dominio variable de anticuerpo que es el dominio variable de la cadena pesada o ligera complementario al comprendido en la primera cadena polipeptídica unida por disulfuro, o
- 25 - se une covalentemente al extremo C de un dominio constante de anticuerpo que es el dominio constante de la cadena pesada o ligera complementario al comprendido en la primera cadena polipeptídica unida por disulfuro.

30

En un modo de realización, el complejo se caracteriza por que comprende

- un polipéptido de fusión que comprende en dirección de extremo N a C
- 35 (i) un péptido que provoca respuesta de linfocitos T,
- (ii) una microglobulina β_2 , y
- (iii) los dominios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia
- 40 relativa de un 10 % o más,

y

- 45 - dos cadenas polipeptídicas, que se unen mediante uno o más enlaces disulfuro, en el que la primera cadena polipeptídica unida por disulfuro comprende en dirección de extremo N a C

(i) un dominio variable de la cadena ligera de inmunoglobulina (VL) y un dominio constante seleccionado del dominio constante de la cadena ligera de inmunoglobulina (CL) y el primer dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina (CH1),

50

o

55 un dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (VH) y un dominio constante seleccionado del primer dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina (CH1) y el dominio constante de la cadena ligera de inmunoglobulina (CL), y

(ii) un polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo, y

60 (iii) un segundo (CH2) y un tercer (CH3) dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina,

en el que el dominio variable de la cadena ligera o pesada, ya sea solo o en combinación con el dominio variable de la cadena pesada o ligera complementario respectivo, se une específicamente a un antígeno,

65 y la segunda cadena polipeptídica unida por disulfuro comprende un polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo,

en el que el polipéptido de fusión

- 5
- se une covalentemente ya sea al extremo C o al extremo N de una de las cadenas polipeptídicas unidas por disulfuro, o
 - se une covalentemente al extremo N de un dominio variable de anticuerpo que es el dominio variable de la cadena pesada o ligera complementario al comprendido en la primera cadena polipeptídica unida por disulfuro, o
- 10
- se une covalentemente al extremo C de un dominio constante de anticuerpo que es el dominio constante de la cadena pesada o ligera complementario al comprendido en la primera cadena polipeptídica unida por disulfuro.
- 15
- En un modo de realización, el complejo se caracteriza por que comprende
- un polipéptido de fusión que comprende en dirección de extremo N a C
 - (i) un péptido que provoca respuesta de linfocitos T,
 - (ii) una microglobulina β_2 , y
 - (iii) los dominios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de un 10 % o más,
- 20
- 25
- y
- dos cadenas polipeptídicas, que se unen mediante uno o más enlaces disulfuro, en el que la primera cadena polipeptídica unida por disulfuro comprende en dirección de extremo N a C
 - (i) un dominio variable de la cadena ligera de inmunoglobulina (VL) y un dominio constante seleccionado del dominio constante de la cadena ligera de inmunoglobulina (CL) y el primer dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina (CH1),
- 30
- 35
- o
- un dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (VH) y un dominio constante seleccionado del primer dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina (CH1) y el dominio constante de la cadena ligera de inmunoglobulina (CL), y
- 40
- (ii) un polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo, y
 - (iii) un segundo (CH2) y un tercer (CH3) dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina,
- 45
- en el que el dominio variable de la cadena ligera o pesada, ya sea solo o en combinación con el dominio variable de la cadena pesada o ligera complementario respectivo, se une específicamente a un antígeno,
- 50
- y la segunda cadena polipeptídica unida por disulfuro comprende en dirección de extremo N a C un polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo, una segunda región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina (CH2) y una tercera región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina (CH3),

en el que el polipéptido de fusión

- 55
- se une covalentemente ya sea al extremo C o al extremo N de una de las cadenas polipeptídicas unidas por disulfuro, o
 - se une covalentemente al extremo N de un dominio variable de anticuerpo que es el dominio variable de la cadena pesada o ligera complementario al comprendido en la primera cadena polipeptídica unida por disulfuro, o
 - se une covalentemente al extremo C de un dominio constante de anticuerpo que es el dominio constante de la cadena pesada o ligera complementario al comprendido en la primera cadena polipeptídica unida por disulfuro.
- 60
- 65

En un modo de realización, el complejo se caracteriza por que comprende

- un polipéptido de fusión que comprende en dirección de extremo N a C

- (i) un péptido que provoca respuesta de linfocitos T,
- (ii) una microglobulina β_2 , y
- (iii) los dominios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de un 10 % o más,

y

- dos cadenas polipeptídicas, que se unen mediante uno o más enlaces disulfuro, en el que la primera cadena polipeptídica unida por disulfuro comprende en dirección de extremo N a C

- (i) un dominio variable de la cadena ligera de inmunoglobulina (VL) y un dominio constante seleccionado del dominio constante de la cadena ligera de inmunoglobulina (CL) y el primer dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina (CH1),

o

un dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (VH) y un dominio constante seleccionado del primer dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina (CH1) y el dominio constante de la cadena ligera de inmunoglobulina (CL), y

- (ii) un polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo, y
- (iii) un segundo (CH2) y un tercer (CH3) dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina, en el que el dominio variable de la cadena ligera o pesada, ya sea solo o en combinación con el dominio variable de la cadena pesada o ligera complementario respectivo, se une específicamente a un antígeno,

y la segunda cadena polipeptídica unida por disulfuro comprende en dirección de extremo N a C

- (i) un dominio variable de la cadena ligera de inmunoglobulina (VL) y un dominio constante seleccionado del dominio constante de la cadena ligera de inmunoglobulina (CL) y el primer dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina (CH1),

o

un dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (VH) y un dominio constante seleccionado del primer dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina (CH1) y el dominio constante de la cadena ligera de inmunoglobulina (CL),

- (ii) un polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo, y
- (iii) una segunda región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina (CH2) y una tercera región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina (CH3),

en el que el polipéptido de fusión

- se une covalentemente ya sea al extremo C o al extremo N de una de las cadenas polipeptídicas unidas por disulfuro, o
- se une covalentemente al extremo N de un dominio variable de anticuerpo que es el dominio variable de la cadena pesada o ligera complementario al comprendido en la primera cadena polipeptídica unida por disulfuro, o
- se une covalentemente al extremo C de un dominio constante de anticuerpo que es el dominio constante de la cadena pesada o ligera complementario al comprendido en la primera cadena polipeptídica unida por disulfuro.

En un modo de realización, el complejo se caracteriza por que comprende

- un polipéptido de fusión que comprende en dirección de extremo N a C
 - (i) un péptido que provoca respuesta de linfocitos T,
 - 5 (ii) una microglobulina β_2 , y
 - (iii) los dominios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de un 10 % o más,
- 10 - dos cadenas polipeptídicas, que se unen mediante uno o más enlaces disulfuro,

en el que la primera cadena polipeptídica unida por disulfuro comprende en dirección de extremo N a C

 - 15 (i) un dominio variable de la cadena ligera de inmunoglobulina (VL) y un dominio constante seleccionado del dominio constante de la cadena ligera de inmunoglobulina (CL) y el primer dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina (CH1),
 - o
 - 20 un dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (VH) y un dominio constante seleccionado del primer dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina (CH1) y el dominio constante de la cadena ligera de inmunoglobulina (CL), y
 - (ii) un polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo, y
 - 25 (iii) un segundo (CH2) y un tercer (CH3) dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina,

en el que el dominio variable de la cadena ligera o pesada, ya sea solo o en combinación con el dominio variable de la cadena pesada o ligera complementario respectivo, se une específicamente a un

- 30 antígeno,

y la segunda cadena polipeptídica unida por disulfuro comprende en dirección de extremo N a C

 - 35 (i) un dominio variable de la cadena ligera de inmunoglobulina (VL) y un dominio constante seleccionado del dominio constante de la cadena ligera de inmunoglobulina (CL) y el primer dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina (CH1),
 - o
 - 40 un dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (VH) y un dominio constante seleccionado del primer dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina (CH1) y el dominio constante de la cadena ligera de inmunoglobulina (CL),
 - (ii) un polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo, y
 - 45 (iii) una segunda región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina (CH2) y una tercera región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina (CH3),- 50 - una cadena polipeptídica que comprende en dirección de extremo N a C un dominio variable de inmunoglobulina complementario al dominio variable en la primera cadena polipeptídica unida por disulfuro y un dominio constante complementario al dominio constante que sigue al dominio variable en la primera cadena polipeptídica unida por disulfuro,

en el que el polipéptido de fusión

- 55 - se une covalentemente ya sea al extremo C o al extremo N de una de las cadenas polipeptídicas unidas por disulfuro, o
- se une covalentemente al extremo N de un dominio variable de anticuerpo que es el dominio variable de la cadena pesada o ligera complementario al comprendido en la primera cadena polipeptídica unida por disulfuro, o
- 60 - se une covalentemente al extremo C de un dominio constante de anticuerpo que es el dominio constante de la cadena pesada o ligera complementario al comprendido en la primera cadena polipeptídica unida por disulfuro.
- 65

En un modo de realización, el complejo se caracteriza por que comprende

- un polipéptido de fusión que comprende en dirección de extremo N a C

(i) un péptido que provoca respuesta de linfocitos T,

(ii) una microglobulina β_2 ,

(iii) los dominios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de un 10 % o más,

(iv) un polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo,

(v) un segundo (CH2) y un tercer (CH3) dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina,

y

- una primera cadena polipeptídica que comprende en dirección de extremo N a C

(i) un dominio variable de la cadena ligera de inmunoglobulina (VL) y un dominio constante seleccionado del dominio constante de la cadena ligera de inmunoglobulina (CL) y el primer dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina (CH1),

o

un dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (VH) y un dominio constante seleccionado del primer dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina (CH1) y el dominio constante de la cadena ligera de inmunoglobulina (CL), y

(ii) un polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo, y

(iii) un segundo (CH2) y un tercer (CH3) dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina,

y

- una segunda cadena polipeptídica que comprende en dirección de extremo N a C un dominio variable de inmunoglobulina complementario al dominio variable en la primera cadena polipeptídica y un dominio constante complementario al dominio constante en la primera cadena polipeptídica,

en el que el dominio variable de la cadena ligera o pesada, ya sea solo o en combinación con el dominio variable de la cadena pesada o ligera complementario respectivo se une específicamente a un antígeno, y

en el que el polipéptido de fusión y la primera cadena polipeptídica se unen mediante disulfuro.

En un modo de realización, el complejo se caracteriza por que comprende

- un polipéptido de fusión que comprende en dirección de extremo N a C

(i) un péptido que provoca respuesta de linfocitos T,

(ii) una microglobulina β_2 ,

(iii) los dominios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de un 10 % o más,

(iv) un dominio variable de la cadena ligera de inmunoglobulina (VL) y un dominio constante seleccionado del dominio constante de la cadena ligera de inmunoglobulina (CL) y el primer dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina (CH1),

o

un dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (VH) y un dominio constante seleccionado del primer dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina (CH1) y el dominio constante de la cadena ligera de inmunoglobulina (CL),

(v) un polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo,

(vi) un segundo (CH2) y un tercer (CH3) dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina,

y

- una primera cadena polipeptídica que comprende en dirección de extremo N a C

(i) un polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo, y

(ii) un segundo (CH2) y un tercer (CH3) dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina,

y

- una segunda cadena polipeptídica que comprende en dirección de extremo N a C un dominio variable de inmunoglobulina complementario al dominio variable en la primera cadena polipeptídica y un dominio constante complementario al dominio constante en la primera cadena polipeptídica,

en el que el dominio variable de la cadena ligera o pesada, ya sea solo o en combinación con el dominio variable de la cadena pesada o ligera complementario respectivo se une específicamente a un antígeno, y

en el que el polipéptido de fusión y la primera cadena polipeptídica se unen mediante disulfuro.

En un modo de realización, el complejo se caracteriza por que comprende

- un polipéptido de fusión que comprende en dirección de extremo N a C

(i) un péptido que provoca respuesta de linfocitos T,

(ii) una microglobulina β_2 ,

(iii) los dominios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de un 10 % o más, y

(iv) un dominio variable de la cadena ligera de inmunoglobulina (VL) y un dominio constante seleccionado del dominio constante de la cadena ligera de inmunoglobulina (CL) y el primer dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina (CH1),

o

un dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (VH) y un dominio constante seleccionado del primer dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina (CH1) y el dominio constante de la cadena ligera de inmunoglobulina (CL),

y

- una primera cadena polipeptídica que comprende en dirección de extremo N a C

(i) un dominio variable de inmunoglobulina complementario al dominio variable en el polipéptido de fusión y un dominio constante complementario al dominio constante en el polipéptido de fusión,

(ii) un polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo, y

(iii) un segundo (CH2) y un tercer (CH3) dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina,

en el que el dominio variable de la cadena ligera o pesada, ya sea solo o en combinación con el dominio variable de la cadena pesada o ligera complementario respectivo se une específicamente a un antígeno, y

en el que el polipéptido de fusión y la primera cadena polipeptídica se unen mediante disulfuro.

En un modo de realización, el complejo se caracteriza por que comprende

- un polipéptido de fusión que comprende en dirección de extremo N a C

(i) un péptido que provoca respuesta de linfocitos T,

(ii) una microglobulina β_2 ,

- (iii) los dominios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de un 10 % o más,
- 5 (iv) un dominio variable de la cadena ligera de inmunoglobulina (VL) y un dominio constante seleccionado del dominio constante de la cadena ligera de inmunoglobulina (CL) y el primer dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina (CH1),
- 10 o
- un dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (VH) y un dominio constante seleccionado del primer dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina (CH1) y el dominio constante de la cadena ligera de inmunoglobulina (CL),
- 15 (v) un polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo,
- (vi) un segundo (CH2) y un tercer (CH3) dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina,
- 20 y
- una primera cadena polipeptídica que comprende en dirección de extremo N a C
- (i) un dominio variable de la cadena ligera de inmunoglobulina (VL) y un dominio constante seleccionado del dominio constante de la cadena ligera de inmunoglobulina (CL) y el primer dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina (CH1),
- 25 o
- un dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (VH) y un dominio constante seleccionado del primer dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina (CH1) y el dominio constante de la cadena ligera de inmunoglobulina (CL),
- 30 (ii) un polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo, y
- 35 (iii) un segundo (CH2) y un tercer (CH3) dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina,
- y
- una segunda cadena polipeptídica que comprende en dirección de extremo N a C un dominio variable de inmunoglobulina complementario al dominio variable en la cadena polipeptídica de fusión y un dominio constante complementario al dominio constante en la cadena polipeptídica de fusión,
- 40 y
- 45 - una tercera cadena polipeptídica que comprende en dirección de extremo N a C un dominio variable de inmunoglobulina complementario al dominio variable en la primera cadena polipeptídica y un dominio constante complementario al dominio constante en la primera cadena polipeptídica,
- 50 en el que el dominio variable de la cadena ligera o pesada del polipéptido de fusión y/o de la primera cadena polipeptídica, ya sea solo o en combinación con el dominio variable de la cadena pesada o ligera complementario respectivo se une específicamente a un antígeno, y
- en el que el polipéptido de fusión y la primera cadena polipeptídica se unen mediante disulfuro.
- 55 En un modo de realización, el complejo se caracteriza por que comprende
- un polipéptido de fusión que comprende en dirección de extremo N a C
- 60 (i) un péptido que provoca respuesta de linfocitos T,
- (ii) una microglobulina β_2 ,
- (iii) los dominios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de una molécula de MHC clase I con una frecuencia relativa de un 10 % o más, y
- 65

- (iv) un dominio variable de la cadena ligera de inmunoglobulina (VL) y un dominio constante seleccionado del dominio constante de la cadena ligera de inmunoglobulina (CL) y el primer dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina (CH1),

5 o

un dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (VH) y un dominio constante seleccionado del primer dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina (CH1) y el dominio constante de la cadena ligera de inmunoglobulina (CL),

10 y

- una primera cadena polipeptídica que comprende en dirección de extremo N a C

15 (i) un dominio variable de inmunoglobulina complementario al dominio variable en el polipéptido de fusión y un dominio constante complementario al dominio constante en el polipéptido de fusión,

(ii) un polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo, y

20 (iii) un segundo (CH2) y un tercer (CH3) dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina,

y

- una segunda cadena polipeptídica que comprende en dirección de extremo N a C

25 (i) un dominio variable de la cadena ligera de inmunoglobulina (VL) y un dominio constante seleccionado del dominio constante de la cadena ligera de inmunoglobulina (CL) y el primer dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina (CH1),

30 o

un dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (VH) y un dominio constante seleccionado del primer dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina (CH1) y el dominio constante de la cadena ligera de inmunoglobulina (CL),

35 (ii) un polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo, y

(iii) un segundo (CH2) y un tercer (CH3) dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina,

40 y

- una tercera cadena polipeptídica que comprende en dirección de extremo N a C un dominio variable de inmunoglobulina complementario al dominio variable en la segunda cadena polipeptídica y un dominio constante complementario al dominio constante en la segunda cadena polipeptídica,

45 en el que el dominio variable de la cadena ligera o pesada del polipéptido de fusión y/o de la segunda cadena polipeptídica, ya sea solo o en combinación con el dominio variable de la cadena pesada o ligera complementario respectivo se une específicamente a un antígeno, y

50 en el que la primera cadena polipeptídica y la segunda cadena polipeptídica se unen mediante disulfuro.

En un modo de realización, el péptido que provoca respuesta de linfocitos T es un péptido derivado de virus. En un modo de realización, el virus se selecciona de adenovirus, herpesvirus humano 1, herpesvirus humano 2, herpesvirus humano 4 (virus de Epstein-Barr), virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, citomegalovirus humano, virus de la inmunodeficiencia humana, papilomavirus humano de tipo 16, papilomavirus humano de tipo 18, papilomavirus humano de tipo 31, papilomavirus humano de tipo 33, papilomavirus humano de tipo 35, papilomavirus humano de tipo 39, papilomavirus humano de tipo 45, papilomavirus humano de tipo 51, papilomavirus humano de tipo 52, papilomavirus humano de tipo 56, papilomavirus humano de tipo 58, papilomavirus humano de tipo 59, papilomavirus humano de tipo 68, papilomavirus humano de tipo 73, papilomavirus humano de tipo 82, virus linfotrópico de linfocitos T humano de tipo I, virus de la gripe A humano, virus de la gripe B humano o virus de la variolovacuna.

En un modo de realización, el péptido derivado de virus se selecciona de NLVPMVATV

(SEQ ID NO: 01), SLYNTVATL (SEQ ID NO: 02), GLCTLVAML (SEQ ID NO: 03), GILGFVFTL (SEQ ID NO: 04), STNRQSGRQ (SEQ ID NO: 5), LLFGYPVYV (SEQ ID NO: 06), FAEGFVRAL (SEQ ID NO: 07), LIVIGILIL (SEQ ID NO: 08), o ILHTPGCV (SEQ ID NO: 09).

En un modo de realización, la microglobulina β_2 es microglobulina β_2 humana. En un modo de realización, la microglobulina β_2 consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.

5 En un modo de realización, la molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de un 10 % o más es HLA-A*0201 humano. En un modo de realización, los dominios extracelulares α_1 , α_2 y α_3 de una molécula de MHC de clase I consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11.

10 En un modo de realización, el péptido derivado de virus se fusiona con la microglobulina β_2 a través de un primer péptido enlazador.

En un modo de realización, la microglobulina β_2 se fusiona con el dominio extracelular α_1 de una molécula de MHC de clase I a través de un segundo péptido enlazador.

15 En un modo de realización, el dominio extracelular α_3 de una molécula de MHC de clase I se fusiona con el polipéptido (ya sea unido por disulfuro o unido no por disulfuro) a través de un tercer péptido enlazador.

En un modo de realización, el primer, segundo y tercer péptido enlazador es el mismo o diferente.

20 En un modo de realización, el primer péptido enlazador, el segundo péptido enlazador y el tercer péptido enlazador se seleccionan independientemente entre sí de las secuencias de aminoácidos

GS (SEQ ID NO: 12), GGS (SEQ ID NO: 13), GGS (SEQ ID NO: 14), GGS (SEQ ID NO: 15), GGS (SEQ ID NO: 16), GGS (SEQ ID NO: 17), GGS (SEQ ID NO: 18), GGS (SEQ ID NO: 19), GGS (SEQ ID NO: 20), GGS (SEQ ID NO: 21), GGS (SEQ ID NO: 22), y GGS (SEQ ID NO: 23).

25 En un modo de realización, el primer péptido enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21.

En un modo de realización, el segundo péptido enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22.

30 En un modo de realización, el tercer péptido enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

En un modo de realización, el polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo se selecciona de un polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo de un anticuerpo humano de la clase IgG o la clase IgE.

35 En un modo de realización, el polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo se selecciona de un polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo de un anticuerpo humano de la subclase IgG1 o IgG2 o IgG3 o IgG4.

40 En un modo de realización, el polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID

NO: 24), EPKSADKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 25), ERKCCVECPPCP (SEQ ID NO: 26), ERKCAVECPPCP (SEQ ID NO: 27), ERKACVECPPCP (SEQ ID NO: 28), ELKTPLGDTTHTCPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP)₃ (SEQ ID NO: 29), o ESKYGPPCPSCP (SEQ ID NO: 30).

En un modo de realización, el primer polipéptido unido por disulfuro y/o el segundo polipéptido unido por disulfuro comprende un dominio CH2 y/o un dominio CH3 de origen humano. En un modo de realización, el dominio CH2 y el CH3 de origen humano es de un anticuerpo humano de la clase IgG o IgE. En un modo de realización, el dominio CH2 y el dominio CH3 es de un anticuerpo humano de la subclase IgG1 o IgG2 o IgG3 o IgG4. En un modo de realización, el dominio CH2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31. En un modo de realización, el dominio CH2 es un anticuerpo humano de la subclase IgG1 o IgG2 y comprende al menos una mutación de E233, L234, L235, G236, D265, D270, N297, E318, R320, R322, A327, A330, P331 y/o P329 (numeración de acuerdo con el índice EU de Rabat). En un modo de realización, el dominio CH2 es de un anticuerpo de la subclase IgG1 humana o de la subclase IgG2 humana con las mutaciones L234A y L235A, y/o las mutaciones D265A y N297A, y/o contiene la mutación PVA236, y/o contiene la mutación P329G. En un modo de realización, el dominio CH2 es de un anticuerpo humano de la subclase IgG1 con las mutaciones L234A y L235A, y/o P329G. En un modo de realización, el dominio CH2 es de un anticuerpo humano de la subclase IgG4 con las mutaciones S228P y/o L235E. En un modo de realización, el dominio CH2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32 o SEQ ID NO: 33. En un modo de realización, el dominio CH3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34.

En un modo de realización, el primer polipéptido unido por disulfuro comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 y el segundo polipéptido unido por disulfuro comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36.

En un modo de realización, el primer y el segundo polipéptido unidos por disulfuro comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 o SEQ ID NO: 38.

En un modo de realización, el primer polipéptido unido por disulfuro o el segundo polipéptido unido por disulfuro consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 o SEQ ID NO: 38.

En un modo de realización, el primer polipéptido unido por disulfuro comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39 y el segundo polipéptido unido por disulfuro comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40.

En un modo de realización, las cadenas polipeptídicas, que se unen mediante uno o más enlaces disulfuro, se unen mediante dos, o tres, o cuatro enlaces disulfuro.

En un modo de realización, el complejo se caracteriza por que comprende

- un polipéptido de fusión que comprende en dirección de extremo N a C

- (i) un péptido derivado de virus que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 01,

- (ii) un primer péptido enlazador que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21.

- (iii) una microglobulina β_2 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10,

- (iv) un segundo péptido enlazador que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22,

- (v) los dominios extracelulares α_1 , α_2 y α_3 de una molécula de MHC de clase I que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, y

- (vi) un tercer péptido enlazador que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12,

y

- dos cadenas polipeptídicas, que se unen mediante uno o más enlaces disulfuro, en el que la primera cadena polipeptídica unida por disulfuro comprende en dirección de extremo N a C

- (i) un dominio variable de la cadena ligera o pesada de inmunoglobulina,

- (ii) un dominio constante de la cadena ligera o pesada de inmunoglobulina,

- (iii) un polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo,
- (iv) un dominio CH2 de IgG1 humana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 32 y 33, y
- (v) un dominio CH3 de IgG1 humana que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 o 36,

y la segunda cadena polipeptídica unida por disulfuro comprende en dirección de extremo N a C

- (i) un polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo,
- (ii) un dominio CH2 de IgG1 humana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 32 y 33, y
- (iii) un dominio CH3 de IgG1 humana que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36 o 35,

en el que el polipéptido de fusión

- se une covalentemente ya sea al extremo C o al extremo N de la segunda cadena polipeptídica unida por disulfuro.

En un modo de realización, el complejo se caracteriza por que comprende

- un polipéptido de fusión que comprende en dirección de extremo N a C
 - (i) un péptido derivado de virus que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 01,
 - (ii) un primer péptido enlazador que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21.
 - (iii) una microglobulina β_2 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10,
 - (iv) un segundo péptido enlazador que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22.
 - (v) los dominios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de una molécula de MHC de clase I que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, y
 - (vi) un tercer péptido enlazador que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12,

y

- dos cadenas polipeptídicas, que se unen mediante uno o más enlaces disulfuro, en el que la primera cadena polipeptídica unida por disulfuro comprende en dirección de extremo N a C

- (i) un dominio variable de la cadena ligera o pesada de inmunoglobulina,
- (ii) un dominio constante de la cadena ligera o pesada de inmunoglobulina,
- (iii) un polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo,
- (iv) un dominio CH2 de IgG1 humana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 32 y 33, y
- (v) un dominio CH3 de IgG1 humana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 35 o 36,

y la segunda cadena polipeptídica unida por disulfuro comprende un polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo,

en el que el polipéptido de fusión

- se une covalentemente ya sea al extremo C o al extremo N de la primera cadena polipeptídica unida por disulfuro, o

- se une covalentemente al extremo N de un dominio variable de anticuerpo que es el dominio variable de la cadena pesada o ligera complementario al comprendido en la primera cadena polipeptídica unida por disulfuro, o
- se une covalentemente al extremo C de un dominio constante de anticuerpo que es el dominio constante de la cadena pesada o ligera complementario al comprendido en la primera cadena polipeptídica unida por disulfuro.

En un modo de realización, el complejo se caracteriza por que comprende

- un polipéptido de fusión que comprende en dirección de extremo N a C
 - (i) un péptido derivado de virus que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 01,
 - (ii) un primer péptido enlazador que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21.
 - (iii) una microglobulina β_2 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10,
 - (iv) un segundo péptido enlazador que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22.
 - (v) los dominios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de una molécula de MHC de clase I que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, y
 - (vi) un tercer péptido enlazador que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12,
- y
- dos cadenas polipeptídicas, que se unen mediante uno o más enlaces disulfuro, en el que la primera y la segunda cadena polipeptídica unida por disulfuro comprende cada una en dirección de extremo N a C
 - (i) un dominio variable de la cadena ligera o pesada de inmunoglobulina,
 - (ii) un dominio constante de la cadena ligera o pesada de inmunoglobulina,
 - (iii) un polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo,
 - (iv) un dominio CH2 de IgG1 humana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 32 y 33, y
 - (v) un dominio CH3 de IgG1 humana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 35 y 36,

en el que el polipéptido de fusión

- se une covalentemente ya sea al extremo C o al extremo N de la segunda cadena polipeptídica unida por disulfuro, o
- se une covalentemente al extremo N de un dominio variable de anticuerpo que es el dominio variable de la cadena pesada o ligera complementario al comprendido en la primera cadena polipeptídica unida por disulfuro, o
- se une covalentemente al extremo C de un dominio constante de anticuerpo que es el dominio constante de la cadena pesada o ligera complementario al comprendido en la primera cadena polipeptídica unida por disulfuro.

De la figura 14 se puede observar que el complejo como se informa en el presente documento mantiene las propiedades de unión del anticuerpo al que se fusiona (figura 14 b) y c)).

En las figuras 15 y 17, se muestra la eficacia y especificidad *in vitro* de un complejo como se informa en el presente documento.

El ensayo de citotoxicidad se realizó en presencia de linfocitos T CDK específicos de CMV. Se puede observar que los complejos que comprenden un péptido de virus derivado de CMV inducen la lisis/eliminación/desintegración de las células diana (véase la figura 15 a) para anticuerpo monovalente, figura 15 b) para anticuerpo bivalente). Se puede observar adicionalmente que la lisis de las células diana es altamente específica ya que la incubación con

complejos que comprenden un péptido vírico derivado de VEB (figura 15 b)) y anticuerpos de control (figura 15 d) y e)) no dan como resultado una lisis celular extensa (la lisis espontánea es de aproximadamente un 3,5 %).

En la figura 17 se muestra la lisis de la línea celular H460M2 de adenocarcinoma de pulmón positivo para IGF-IR.

El valor de CE_{50} para un complejo que comprende un péptido derivado de CMV y un anticuerpo bivalente es de aproximadamente 10 ng/ml, que corresponde a aproximadamente 50 pM. El valor de CE_{50} determinado es independiente de la célula diana a la proporción de células efectoras (véase la figura 16; proporción de células diana con respecto a células efectoras de desde 1:3 a 1:1 que corresponde a una proporción eficaz de 1:0,44 a 1:0,14 (un 76 % de las células efectoras son positivas para CD8 y un 19 % son específicas de CMV)).

Por lo tanto, en un modo de realización, el complejo como se informa en el presente documento tiene un valor de CE_{50} de aproximadamente 50 pM.

1. Afinidad

En determinados modos de realización, un complejo como se proporciona en el presente documento comprende un par de unión a antígeno de dominios variables de anticuerpo. En determinados modos de realización, el dominio variable tiene una constante de disociación (K_d) de ≤ 10 nM, ≤ 1 nM, $\leq 0,1$ nM, $\leq 0,01$ nM o $\leq 0,001$ nM (por ejemplo, 10^{-8} M o menos, por ejemplo, de desde 10^{-8} M a 10^{-13} M, por ejemplo, de desde 10^{-9} M a 10^{-13} M) con respecto a su antígeno.

En un modo de realización, K_d se mide usando ensayos de resonancia de plasmón superficial.

Por ejemplo, esto se puede hacer usando un instrumento BIAcore®-2000 o un BIAcore®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C con chips CM5 de antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (UR). En resumen, los chips de biosensor de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore, Inc.) se activan con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, a 5 µg/ml (~0,2 µM) antes de la inyección a una caudal de 5 µl/minuto para conseguir aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Luego de la inyección del antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos sin reaccionar. Para mediciones cinéticas, se inyectan diluciones en serie por un factor de dos de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con tensioactivo polisorbato 20 (TWEEN-20™) (PBST) al 0,05 % a 25 °C a un caudal de aproximadamente 25 µl/min. Las tasas de asociación (kon) y las tasas de disociación (koff) se calculan usando un modelo simple de unión uno-a-uno de Langmuir (programa informático de evaluación BIAcore® versión 3.2) por ajuste de forma simultánea de los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio (K_d) se calcula como la proporción koff/kon. Véase, por ejemplo, Chen, Y., *et al.*, J. Mol. Biol. 293 (1999) 865-881.

2. Expresión

La expresión de formatos específicos del complejo como se informa en el presente documento (enlazador diferente, diferentes combinaciones de HLA y microglobulina β_2) en HEK 293 y CHO dio lugar a una acumulación del complejo, si era detectable en absoluto, dentro del retículo endoplasmático, es decir, el aislamiento y la secreción del complejo se vieron fuertemente alterados.

No se pudo detectar ninguna secreción de un complejo en el medio de cultivo cuando el complejo estaba destinado a comprender uno de los polipéptidos como se indica en las siguientes tablas.

Tabla.

Péptido señal	Péptido derivado de CMV	$G_4S(G_3S)_2$ -enlazador	Microglobulina β_2	$(G_4S)_3$ -enlazador	Cadenas $\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$	$(G_4S)_2$ -enlazador	Cadena ligera de anticuerpo
Péptido señal	Microglobulina β_2	$(G_4S)_3$ -enlazador	Cadenas $\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$	$(G_4S)_2$ -enlazador	Cadena ligera de anticuerpo	$(G_4S)_2$ -enlazador	Cadena ligera de anticuerpo
Péptido señal	Péptido derivado de CMV	$(G_3S)_2GG$ -enlazador	Cadenas $\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$	$(G_4S)_3$ -enlazador	Microglobulina β_2	$(G_4S)_2$ -enlazador	Cadena ligera de anticuerpo
Péptido señal	Péptido derivado de CMV	GGPGGG-SGGG-enlazador	Cadenas $\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$	$(G_4S)_3$ -enlazador	Cadena ligera de anticuerpo	$(G_4S)_2$ -enlazador	Cadena ligera de anticuerpo
Péptido señal	Cadenas $\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$	$(G_4S)_3$ -enlazador	Microglobulina β_2	$(G_4S)_2$ -enlazador	Cadena ligera de anticuerpo	$(G_4S)_3$ -enlazador	Cadena pesada de anticuerpo
Péptido señal	Péptido derivado de CMV	$(G_3S)_2GG$ -enlazador	Cadenas $\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$	$(G_4S)_3$ -enlazador	Cadena ligera de anticuerpo	$(G_4S)_2$ -enlazador	Cadena pesada de anticuerpo
Péptido señal	Péptido derivado de CMV	GGPGGG-SGGG-enlazador	Cadenas $\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$	$(G_4S)_3$ -enlazador	Cadena ligera de anticuerpo	$(G_4S)_2$ -enlazador	Cadena pesada de anticuerpo
Péptido señal	Péptido derivado de CMV	$(G_3S)_2GG$ -enlazador	Cadenas $\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$	$(G_4S)_3$ -enlazador	Cadena ligera de anticuerpo	$(G_4S)_2$ -enlazador	Cadena pesada de anticuerpo

Tabla.

Péptido señal	Péptido derivado de CMV	Microglobulina β_2	Cadenas $\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$	IgG-región Fc	scFv
Péptido señal	Péptido derivado de CMV	Microglobulina β_2	Cadenas $\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$	Cadena pesada de anticuerpo	

Se ha hallado que no es posible en células eucariotas la expresión, y especialmente la secreción, de complejos que comprenden dos partes de un péptido derivado de virus unido a un complejo de proteína MHC de clase I, y al menos un dominio variable y un dominio constante de un anticuerpo.

Adicionalmente, se ha hallado que no es posible en células eucariotas la expresión, y especialmente la secreción, de complejos que comprenden dos polipéptidos de fusión que comprenden un péptido derivado de virus unido a un complejo de proteína MHC de clase I, al menos un dominio variable, y un par de polipéptidos unidos por disulfuro derivados de la región bisagra.

Por lo tanto, en un complejo como se informa en el presente documento, un polipéptido de fusión que comprende un péptido derivado de virus unido a una proteína MHC de clase I no puede estar presente más de una vez y tienen que estar presentes al menos un dominio variable de anticuerpo y un dominio constante de anticuerpo con el fin de permitir la producción y la secreción del complejo que usa células eucariotas.

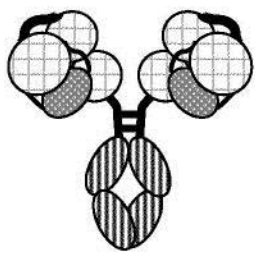
Por lo tanto, un complejo que comprende exactamente un polipéptido de fusión de un péptido derivado de virus unido a una proteína MHC de clase I, una región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo, y al menos un dominio variable de anticuerpo y un dominio constante de anticuerpo se pueden producir de manera recombinante en y secretarse de células eucariotas. En un modo de realización, el al menos un dominio constante es ya sea un dominio constante 1 de la cadena pesada de anticuerpo (CH1) o un dominio constante de la cadena ligera de anticuerpo (CL).

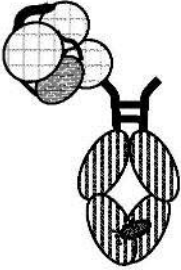
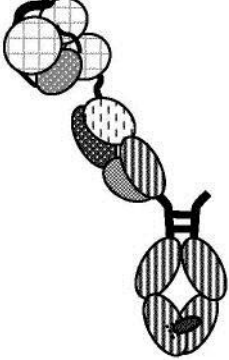
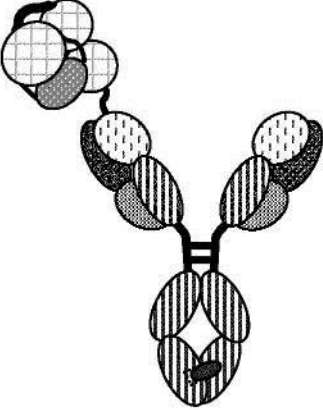
Por lo tanto, un complejo que comprende una región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo, al menos un par de dominios variables de anticuerpo, opcionalmente un dominio constante de anticuerpo, y exactamente un polipéptido de fusión de un péptido derivado de virus unido a una proteína MHC de clase I se pueden producir de manera recombinante en y secretarse de células eucariotas. En un modo de realización, el al menos un dominio constante es ya sea un dominio constante 1 de la cadena pesada de anticuerpo (CH1) o un dominio constante de la cadena ligera de anticuerpo (CL).

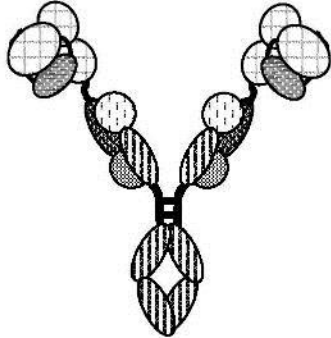
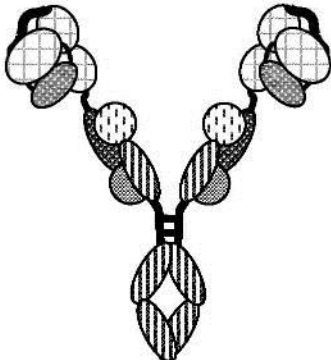
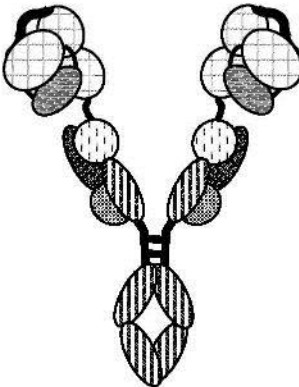
Se sometieron a prueba diversas combinaciones de diferentes polipéptidos. La expresión secretada se puede lograr mediante, por ejemplo, la fusión en el extremo N de un péptido señal derivado de inmunoglobulina en complejos en los que el péptido derivado de virus se fusiona en el extremo N con la molécula de MHC de clase I. Se puede cambiar el orden de la cadena pesada de la molécula de MHC de clase I ($\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$ que carece del dominio transmembranario y del citoplásmico) y la cadena ligera (microglobulina β_2). Los diferentes polipéptidos de fusión se fusionaron en el extremo N con o bien una cadena ligera de anticuerpo o con una región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo que comprende el polipéptido. Las combinaciones ejemplares se muestran en la figura 2.

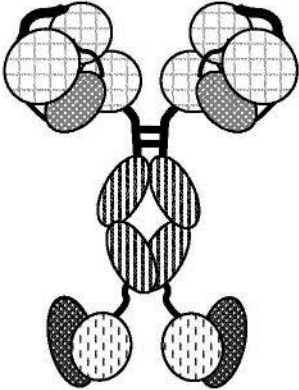
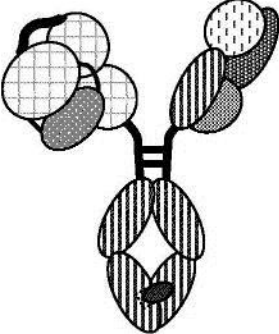
Como se puede observar a partir de la siguiente tabla, los complejos que comprenden los polipéptidos de fusión solamente se pueden expresar con polipéptidos derivados del dominio de anticuerpo variable y de la región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo cuando está presente un único polipéptido de fusión de HLA-microglobulina-péptido derivado vírico.

Tabla.

	número de polipéptidos de fusión de MHC de clase I-péptido derivado de virus	número de dominios variables	número de dominios CH1	contiene una región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo que comprende el polipéptido	nivel de expresión	carril en la figura 3
	2	0	0	sí	alto	1

	número de polipéptidos de fusión de MHC de clase I- péptido derivado de virus	número de dominios variables	número de dominios CH1	contiene una región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo que comprende el polipéptido	nivel de expresión	carril en la figura 3
	1	0	0	sí	alto	2
	1	1	1	Sí	alto	3
	1	2	2	sí	alto	4

	número de polipéptidos de fusión de MHC de clase I- péptido derivado de virus	número de dominios variables	número de dominios CH1	contiene una región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo que comprende el polipéptido	nivel de expresión	carril en la figura 3
	2	2	2	sí	sin expresión	5
	2	2	2	Sí	sin expresión	6
	2	2	2	Sí	muy bajo	7

	número de polipéptidos de fusión de MHC de clase I- péptido derivado de virus	número de dominios variables	número de dominios CH1	contiene una región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo que comprende el polipéptido	nivel de expresión	carril en la figura 3
	2	2	0	Sí	sin expresión	8
	1	1	1	sí	alto	9

En algunos modos de realización, el complejo como se informa en el presente documento comprende diferentes pares de polipéptidos. Con el fin de permitir el emparejamiento apropiado de los polipéptidos, se puede usar la tecnología de botón en ojal o la tecnología de mA b cruzados con el fin de reducir la cantidad de complejos no asociados correctamente.

La modificación del botón denota la mutación T366W en el dominio CH3 de un anticuerpo (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

La modificación del ojal denota las mutaciones T366S, L368A e Y407V en el dominio CH3 de un anticuerpo (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

Además de la modificación del botón y el ojal, puede estar presente la mutación S354C en un dominio CH3 y la mutación Y349C en el otro dominio CH3.

La tecnología de mA B cruzados se informa, por ejemplo, en los documentos WO 2009/080251, WO 2009/080252, WO 2009/080254, WO 2009/080253, WO 2010/112193, WO 2010/115589, WO 2010/136172, WO 2010/145792 y WO 2010/145793.

3. Variantes

En determinados modos de realización, se contemplan variantes de secuencia de aminoácidos del complejo proporcionado en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras

propiedades biológicas del complejo. Las variantes de secuencia de aminoácidos del complejo se pueden preparar introduciendo modificaciones apropiadas en la secuencia de nucleótidos que codifica las cadenas polipeptídicas del complejo, o mediante síntesis de péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones y/o inserciones y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos del complejo. Se puede hacer cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas, por ejemplo, unión a antígeno.

a) Variantes de sustitución, inserción y deleción

En determinados modos de realización, se proporcionan variantes del complejo que tienen una o más sustituciones de aminoácidos en las cadenas polipeptídicas. Las sustituciones conservadoras se muestran en la siguiente tabla bajo el encabezamiento de "sustituciones preferentes". Se proporcionan cambios más sustanciales en la siguiente tabla bajo el encabezamiento de "sustituciones ejemplares" y como se describe adicionalmente a continuación en referencia a las clases de la cadena lateral de los aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos se pueden introducir en un complejo de interés y los productos se pueden cribar para obtener una actividad deseada, por ejemplo, unión a antígeno conservada/mejorada, inmunogenicidad disminuida, o ADCC o CDC mejorada.

Tabla.

Residuo original	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferentes
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; norleucina	Leu

Los aminoácidos se pueden agrupar de acuerdo con las propiedades comunes de la cadena lateral:

(1) hidrófobos: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) ácidos: Asp, Glu;

(4) básicos: His, Lys, Arg;

(5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;

(6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservadoras implicarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.

Las inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones de extremo amínico y/o carboxílico que varían en longitud desde un residuo a polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intrasecuenciales de residuos de aminoácidos individuales o múltiples. Los ejemplos de inserciones de extremo incluyen un complejo que comprende un polipéptido con un residuo metionilo de extremo N. Otras variantes de inserción incluyen la fusión al extremo N o C de las cadenas polipeptídicas del complejo a una enzima.

b) Variantes de glucosilación

En determinados modos de realización, un polipéptido del complejo proporcionado en el presente documento se altera para aumentar o disminuir el grado de glucosilación del polipéptido. La adición o delección de sitios de glucosilación a un polipéptido se puede lograr convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de manera que se crea o se elimina uno o más sitios de glucosilación.

Cuando el complejo comprende una región Fc de anticuerpo, se puede alterar el carbohidrato enlazado al mismo. Las regiones Fc naturales producidas por células de mamífero típicamente comprenden un oligosacárido ramificado, biantenarico que, en general, se enlaza mediante un enlace de N a Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Véase, por ejemplo, Wright, A. y Morrison, S.L., TIBTECH 15 (1997) 26-32. El oligosacárido puede incluir diversos carbohidratos, por ejemplo, manosa, N-acetilglucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como una fucosa enlazada a una GlcNAc en el "tallo" de la estructura biantenaria de oligosacárido. En algunos modos de realización, se pueden hacer modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo de la invención con el fin de crear variantes de anticuerpos con determinadas propiedades mejoradas.

En un modo de realización, se proporcionan complejos que comprenden variantes de polipéptido que tienen una estructura de carbohidrato que carece de fucosa enlazada (directa o indirectamente) a una región Fc. Por ejemplo, la cantidad de fucosa en dicha región Fc puede ser de desde un 1 % a un 80 %, de desde un 1 % a un 65 %, de desde un 5 % a un 65 % o de desde un 20 % a un 40 %. La cantidad de fucosa se determina calculando la cantidad promedio de fucosa dentro de la cadena de azúcar en Asn297, respecto a la suma de todas las glucoestructuras enlazadas a Asn297 (por ejemplo, estructuras complejas, híbridas y de alto contenido en manosa) que se mide mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, como se describe en el documento WO 2008/077546, por ejemplo. Asn297 se refiere al residuo de asparagina localizado en aproximadamente la posición 297 en la región Fc (numeración de EU de los residuos de la región Fc); sin embargo, la Asn297 también se puede localizar aproximadamente ± 3 aminoácidos en dirección 5' o en dirección 3' de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300, debido a pequeñas variaciones de secuencia en los anticuerpos. Dichas variantes de fucosilación pueden tener una función de ADCC mejorada. Véase, por ejemplo, los documentos US 2003/0157108; US 2004/0093621. Los ejemplos de publicaciones relacionadas con variantes de anticuerpos "desfucosilados" o "deficitarios en fucosa" incluyen: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO 2005/053742; WO 2002/031140; Okazaki, A., *et al.*, J. Mol. Biol. 336 (2004) 1239-1249; Yamane-Ohnuki, N., *et al.*, Biotech. Bioeng. 87 (2004) 614-622. Los ejemplos de líneas celulares que pueden producir anticuerpos desfucosilados incluyen células CHO Lec13 deficitarias en fucosilación de proteínas (Ripka, J., *et al.*, Arch. Biochem. Biophys. 249 (1986) 533-545; el documento US 2003/0157108; y el documento WO 2004/056312, especialmente en el ejemplo 11), y líneas celulares con inactivaciones génicas, tales como el gen de la alfa-1,6-fucosiltransferasa, FUT8, células CHO con inactivación génica (véase, por ejemplo, Yamane-Ohnuki, N., *et al.*, Biotech. Bioeng. 87 (2004) 614-622; Kanda, Y., *et al.*, Biotechnol. Bioeng. 94 (2006) 680-688; y el documento WO 2003/085107).

Se proporcionan adicionalmente complejos que comprenden variantes de la región Fc con oligosacáridos bisegmentados, por ejemplo, en los que un oligosacárido biantenarico enlazado a la región Fc se bisegmenta por GlcNAc. Dichas variantes pueden tener fucosilación reducida y/o función de ADCC mejorada. Los ejemplos de dichas variantes de anticuerpo se describen, por ejemplo, en los documentos WO 2003/011878; US 6.602.684; y US 2005/0123546. También se proporcionan variantes de la región Fc con al menos un residuo de galactosa en el oligosacárido enlazado a la región Fc. Dichas variantes de la región Fc pueden tener función de CDC mejorada. Las variantes de anticuerpo correspondientes se describen, por ejemplo, en los documentos WO 97/30087; WO 98/58964; y WO 99/22764.

c) Variantes de la región Fc

En determinados modos de realización, se puede introducir una o más modificaciones de aminoácidos en la región Fc de un polipéptido comprendido en el complejo proporcionado en el presente documento, generando de ese modo una variante de la región Fc. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de la región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácido (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácido.

En determinados modos de realización, la invención contempla una variante de la región Fc que posee algunas, pero no todas las funciones efectoras, que hacen que sea un candidato deseable para aplicaciones en las que la semivida del complejo *in vivo* es importante, sin embargo, determinadas funciones efectoras (tales como el complemento y ADCC) son innecesarias o perjudiciales. Se pueden llevar a cabo ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/agotamiento de las actividades de CDC y/o ADCC. Por ejemplo, se pueden llevar a cabo ensayos de unión al receptor de Fc (FcR) para garantizar que el complejo carece de unión a FcγR (por tanto, es probable que carezca de actividad de ADCC), pero conserva la capacidad de unión a FcRn. Las células primarias para mediar en la ADCC, los linfocitos NK, expresan solamente FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la tabla 3 en la página 464 de Ravetch, J.V. y Kinet, J.P., *Annu. Rev. Immunol.* 9 (1991) 457-492. Los ejemplos no limitantes de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés se describen en la patente de EE. UU. n.º 5.500.362 (véase, por ejemplo, Hellstrom, I., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 7059-7063; y Hellstrom, I., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985) 1499-1502); patente de EE. UU. n.º 5.821.337 (véase Bruggemann, M., *et al.*, *J. Exp. Med.* 166 (1987) 1351-1361). De forma alternativa se pueden emplear procedimientos de ensayos no radiactivos (véase, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radiactivo ACTI™ para citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; y el ensayo de citotoxicidad no radiactivo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). De forma alternativa, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés se puede evaluar *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el divulgado en Clynes, R., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 652-656. También se pueden llevar a cabo ensayos de unión a C1q para confirmar que el anticuerpo es incapaz de unirse a C1q y, por tanto, carece de actividad de CDC. Véase, por ejemplo, el ELISA de unión a C1q y C3c en los documentos WO 2006/029879 y WO 2005/100402. Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo de CDC (véase, por ejemplo, Gazzano-Santoro, H., *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202 (1996) 163-171; Cragg, M.S., *et al.*, *Blood* 101 (2003) 1045-1052; y Cragg, M.S. y Glennie, M.J., *Blood* 103 (2004) 2738-2743). La unión a FcRn y las determinaciones de aclaramiento/semivida *in vivo* se pueden realizar también usando procedimientos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Petkova, S.B., *et al.*, *Int. Immunol.* 18 (2006) 1759-1769).

Las regiones Fc con función efectora reducida incluyen aquellas con sustitución de uno o más de los residuos 234, 235, 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 de la región Fc (véase, por ejemplo, el documento US 6.737.056). Dichos mutantes de Fc incluyen mutantes de Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones de aminoácido 265, 269, 270, 297 y 327, incluyendo el denominado mutante de Fc "DANA" con la sustitución de los residuos 265 y 297 a alanina (documento US 7.332.581).

Se describen determinadas variantes de la región Fc con unión mejorada o disminuida a los FcR. (Véanse, por ejemplo, los documentos US 6.737.056, WO 2004/056312 y Shields, R.L., *et al.*, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 6591-6604).

En determinados modos de realización, una variante de polipéptido comprende una región Fc con una o más sustituciones de aminoácido que mejoran la ADCC, por ejemplo, las sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración de EU de residuos).

En algunos modos de realización, se hacen alteraciones en la región Fc, que dan como resultado una unión a C1q y/o una citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) alteradas (es decir, mejoradas o disminuidas), por ejemplo, como se describe en los documentos US 6.194.551, WO 99/51642 e Idusogie, E.E., *et al.*, *J. Immunol.* 164 (2000) 4178-4184.

Los anticuerpos con semividas aumentadas y unión mejorada al receptor neonatal de Fc (FcRn), que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer, R.L., *et al.*, *J. Immunol.* 117 (1976) 587-593 y Kim, J.K., *et al.*, *J. Immunol.* 24 (1994) 2429-2434), se describen en el documento US 2005/0014934. Esos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en la misma que mejoran la unión de la región Fc a FcRn. Dichas variantes de la región Fc incluyen aquellas con sustituciones en uno o más residuos de la región Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434, por ejemplo, sustitución del residuo 434 de la región Fc (documento US 7.371.826).

Véanse también Duncan, A.R. y Winter, G., *Nature* 322 (1988) 738-740; los documentos US 5.648.260; US 5.624.821; y WO 94/29351 en relación con otros ejemplos de variantes de la región Fc.

d) Derivados

En determinados modos de realización, un complejo proporcionado en el presente documento se puede modificar adicionalmente para que contenga restos no proteicos adicionales que se conocen en la técnica y están fácilmente disponibles. Los restos adecuados para la derivatización del complejo incluyen, pero no se limitan a, polímeros hidrosolubles. Los ejemplos no limitantes de polímeros hidrosolubles incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, poli(alcohol vinílico),

polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (ya sea homopolímeros o copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(n-vinilpirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxiethylados (por ejemplo, glicerol), poli(alcohol vinílico) y mezclas de los mismos.

El propionaldehído de polietilenglicol puede tener ventajas en su fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular, y puede estar ramificado o no ramificado. El número de polímeros enlazados al anticuerpo puede variar, y si se enlaza más de un polímero, pueden ser las mismas moléculas o diferentes. En general, el número y/o tipo de polímeros usados para la derivatización se puede determinar basándose en consideraciones que incluyen, pero no limitadas a, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo que se va a mejorar, independientemente de si el derivado de anticuerpo se usa en un tratamiento en condiciones definidas, etc.

En otro modo de realización, se proporcionan conjugados de un complejo y un resto no proteico que se pueden calentar de forma selectiva mediante exposición a la radiación. En un modo de realización, el resto no proteico es un nanotubo de carbono (Kam, N.W., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (2005) 11600-11605). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda e incluye, pero no se limita a, las longitudes de onda que no dañan las células normales, pero que calientan el resto no proteico hasta una temperatura a la que se destruyen las células proximales al anticuerpo-resto no proteico.

B. Procedimientos y composiciones recombinantes

Los complejos se pueden producir usando procedimientos y composiciones recombinantes, por ejemplo, como se describe en el documento US 4.816.567. En un modo de realización, se proporcionan ácidos nucleicos aislados que codifican los polipéptidos del complejo descrito en el presente documento. En un modo de realización adicional se proporcionan uno o más vectores (por ejemplo, vectores de expresión) que comprenden dicho ácido nucleico. En un modo de realización adicional, se proporciona una célula huésped que comprende dicho ácido nucleico. En uno de dichos modos de realización, una célula huésped comprende (por ejemplo, se ha transformado con): (1) un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VL del anticuerpo y una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo, o (2) un primer vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VL del anticuerpo y un segundo vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo. En un modo de realización, la célula huésped es eucariota, por ejemplo, una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula linfocítica (por ejemplo, célula YO, NS0, Sp2/0). En un modo de realización, se proporciona un procedimiento de obtención de un complejo como se informa en el presente documento, en el que el procedimiento comprende cultivar una célula huésped que comprende un ácido nucleico que codifica los polipéptidos del complejo, proporcionado anteriormente, en condiciones adecuadas para la expresión de los polipéptidos y la formación del complejo, y opcionalmente, recuperar el complejo de la célula huésped (o del medio de cultivo de la célula huésped).

Para la producción recombinante de un complejo, se aísla un ácido nucleico que codifica los polipéptidos del complejo, por ejemplo, como se describe anteriormente, y se inserta en uno o más vectores para la posterior clonación y/o expresión en una célula huésped. Dicho ácido nucleico se puede aislar y secuenciar fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos, que se pueden unir específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo).

Las células huésped adecuadas para la clonación o vectores de expresión incluyen las células procariotas o eucariotas descritas en el presente documento. Por ejemplo, los complejos se pueden producir en bacterias, en particular cuando no se necesitan la glucosilación ni la función efectora de Fc. Para la expresión de fragmentos de anticuerpo y polipéptidos en bacterias, véanse, por ejemplo, los documentos US 5.648.237, US 5.789.199 y US 5.840.523. (Véase también Charlton, K.A., en: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2003), pp. 245-254, que describe la expresión de fragmentos de anticuerpo en *E. coli*). Después de la expresión, el complejo se puede aislar de la pasta de células bacterianas en una fracción soluble y se puede purificar adicionalmente.

Además de los procariotas, los microbios eucariotas tales como los hongos filamentosos o las levaduras, son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican el polipéptido, incluyendo cepas de hongos y levaduras, en los que las rutas de glucosilación se han "humanizado", lo que da como resultado la producción de un anticuerpo con un patrón de glucosilación parcial o totalmente humano. Véase Gerngross, T.U., Nat. Biotech. 22 (2004) 1409-1414; y Li, H., *et al.*, Nat. Biotech. 24 (2006) 210-215.

Las células huésped adecuadas para la expresión de complejos glucosilados también derivan de organismos multicelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células de vegetales y de insectos. Se han identificado numerosas cepas de baculovirus, que se pueden usar en conjunto con células de insectos, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

Los cultivos de células de vegetales también se pueden utilizar como huéspedes. Véanse, por ejemplo, los

documentos US 5.959.177, US 6.040.498, US 6.040.498, US 6.420.548, US 7.125.978 y US 6.417.429 (que describen la tecnología PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas).

Las células de vertebrados también se pueden usar como huéspedes. Pueden ser útiles, por ejemplo, líneas celulares de mamífero que están adaptadas para crecer en suspensión. Otros ejemplos de líneas de células huésped de mamíferos útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada con SV40 (COS-7); la línea de riñón embrionario humano (las células HEK 293 o 293 como se describen, por ejemplo, en Graham, F.L., *et al.*, J. Gen Virol. 36 (1977) 59-74); las células de riñón de cría de hámster (BHK); las células de Sertoli de ratón (células TM4 como se describe, por ejemplo, en Mather, J.P., Biol. Reprod. 23 (1980) 243-252); las células de riñón de mono (CV1); las células de riñón de mono verde africano (VERO-76); las células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA); las células de riñón canino (MDCK); las células de hígado de rata búfalo (BRL 3A); las células de pulmón humano (W138); las células de hígado humano (Hep G2); el tumor de mama de ratón (MMT 060562); las células TRI, como se describe, por ejemplo, en Mather, J.P., *et al.*, Annals N.Y. Acad. Sci. 383 (1982) 44-68; las células MRC 5; y las células FS4. Otras líneas de células huéspedes de mamífero útiles incluyen las células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo células CHO DHFR⁺ (Urlaub, G., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980) 4216-4220); y líneas celulares de mieloma tales como Y0, NS0 y Sp2/0. Para una revisión de determinadas líneas de células huésped de mamífero adecuadas para la producción de anticuerpos, véase, por ejemplo, Yazaki, P. y Wu, A.M., Methods in Molecular Biology, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2004), pp. 255-268.

C. Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones farmacéuticas de un complejo como se describe en el presente documento se preparan mezclando dicho complejo que tiene el grado de pureza deseado con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16.^a edición, Osol, A. (Ed.) (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos farmacéuticamente aceptables, en general, son atóxicos para los destinatarios a las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen, pero no se limitan a: tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como polietilenglicol (PEG). Los vehículos farmacéuticamente aceptables ejemplares en el presente documento incluyen, adicionalmente, agentes de dispersión intersticial del fármaco tales como glucoproteínas de hialuronidasa neutra-activa soluble (SHASEGP), por ejemplo, glucoproteínas de hialuronidasa PH-20 soluble humana, tales como rhuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Determinadas SHASEGP ejemplares y procedimientos de uso, incluyendo rhuPH20, se describen en los documentos US 2005/0260186 y US 2006/0104968. En un aspecto, una SHASEGP se combina con una o más glucosaminoglucanasas adicionales tales como condroitinasas.

Las formulaciones de anticuerpo liofilizadas ejemplares se describen en el documento US 6.267.958. Las formulaciones de anticuerpo acuosas incluyen las descritas en los documentos US 6.171.586 y WO 2006/044908, incluyendo las últimas formulaciones un tampón histidina-acetato.

La formulación del presente documento también puede contener más de un principio activo según sea necesario para la indicación particular que se esté tratando, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se ven afectadas de manera adversa entre sí. Dichos principios activos están presentes adecuadamente en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito pretendido.

Los principios activos se pueden atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan en Remington's Pharmaceutical Sciences 16.^a edición, Osol, A. (ed.) (1980).

Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, estando dichas matrices en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas.

Las formulaciones que se van a usar para la administración *in vivo* son, en general, estériles. La esterilidad se puede lograr fácilmente, por ejemplo, mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

D. Uso y composiciones terapéuticas

Cualquiera de los complejos proporcionados en el presente documento se puede usar en procedimientos terapéuticos.

- 5 En un aspecto, se proporciona un complejo como se informa en el presente documento para su uso como medicamento.

En aspectos adicionales, se proporciona un complejo como se informa en el presente documento para su uso en el tratamiento del cáncer o de una infección vírica.

- 10 En determinados modos de realización, se proporciona un complejo como se informa en el presente documento para su uso en un procedimiento de tratamiento.

- 15 En el presente documento se divulga un complejo como se informa en el presente documento para su uso en un procedimiento de tratamiento de un individuo que tiene cáncer o una infección vírica que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del complejo como se informa en el presente documento. En uno de dichos modos de realización, el procedimiento comprende adicionalmente administrar al individuo una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe a continuación.

- 20 También se divulga en el presente documento un complejo como se informa en el presente documento para su uso en la eliminación de células cancerosas o para la eliminación de células infectadas por virus. En determinados modos de realización, la invención proporciona un complejo como se informa en el presente documento para su uso en un procedimiento de eliminación de células cancerosas o de eliminación de células infectadas por virus en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del complejo como se informa en el presente documento para eliminar células cancerosas o para eliminar células infectadas por virus. Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores puede ser un ser humano.

- 30 También se divulga en el presente documento el uso de un complejo como se informa en el presente documento en la fabricación o preparación de un medicamento. En un modo de realización, el medicamento es para el tratamiento del cáncer o de infecciones víricas. En un modo de realización adicional, el medicamento es para su uso en un procedimiento de tratamiento del cáncer o de infecciones víricas que comprende administrar a un individuo que tiene cáncer o una infección vírica crónica una cantidad eficaz del medicamento. En uno de dichos modos de realización, el procedimiento comprende adicionalmente la administración al individuo de una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional. En un modo de realización adicional, el medicamento es para la eliminación de células cancerosas o para la eliminación de células infectadas por virus. En un modo de realización adicional, el medicamento es para su uso en un procedimiento de eliminación de células cancerosas o eliminación de células infectadas por virus en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del medicamento para eliminar células cancerosas o para eliminar células infectadas por virus. Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores puede ser un ser humano.

- 40 En el presente documento se divulga un procedimiento para tratar el cáncer o una infección vírica. En un modo de realización, el procedimiento comprende administrar a un individuo que tiene dicho cáncer o infección vírica una cantidad eficaz de un complejo como se informa en el presente documento. En uno de dichos modos de realización, el procedimiento comprende adicionalmente la administración al individuo de una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional. Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores puede ser un ser humano.

- 50 En el presente documento se divulga un procedimiento para la eliminación de células cancerosas o de células infectadas por virus en un individuo. En un modo de realización, el procedimiento comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un complejo como se informa en el presente documento para eliminar células cancerosas o células infectadas por virus. En un modo de realización, un "individuo" es un ser humano.

- 55 En un aspecto adicional, la invención proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los complejos como se informa en el presente documento, por ejemplo, para su uso en cualquiera de los procedimientos terapéuticos anteriores. En un modo de realización, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de los complejos como se informa en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otro modo de realización, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de los complejos como se informa en el presente documento y al menos un agente terapéutico adicional.

- 60 Los complejos de la invención se pueden usar ya sea solos o en combinación con otros agentes en un tratamiento. Por ejemplo, un complejo de la invención se puede coadministrar con al menos un agente terapéutico adicional.

- 65 Dichos tratamientos de combinación indicados anteriormente abarcan la administración combinada (en la que dos o más agentes terapéuticos se incluyen en la misma o en formulaciones separadas), y la administración separada, en este caso, la administración del complejo de la invención se puede producir antes, simultáneamente y/o luego de la administración del agente terapéutico adicional y/o adyuvante. Los complejos de la invención también se pueden

usar en combinación con radioterapia.

Un complejo de la invención (y cualquier agente terapéutico adicional) se puede administrar mediante cualquier medio adecuado, incluyendo la administración parenteral, intrapulmonar e intranasal y, si se desea para el tratamiento local, intralesional. Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intrarterial, intraperitoneal o subcutánea. La dosificación puede ser mediante cualquier vía adecuada, por ejemplo, por inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica. En el presente documento se contemplan diversas pautas posológicas incluyendo, pero no limitadas a, administraciones individuales o múltiples en diversos puntos temporales, administración en bolo e infusión pulsada.

Los complejos de la invención se formularán, dosificarán y administrarán de una manera coherente con la buena práctica médica. Los factores que se deben considerar en este contexto incluyen el trastorno particular que se está tratando, el mamífero particular que se está tratando, la afección clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el procedimiento de administración, la programación de la administración y otros factores conocidos por los médicos. Aunque no se necesita, el complejo se formula opcionalmente con uno o más agentes usados actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de complejo presente en la formulación, del tipo de trastorno o tratamiento y de otros factores analizados anteriormente. Estos se usan, en general, en las mismas dosis y por las vías de administración que se describen en el presente documento, o aproximadamente de desde un 1 a un 99 % de las dosis descritas en el presente documento, o en cualquier dosis y por cualquier vía que se determine empíricamente/clínicamente como apropiada.

Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosis apropiada de un complejo de la invención (cuando se usa solo o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad que se va a tratar, del tipo de complejo, de la gravedad y la evolución de la enfermedad, de si el complejo se administra con fines preventivos o terapéuticos, del tratamiento previo, de la historia clínica del paciente y de su respuesta al complejo, y del criterio del médico tratante. El complejo se administra adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y de la gravedad de la enfermedad, de aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,5 mg/kg - 10 mg/kg) de complejo puede ser una dosis inicial candidata para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas o mediante infusión continua. Una dosis diaria típica podría variar de desde aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se mantendrá, en general, hasta que se produzca una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Una dosis ejemplar del anticuerpo estaría en el intervalo de desde aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Por lo tanto, se pueden administrar al paciente una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas). Dichas dosis se pueden administrar intermitentemente, por ejemplo, cada semana o cada tres semanas (por ejemplo, de manera que el paciente reciba de aproximadamente dos a aproximadamente veinte o, por ejemplo, aproximadamente seis dosis del anticuerpo). Se puede administrar una dosis de carga más alta inicial, seguido de una o más dosis más bajas. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas posológicas. La evolución de este tratamiento se comprueba fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

Se entiende que cualquiera de las formulaciones o procedimientos terapéuticos anteriores se puede llevar a cabo usando un inmunoconjugado de la invención en lugar de o además de un complejo como se informa en el presente documento.

Un aspecto como se informa en el presente documento es el complejo como se informa en el presente documento para su uso en un procedimiento de tratamiento de un cáncer o una infección vírica en un paciente, en el que el complejo se debe administrar antes, simultáneamente o después de la inmunización del paciente con el péptido derivado de virus comprendido en el complejo.

En el presente documento se divulga el uso de un complejo como se informa en el presente documento para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer o de una infección vírica en combinación con inmunización contra el péptido derivado de virus comprendido en el complejo.

En la primera etapa, el péptido derivado de virus que está contenido en el complejo se administra en primer lugar al individuo que se va a tratar. En un determinado lapso de tiempo posterior, es decir, entre 4 días y 28 días, el complejo como se informa en el presente documento se administra al individuo.

Mediante esta aplicación sucesiva y separada del polipéptido derivado de virus, en la primera etapa solo y en la segunda etapa en el complejo como se informa en el presente documento, es posible aumentar el número de linfocitos T específicos de péptido derivado de virus y, por lo tanto, aumentar la eficacia del tratamiento.

III. Artículos de fabricación

En otro aspecto de la divulgación, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, la prevención y/o el diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto en o asociado al recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, bolsas de solución i.v., etc. Los recipientes se pueden formar a partir de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es, por sí misma o en combinación con otra composición, eficaz para tratar, prevenir y/o diagnosticar la afección y que puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo de la composición es un complejo de la invención. La etiqueta o prospecto indica que la composición se usa para tratar la afección de elección. Por otra parte, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un complejo de la invención; y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un agente citotóxico o de otro modo terapéutico adicional. El artículo de fabricación en este modo de realización de la divulgación puede comprender adicionalmente un prospecto que indica que las composiciones se pueden usar para tratar una afección particular. De forma alternativa, o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender adicionalmente un segundo (o tercer) recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyectables (BWHI), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir adicionalmente otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

Se entiende que cualquiera de los artículos de fabricación anteriores puede incluir un inmunoconjugado de la invención en lugar de o además de un complejo como se informa en el presente documento.

IV. Ejemplos

Los siguientes son ejemplos de procedimientos y composiciones de la invención. Se entiende que se pueden poner en práctica otros modos de realización diversos, dada la descripción general proporcionada anteriormente.

Ejemplo 1

Procedimiento para el aislamiento y la estimulación de linfocitos T CD8 positivos específicos de CMV a partir de donantes humanos

Aislamiento de los PBL

Los PBL se aislaron mediante centrifugación en gradiente de Ficoll a partir de sangre de donante humano (Greiner bio-one, n.º de cat. 227290). Los PBL se cultivaron en RPMI enriquecido con suero humano al 5 % (n.º de cat. de Sigma H2520), L-glutamina 2 mM (PAN Biotech, n.º de cat. P04-80100), 100 µg/ml de penicilina/estreptomicina (Roche, n.º de cat. 14001100).

Estimulación de los PBL

Las células (2×10^7 células/ml) se cultivaron en medio de cultivo celular enriquecido con 50 µg/ml de péptido derivado de pp65 de CMV (SEQ ID NO: 01) durante dos horas bajo condiciones de cultivo celular (37 °C, 5 % de CO₂, 80 % de humedad). Posteriormente, la suspensión de células se diluyó 20 veces con medio de cultivo y se cultivó adicionalmente en placas de 96 pocillos de fondo plano a una densidad de siembra de 2×10^5 células por 96 pocillos. Después de 4 a 5 días, se añadieron 20 U/ml de IL-2 (Roche, n.º de cat. 11011456001), 25 ng/ml de IL-7 (Peprotech, n.º de cat. 200-01) y 25 ng/ml de IL-15 (Peprotech, n.º de cat. 200-15) y se cultivaron las células durante otros 7 a 8 días. La estimulación de los linfocitos T es visible bajo el microscopio como agrupaciones celulares.

Reestimulación de los PBL

Los linfocitos T se cocultivaron con células estimuladoras, que son PBL primarios autólogos pulsados con péptido del mismo donante (o bien recién preparados o derivados de reservas congeladas). Las células estimuladoras se pulsaron con el péptido como se describió anteriormente. Después de las dos horas de incubación del péptido, los PBL se irradiaron (4000 rad, STS GmbH OB29 n.º 9510-5) y se lavaron dos veces en medio de cultivo sin péptido. La reestimulación se llevó a cabo en placas de 96 pocillos con placas de fondo redondo. Se usaron de 8×10^4 a 1×10^5 células estimuladoras por 96 pocillos. Las células del cultivo primario se lavaron dos veces con medio de cultivo, se resuspendieron en 200 µl de medio de cultivo y se transfirieron 80 µl a cada pocillo de las células estimuladoras. Después de 3 días, se añadieron 20 U/ml de IL-2, 25 ng/ml de IL-7 y 25 ng/ml de IL-15. Las células proliferaron y se expandieron cada 2 a 3 días en pozos nuevos con medio nuevo.

Análisis de linfocitos T

Las células se tiñeron para la expresión de CD8 (BD, n.º de cat. 345772) y de los receptores de linfocitos T específicos de CMV (ProImmune, n.º de cat. F008-4A-E) y se analizaron en FACS.

Medio de cultivo celular

RPMI1640 (PAN Biotech, n.º de cat. P04-17500), suero humano al 5 % (HS; n.º de cat. de Sigma H2520), L-glutamina 2 mM (PAN Biotech, n.º de cat. P04-80100), 100 µg/ml de penicilina/estreptomicina (Roche, n.º de cat. 14001100).

Resultados

Se realizó un análisis FACS de linfocitos de sangre periférica (PBL) derivados de cuatro donantes humanos. Las células se marcaron con un anticuerpo anti-CD8 conjugado con FITC (BD, n.º de cat. 345772) combinado con pentámero Pro5 conjugado con APC (Prolimmune, n.º de cat. F008-4A-E) para teñir los linfocitos T que transportan un receptor de linfocitos T (TCR) que reconoce MHC de clase I (HLA-A*0201) cargado con el péptido derivado de CMV (NFVPMVATV (SEQ ID NO: 01)). Para los resultados, véase la figura 4. En el día 0, el donante 1 y 4 transportan un número bajo de linfocitos T CD8 específicos de CMV (0,08 % y 0,1 %, respectivamente). El donante 2 y 3 transportan un número mayor de linfocitos T CD8 específicos de CMV en su sangre periférica (0,25 % y 3,12 %, respectivamente). Catorce días más tarde después de la estimulación con células autólogas pulsadas con péptido derivado de CMV, solamente los donantes 2 y 3 muestran un aumento significativo en linfocitos T CD8 específicos de CMV (6,2 % y 71,2 %, respectivamente) mientras que los donantes 1 y 4 no muestran números aumentados de linfocitos T CD8 específicos de CMV (0,01 % y 0,05 %, respectivamente). Otros 14 días más tarde después de una segunda estimulación con células autólogas pulsadas con péptido derivado de CMV, los donantes 2 y 3 muestran un aumento adicional en los linfocitos T CD8 específicos de CMV (15,1 % y 96,6 %, respectivamente).

Ejemplo 2**Ensayo de citotoxicidad**

Las células MN60 de leucemia linfocítica aguda transportan el alelo de HLA-A A*0201. Las células MN60 (1×10^6 células/ml) se incubaron con 50 µg/ml del péptido pp65 de CMV (SEQ ID NO: 01) durante 45 minutos en condiciones de cultivo celular (37 °C, 5 % de CO₂, 80 % de humedad). La incubación da como resultado un intercambio de péptido en el surco de unión a péptido HLA-A*0201. Las células MN60 con el péptido intercambiado se centrifugaron y se diluyeron a una densidad de 1×10^6 células/ml con PBS (PanBiotech, n.º de cat. P04-36500) y se tiñeron con 1 µM del trazador celular éster succinimidílico de carboxifluoresceína (CFSE, Invitrogen, n.º de cat. 34554) 15 minutos a temperatura ambiente (t.a.). Las células se lavaron posteriormente una vez con PBS y se diluyeron hasta 1×10^5 células/ml con medio AIM-V (Gibco, n.º de cat. 0870112DK). Para el ensayo, las células MN60 (células diana) se cocultivaron en placas de fondo redondo de 96 pocillos con linfocitos T CD8⁺ derivados del donante 3 humano específicos de CMV (células efectoras, véase el ejemplo 1) durante cuatro horas en condiciones de cultivo celular. La proporción de células efectoras a diana era de 4:1. Las células muertas se tiñen con 1 µl/100 µl de yoduro de propidio (PI, Sigma, n.º de cat. P-4864) y se analizaron por FACS.

Resultados

El análisis de citometría de flujo se realizó para analizar la capacidad citolítica de los CTL estimulados a través de la lisis de células tumorales MN60 cargadas con péptido de CMV:

En la figura 5a, se muestra el análisis de FACS de un cocultivo de células MN60 no cargadas con el péptido derivado de CMV. Las células MN60 son positivas para FITC. Las células efectoras son negativas para FITC. Las células muertas son positivas para PI, las células vivas son negativas para PI. Se puede observar que más de un 85 % de las células MN60 están vivas cuando no se cargan con el péptido derivado de CMV (Q2 y Q4).

En la figura 5b se muestra el análisis de FACS de células MN60 cargadas con péptido derivado de CMV. Se puede observar que más de un 80 % de las células MN60 están muertas (Q2 y Q4) mientras que la proporción de células efectoras vivas y muertas no se altera notablemente entre el análisis de FACS que se muestra en la figura 5a y la figura 5b (compárese Q1 y Q3 en la figura 5a y la figura 5b) que indica una lisis específica de células diana cargadas con péptido de CMV.

Análisis de citometría de flujo para analizar la capacidad citolítica de los CTL estimulados a través de la lisis de células tumorales MN60 cargadas con péptido de CMV, dependiendo de la proporción de células efectoras a diana:

El ensayo citotóxico se realizó como se describe anteriormente. Se aplicaron diferentes proporciones de células efectoras a células diana que oscilan de desde 0,5 células efectoras por célula diana a cuatro células efectoras por célula diana (véase la figura 6). El tiempo de incubación fue de cuatro horas. Las células MN60 que no se cargaron con el péptido derivado de CMV no muestran un número aumentado de células muertas con una proporción de efectora con respecto a diana aumentada, es decir, que oscila de desde un 8 % a un 13 % con una proporción de 0,5:1 a 4:1.

Casi un 20 % de las células MN60 cargadas con péptido derivado de CMV ya se destruyen con una proporción baja de efectoras con respecto a diana de 0,5:1 en cuatro horas. El número de células muertas aumenta abruptamente con un aumento en la proporción de efectoras con respecto a diana que alcanza hasta un 83 % a una proporción de 4:1 de células efectoras por célula diana.

Ejemplo 3

Preparación, transfección, expresión, purificación y análisis de ADN

Preparación de ADN

Se recogieron 250 ml de cultivo de LB bacteriano durante la noche y se extrajo ADN de plásmido de acuerdo con el protocolo del fabricante (kit Maxi de alta velocidad, Qiagen, n.º de cat. 12663). El ADN de plásmido resultante se eluyó en 1 ml de tampón TE y se determinó la concentración de ADN mediante medición espectrofotométrica (Epoch, BioTek).

El vector de expresión final comprendía los siguientes elementos:

- los sitios de restricción endonucleolíticos HindIII, NheI,
- un promotor de CMV,
- una 5'UTR 1 (derivada del CMV humano),
- Intron A,
- una 5'UTR 2,
- un gen de resistencia a la ampicilina,
- un sitio de poli A de BGH (señal de poliadenilación de somatotropina bovina),
- pUC Ori.

Secuencias de aminoácidos de los elementos del complejo

Péptido pp65 de SEQ ID NO: 01
CMV: NLVPMVATV

Enlazador 1: SEQ ID NO: 21
GGGGSGGGSGGGGS

Microglobulina β_2 : SEQ ID NO: 10
IQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVD
LLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWFSFYLLYYTEFTPTEKD
EYACRVNHVTLSPKIVKWDRDM

Enlazador 2: SEQ ID NO: 22
GGGGSGGGSGGGSGGGGS

$\alpha 1$ - $\alpha 3$ de HLA-A*0201: SEQ ID NO: 11
GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRFIAVGYVDDTQFVRFDS
DAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDGETRKVKAHSQTH
RVDLGTLRGYYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGSDFWRF
LRGYHQYAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQTTK
HKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRLRYLNGKETL
QRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFP AEITLT
WQRDGEDQTQDTELVETRPAGDGTQKWA AVVPS
GQEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRW

Enlazador 3: SEQ ID NO: 12
GS

Enlazador 4: SEQ ID NO: 22
GGGGSGGGSGGGSGGGGS

Cadena ligera de Ig: SEQ ID NO: 41
 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQ
 KPGQAPRLLIYDASKRATGIPARFSGSGSGTDFTLTSS
 LEPEDFAVYYCQQRSKWPPWTFGQGTKVESKRTVAA
 PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
 DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYE
 KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Cadena pesada de Ig (mutantes L234A, L235A de IgG1) SEQ ID NO: 42
 QVELVESGGGVVQPGRSQRLSCAASGFTFSSYGMHW
 VRQAPGKGLEWVAIIWFDGSSTYYADSVRGRFTISR
 NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARELGRRYFDLWG
 RGTLSVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
 KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
 VVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD
 KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
 CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
 YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
 IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV
 KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY
 SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
 SPGK

Cadena pesada de Ig (mutantes L234A, L235A con variación de botón de IgG1): SEQ ID NO: 43
 QVELVESGGGVVQPGRSQRLSCAASGFTFSSYGMHW
 VRQAPGKGLEWVAIIWFDGSSTYYADSVRGRFTISR
 NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARELGRRYFDLWG
 RGTLSVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
 KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
 VVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD
 KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
 CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
 YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
 IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLV
 KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY
 SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
 SPGK

Cadena pesada de Ig (mutantes L234A, L235A con variación de ojal de IgG1): SEQ ID NO: 44
 QVELVESGGGVVQPGRSQRLSCAASGFTFSSYGMHW
 VRQAPGKGLEWVAIIWFDGSSTYYADSVRGRFTISR
 NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARELGRRYFDLWG
 RGTLSVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
 KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
 VVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD
 KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT

CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLV
SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

Región Fc de la cadena pesada de Ig (variante de botón de la región Fc mutante F234A, F235A de IgG1):

SEQ ID NO: 45
EPKSADKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDELTKNQV
SLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGK

scFv:

SEQ ID NO: 46
QVELVESGGGVVQPGRSQRLSCAASGFTFSSYGMHW
VRQAPGKCLEWVAIIWFDGSSTYYADSVRGRFTISR
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARELGRRYFDLWG
RGTLSVSSGGGGSGGGSGGGSGGGGSEIVLTQSP
ATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPR
LLIYDASKRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPDAV
YYCQQRSKWPPWTFGCGTKVESK

Transfección

- 5 Se diluyeron las células HEK 293 hasta 8×10^5 células/ml el día antes de la transfección. Se transfectaron aproximadamente de 1 a $1,6 \times 10^6$ células/ml de acuerdo con el protocolo del fabricante. Para un volumen de transfección final de 30 ml, se diluyeron 30 µg de ADN hasta un volumen final de 1 ml con medio de suero reducido Opti-MEM® I (Gibco, n.º de cat. 31985070). Se diluyeron igualmente 2 µl de reactivo 293fectin™ (Invitrogen, n.º de cat. 12347019) por 1 µg de ADN hasta un volumen final de 1 ml con medio Opti-MEM® y se incubaron durante 5 minutos. Después de la incubación, se añadió el ADN diluido al reactivo 293fectin™ diluido, se mezcló suavemente, se incubó durante otros 20-30 minutos y después se pipeteó gota a gota en 28 ml de las células HEK 293 para obtener un volumen final de 30 ml. Las células se incubaron en condiciones de cultivo celular (37 °C, 8 % de CO₂, 80 % de humedad) en un agitador orbital que giraba a 125 rpm y se recogieron después de 72 horas. La extracción se centrifugó durante 10 minutos a 1000 rpm, durante 10 minutos a 3000 rpm y se filtró a través de un filtro estéril de 22 µm (Millipore, n.º de cat. SCGPU05RE).

Imunoelectrotransferencia

- 20 Se concentraron 500 µl de sobrenadante de cultivo celular con dispositivos centrífugos Pall Nanosep Omega-Membran 30KD (Pall, n.º de cat. OD030C33) hasta un volumen de 50 µl. Se diluyeron 17,5 µl de cada concentrado hasta un volumen final de 25 µl con tampón de muestra XT (Bio Rad, n.º de cat. 161-0791) 4x y agente reductor XT (BioRad, n.º de cat. 161-0792) 20x, se calentaron durante 8 minutos a 96 °C y se aplicaron sobre un gel prefabricado Criterion XT al 4-12 % (n.º de cat. 345-0124). La transferencia se realizó con célula de transferencia semiseca Trans-Blot SD (BioRad) a 20 V durante 30 minutos sobre una membrana de nitrocelulosa pura Trans-blot (0,45 µm) (BioRad, n.º de cat. 162-0117). El bloqueo de la membrana se realizó con reactivo de bloqueo de electrotransferencia (Roche, n.º de cat. 11921681001) 1x durante una hora a temperatura ambiente. La tinción se realizó con anticuerpos anti-cadena ligera κ humanos de conejo policlonales conjugados con peroxidasa (DAKO, n.º de cat. P0129, diluido 1:3000) y conjugado de HRP con anticuerpos anti-Ig humana de conejo policlonales (DAKO, n.º de cat. P0214, diluido 1:5000) durante una hora a temperatura ambiente. La detección de luminiscencia se llevó a cabo con LUMI-Imager F1 (Roche).

Purificación

Las células se eliminaron del medio de cultivo mediante centrifugación. Los complejos se purificaron de los sobrenadantes mediante cromatografía de afinidad con proteína A (MabSelect-sefarosa sobre un sistema ÄKTA-Avant). Los complejos eluidos se concentraron con tubos de centrifugación Amicon hasta una concentración de proteína de 3 mg/ml. Se analizó una alícuota en cromatografía de exclusión por tamaño (TSKgel GFC300 Sys89 de HPLC). Se realizó la SEC preparativa en una columna Superdex 200 para eliminar los agregados y tamponar las proteínas de fusión en histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0. Los complejos eluidos se concentraron con un tubo de centrifugación Amicon hasta una concentración de proteína de 1 mg/ml y se filtraron de manera estéril (tamaño de poro de 0,2 µm).

10 Analítica

Las muestras de complejo se analizaron mediante OD280 usando un espectrofotómetro UV para determinar la concentración de proteína en solución. El coeficiente de extinción requerido para esto se calculó a partir de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con Pace (Pace, *et al.*, Protein Science 4 (1995) 2411-2423). La cromatografía de exclusión por tamaño (SE-HPLC) se realizó en columnas TSK-Gel300SWXL o Superdex 200 con un tampón de fosfato de potasio 0,2 M, que comprende KCl 0,25 M, pH 7,0 como fase móvil con el fin de determinar el contenido de especies monoméricas, agregadas y degradadas en las muestras. La electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS) (reductora y no reductora) se realizó para analizar la pureza de las preparaciones de complejo con respecto a los productos de degradación relacionados con el producto y las impurezas no relacionadas. La espectrometría de masas con ionización por electronebulización (ESI-MS) se realizó con muestras reducidas (TCEP) y desglucosiladas (N-glucosidasa F) para confirmar la masa/identidad correcta de cada cadena y detectar modificaciones químicas. La ESI-MS de las muestras desglucosiladas se llevó a cabo para analizar la naturaleza y la calidad de la proteína completamente ensamblada y detectar posibles productos secundarios relacionados con el producto.

25 Procedimiento SDS-PAGE y tinción de Coomassie

Dispositivo:	Minicélula XCell Sure Lock de Invitrogen
Gel:	Gel de tris-glicina al 4-20 %, Invitrogen EC6025BOX
Tampón:	Tampón de migración de tris-glicina SDS (10x), Invitrogen LC2675-5
Tampón de muestra:	Tampón de muestra de tris-glicina SDS (2x), Invitrogen LC2676
Tampón reductor:	Agente reductor de muestras NuPAGE (10x), Invitrogen NP0004
Marcador de masa molecular:	Mark 12, MW estándar, Invitrogen LC5677

Preparación de muestra de proteína

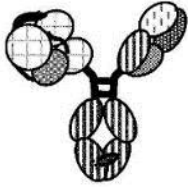
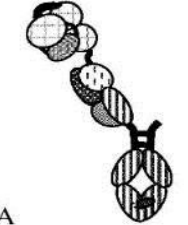
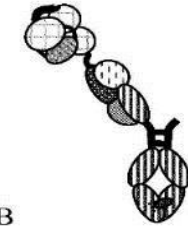
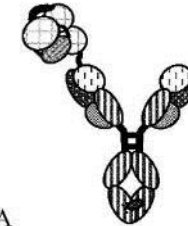
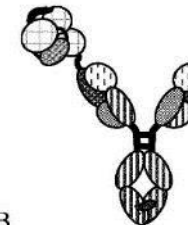
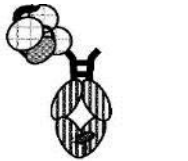
La muestra se ajustó hasta una concentración de proteína de 1 mg/ml con tampón. Para la reducción de la muestra se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

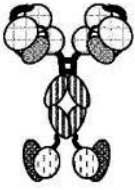
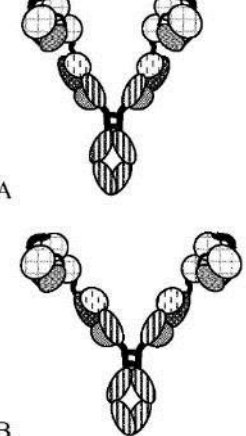
- Tampón de reducción: 4 ml de tampón de muestra (2x) y 1 ml de tampón reductor (10x)
- diluir la muestra 1:1 con tampón reductor
- incubar durante 5 minutos a 70 °C

La electroforesis en gel se llevó a cabo a 125 V durante 90 minutos. Los geles se tiñeron con Simply Blue Safe Stain (Invitrogen, n.º de cat. LC6065).

Resultados

Tabla.

N.º	Polipéptidos comprendidos en el complejo	Esquema	Rendimiento
1	1. [péptido pp65 de CMV]-[enlazador 1]-[microglobulina β_2]-[enlazador 2]-[$\alpha 1$-$\alpha 2$-$\alpha 3$ de HLA-A]-[enlazador 3]-[mutante con variación de ojal L234A, L235A de IgG1] 2. Cadena pesada de Ig (mutante con variación de botón L234A, L235A de IgG1) 3. Cadena ligera de Ig		5 mg/l
2	A: 1. [péptido pp65 de CMV]-[enlazador 1]-[microglobulina β_2]-[enlazador 2]-[$\alpha 1$-$\alpha 2$-$\alpha 3$ de HLA-A]-[enlazador 3]-[mutante con variación de ojal L234A, L235A de IgG1] 2. Variante de botón de la región Fc de mutante L234A, L235A de IgG1 3. Cadena ligera de Ig B: Fusión a la cadena ligera de Ig	A  B 	A: 5-18 mg/l
3	A: 1. [péptido pp65 de CMV]-[enlazador 1]-[microglobulina β_2]-[enlazador 2]-[$\alpha 1$-$\alpha 2$-$\alpha 3$ de HLA-A]-[enlazador 3]-[mutante con variación de ojal L234A, L235A de IgG1] 2. Mutante con variación de botón L234A, L235A de IgG1 3. Cadena ligera de Ig B: Fusión a la cadena ligera de Ig	A  B 	A: 4-23 mg/l
4	1. [péptido pp65 de CMV]-[enlazador 1]-[microglobulina β_2]-[enlazador 2]-[$\alpha 1$-$\alpha 2$-$\alpha 3$ de HLA-A]-[enlazador 3]-[mutante con variación de ojal L234A, L235A de IgG1] 2. Mutante con variación de botón		4 mg/l

N.º	Polipéptidos comprendidos en el complejo	Esquema	Rendimiento
	L234A, L235A de IgG1		
5	1. [péptido pp65 de CMV]- [enlazador 1]-[microglobulina β_2]- [enlazador 2]-[$\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$ de HLA-A]- [enlazador 3]-[región Fc de L234A, L235A de IgG1]		4 mg/l
6	1. [péptido pp65 de CMV]- [enlazador 1]-[microglobulina β_2]- [enlazador 2]-[$\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$ de HLA-A]- [enlazador 3]-[región Fc de mutante L234A, L235A de IgG1]-[enlazador 4]- [scFv]		< 1 μ g/l
7	A: 1. [péptido pp65 de CMV]- [enlazador 1]-[microglobulina β_2]- [enlazador 2]-[$\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$ de HLA-A]- [enlazador 3]-[mutante L234A, L235A de IgG1] 2. Cadena ligera de Ig B: Fusión a la cadena ligera de Ig		< 1 μ g/l

El gel de SDS con tinción de Coomassie y los cromatogramas de SEC correspondientes de los complejos seleccionados número 1 y 2a de acuerdo con la tabla previa se muestran en la figura 7 y 8. Se puede observar que se pueden obtener complejos definidos.

Ejemplo 4

Unión de fusión de MHC-anticuerpo a la línea celular humana positiva para IGF-1R

Las células H460M2 se diluyeron hasta 8×10^5 células/ml en medio AIM-V (Gibco, n.º de cat. 0870112DK). Se tiñeron 500 μ l de la suspensión celular con 10 μ g de un complejo como se informa en el presente documento a 4 °C o 37 °C durante una hora. Posteriormente, las células se lavaron una vez con medio AIM-V enfriado con hielo y se tiñeron con un segundo anticuerpo, que era un anticuerpo anti-IgG humana (H+L) F(ab')₂ de cabra conjugado con R-PE (Dianova, n.º de cat. 109-116-088, dilución 1:50) durante 30 minutos a 4 °C. Posteriormente, las células se lavaron una vez con medio AIM-V enfriado con hielo y se midió la fluorescencia mediante FACS Canto II (BD Bioscience) con activación en las células vivas. Un anticuerpo biespecífico sirvió como control de isotipo, un anticuerpo anti-IGF-1R (véase, por ejemplo, los documentos WO 2004/087756 y WO 2007/115814) sirvió como control positivo.

Resultados

Los resultados se muestran en la figura 9. Considerando el desplazamiento en la medición de fluorescencia de PE (eje de las X), el complejo como se informa en el presente documento no muestra diferencia visible en la unión a células diana H460M2 (figura 9-2) en comparación con el anticuerpo de control (figura 9-6). Tampoco hay diferencia si la incubación con el complejo como se informa en el presente documento se logra a 4 °C o 37 °C (véase la figura 9-2 frente a la figura 9-3). La incubación no muestra ningún desplazamiento en la medición de fluorescencia de PE ni con el control de isotipo (figura 9-4) ni con el anticuerpo secundario marcado con fluorescencia solo (figura 9-5). A pesar de la fusión de la molécula de MHC de clase I, el dominio variable de anticuerpo del complejo como se informa en el presente documento todavía se une a las células diana H460M2.

Aunque la invención anterior se ha descrito con algún detalle a modo de ilustración y ejemplo para propósitos de claridad de comprensión, las descripciones y ejemplos no se deben interpretar como limitantes del alcance de la invención.

Ejemplo 5

Eliminación *in vitro* de células que expresan antígeno

Se sembraron células diana I24 (1×10^5 células/ml) en medios de cultivo celular (RPMI 1640 enriquecido con L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, NEAA 0,1 mM y FCS al 10 % (v/p)) en placas de fondo de vidrio WillCo (FA. WillCo Wells BV, REF GWST-3522) durante 24 a 48 horas. Las placas de fondo de vidrio WillCo se recubrieron previamente con 50 µg/ml de clorhidrato de poli-L-lisina (Sigma Aldrich, n.º de cat. P2658) por placa durante 30 min. Después del recubrimiento, las placas se enjuagaron minuciosamente con agua estéril de calidad de cultivo de tejido y se secaron durante dos horas.

Después de eliminar los medios de cultivo celular de cultivo y el complejo de unión a antígeno que comprende un polipéptido de fusión [péptido pp65 de CMV]-[enlazador 1]-[microglobulina β_2]-[enlazador 2]-[$\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$ de HLA-A]-[enlazador 3]-[mutante con variación de ojal L234A, L235A de IgG1], un polipéptido unido por disulfuro de la variante de botón de la región Fc de mutante L234A, L235A de IgG1 y una cadena ligera de Ig, en el que el complejo se une específicamente al IGF-1R humano como se informa en el presente documento (véase, por ejemplo, el ejemplo 3) se añadió en una concentración final de 5 µg/ml en tampón HEPES de solución Krebs Ringer de K^+ 3 mM, pH 7,3 (enriquecido con DL-ditioneitol 0,5 mM, ácido ascórbico 1 mM y glutatión 4 mM).

Se añadieron linfocitos T en una proporción de células diana con respecto a células efectoras de 1:10. La obtención de imágenes se realizó durante 4 horas con un microscopio Zeiss Axiovert 135.

Resultados

En la figura 10 se muestran imágenes microscópicas de la incubación del complejo de unión a antígeno que comprende un polipéptido de fusión [péptido pp65 de CMV]-[enlazador 1]-[microglobulina β_2]-[enlazador 2]-[$\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$ de HLA-A]-[enlazador 3]-[mutante con variación de ojal L234A, L235A de IgG1], un polipéptido unido por disulfuro de la variante de botón de la región Fc de mutante L234A, L235A de IgG1 y una cadena ligera de Ig, en el que el complejo se une específicamente al IGF-1R humano. Se puede observar que la lisis mediada por el complejo de IGF-1R humano expresa las células I24 3T3 (células grandes proliferativas con adherencia, punta de flecha blanca). La lisis está mediada por linfocitos T específicos de CMV humano (células pequeñas ya sea con forma redonda, flecha blanca, o células migratorias de ameboides, flecha negra). Las células I24 se incuban con el complejo a una concentración de 5 µg/ml y linfocitos T específicos de CMV humano (preactivados con HLA-A0201⁺/APC pulsadas con péptido de CMV). El lapso de tiempo se indica debajo de la imagen respectiva. Obsérvese a interacción de las células I24 con los linfocitos T a los 56 min y a los 76 min y, subsecuentemente, el colapso de la célula I24 después de 125 min.

En la figura 11, las imágenes microscópicas de un control muestran la ausencia de lisis de las células I24 3T3 (células grandes proliferativas con adherencia, punta de flecha blanca) a través de linfocitos T específicos de CMV humano (células pequeñas ya sea con forma redonda, flecha blanca o células migratorias de ameboides, flecha negra) en ausencia de un complejo de unión a antígeno como se informa en el presente documento. Las células I24 se incuban con linfocitos T citotóxicos específicos (preactivados con HLA-A0201⁺/APC pulsadas con péptido de CMV). El lapso de tiempo se indica debajo de la imagen respectiva.

Ejemplo 6

Ensayo de citotoxicidad

El medio de cultivo celular (50 µl) se pipeteó en cada pocillo de una placa E de 96 pocillos Xcelligence (Roche, n.º de cat. 05232368001) para realizar la medición de fondo.

Las células I24 se diluyeron hasta 1×10^6 células/ml en medios de cultivo celular (RPMI 1640, L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, NEAA 0,1 mM, FCS al 10 % (v/p)) y se pipetearon 50 µl (2×10^4 células/pocillo) en cada pocillo de una placa de 96 pocillos Xcelligence hasta un volumen final de 100 µl y se cultivaron durante 24 horas (37 °C, 8 % de CO₂, 80 % de humedad). Después de 24 horas, se eliminó el medio y las células se lavaron con 200 µl de medio AIM-V (medio de linfocitos T de medio libre de suero (Invitrogen) (n.º de cat.): 12055-083). El complejo de unión a antígeno que comprende un polipéptido de fusión [péptido pp65 de CMV]-[enlazador 1]-[microglobulina β_2]-[enlazador 2]-[$\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$ de HLA-A]-[enlazador 3]-[mutante con variación de ojal L234A, L235A de IgG1], un polipéptido unido por disulfuro de la variante de botón de la región Fc de mutante-L234A, L235A de IgG1 y una cadena ligera de Ig, en el que el complejo se une específicamente al IGF-1R humano, como se informa en el presente documento se añadió a las células diana lavadas en una concentración final de 1 µg/ml en medio AIM-V.

Se añadieron las células efectoras en la proporción respectiva en medio AIM-V hasta un volumen final de 150 μ l. El anticuerpo monoclonal IgG1 afucosilado dirigido contra el IGF-1R humano (anticuerpo anti-IGF-1R afucosilado) y el anticuerpo anti-digoxigenina humana de no unión (anticuerpo anti-digoxigenina) sirvieron como control de isotipo y control de anticuerpo específico, respectivamente. La medición se realizó durante 6 a 9 horas respectivamente con el sistema Xcelligence (Roche).

Resultados

El complejo como se informa en el presente documento desencadena la lisis de células tumorales H460M2 a través de linfocitos T específicos de CMV humano.

Las células tumorales se incubaron durante 4 horas con 1 μ g/ml del complejo que comprende un polipéptido de fusión [péptido pp65 de CMV]-[enlazador 1]-[microglobulina β_2]-[enlazador 2]-[$\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$ de HLA-A]-[enlazador 3]-[mutante con variación de ojal L234A, L235A de IgG1], un polipéptido unido por disulfuro de la variante de botón de la región Fc de mutante L234A, L235A de IgG1 y una cadena ligera de Ig, en el que el complejo se une específicamente al IGF-1R humano, y a linfocitos T específicos en la proporción respectiva (de 1:1,5 a 1:0,5) (véase la figura 12). El porcentaje de lisis se denota por encima de las barras respectivas. El anticuerpo monoclonal de IgG1 afucosilado dirigido contra el IGF-1R humano (MAB IGF-1R-afu) no desencadenó una lisis de células tumorales significativa.

El complejo como se informa en el presente documento desencadena la lisis de células diana I24 3T3 a través de linfocitos T específicos de CMV humano.

Las células diana se incubaron durante 4 horas con 1 μ g/ml de un complejo de unión a antígeno que comprende un polipéptido de fusión [péptido pp65 de CMV]-[enlazador 1]-[microglobulina β_2]-[enlazador 2]-[$\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$ de HLA-A]-[enlazador 3]-[mutante de variación con ojal L234A, L235A de IgG1], un polipéptido unido por disulfuro de la variante de botón de la región Fc de mutante L234A, L235A de IgG1 y una cadena ligera de Ig, en el que el complejo se une específicamente al IGF-1R humano, y a linfocitos T específicos en la proporción respectiva (de 1:1,5 a 1:0,5) (véase la figura 13). El porcentaje de lisis se denota por encima de las barras respectivas. El anticuerpo monoclonal de IgG1 afucosilado dirigido contra el IGF-1R humano (anticuerpo afucosilado anti-IGF-1R) y el anticuerpo anti-digoxigenina humana de no unión (anticuerpo anti-digoxigenina) no desencadenaron una lisis de células diana significativa.

Ejemplo 7

Eficacia *in vitro*

La línea celular H460M2 de adenocarcinoma de pulmón positiva para IGF-1R se incubó con 1 μ g/ml de un complejo que comprende un péptido derivado de hCMV y un anticuerpo anti-IGF-1R y linfocitos T positivos para CD8 específicos de CMV humano en una proporción baja de células efectoras con respecto a células diana (de 1,5 a 0,5 linfocitos T específicos por célula tumoral). El anticuerpo de control fue un anticuerpo anti-IGF-1R glucomodificado. El tiempo de incubación fue de 6 horas. La incubación con el complejo da como resultado una eliminación potente de las células tumorales H460M2.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> F. Hoffmann-La Roche AG
- 5 <120> Eliminación de células diana mediante linfocitos T citotóxicos específicos de virus en circulación usando complejos que comprenden MHC de clase I
- <130> 27493
- 10 <150> EP11171027.3
<151> 22-06-2011
- <160> 112
- 15 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
<211> 9
<212> PRT
- 20 <213> Citomegalovirus humano
- <400> 1
- Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val
1 5
- 25 <210> 2
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus de la inmunodeficiencia humana
- 30 <400> 2
- Ser Leu Tyr Asn Thr Val Ala Thr Leu
1 5
- 35 <210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> Herpesvirus humano 4
- 40 <400> 3
- Gly Leu Cys Thr Leu Val Ala Met Leu
1 5
- 45 <210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus de la gripe A
- <400> 4
- 50 Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu
1 5
- 55 <210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus de la hepatitis B
- <400> 5

Ser Thr Asn Arg Gln Ser Gly Arg Gln
 1 5
 <210> 6
 <211> 9
 5 <212> PRT
 <213> Virus linfotrópico de linfocitos T humano de tipo 1
 <400> 6
 Leu Leu Phe Gly Tyr Pro Val Tyr Val
 10 1 5
 <210> 7
 <211> 9
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Homólogo del oncogén del virus de sarcoma V-jun 17 (JUN)
 20 <400> 7
 Phe Ala Glu Gly Phe Val Arg Ala Leu
 1 5
 <210> 8
 25 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Adenovirus humano de tipo 3
 <400> 8
 30 Leu Ile Val Ile Gly Ile Leu Ile Leu
 1 5
 <210> 9
 <211> 8
 35 <212> PRT
 <213> Virus de la hepatitis C
 <400> 9
 Ile Leu His Thr Pro Gly Cys Val
 40 1 5
 <210> 10
 <211> 99
 <212> PRT
 45 <213> *Homo sapiens*
 <400> 10
 Ile Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln Val Tyr Ser Arg His Pro Ala Glu

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

Arg Asp Met

<210> 11
<211> 274
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 11

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

Tyr His Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Lys Glu

ES 2 667 864 T3

115	120	125
Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Met Ala Ala Gln Thr Thr Lys		
130	135	140
His Lys Trp Glu Ala Ala His Val Ala Glu Gln Leu Arg Ala Tyr Leu		
145	150	155
Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys		
	165	170
Glu Thr Leu Gln Arg Thr Asp Ala Pro Lys Thr His Met Thr His His		
	180	185
Ala Val Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Ser Phe		
	195	200
Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln		
	210	215
Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr		
225	230	235
Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Gln Glu Gln Arg		
	245	250
Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Lys Pro Leu Thr Leu		
	260	265
		270

Arg Trp

<210> 12

<211> 2

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido enlazador 1

10

<400> 12

Gly Ser

1

15 <210> 13

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Péptido enlazador 2

<400> 13

Gly Gly Ser
1

5 <210> 14
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Péptido enlazador 3

<400> 14

Gly Gly Gly Ser
1

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

20 <220>
<223> Péptido enlazador 4

25 <400> 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5

30 <210> 16
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Péptido enlazador 5

<400> 16

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

40 <210> 17
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Péptido enlazador 6

<400> 17

50 **Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser**
1 5 10 15

55 <210> 18
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido enlazador 7

<400> 18

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

Gly Gly Gly Ser
20

5

<210> 19
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Péptido enlazador 8

<400> 19

15

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 20
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20

<220>
<223> Péptido enlazador 9

25

<400> 20

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

30

<210> 21
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<223> Péptido enlazador 10

<400> 21

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

40

<210> 22
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45

<220>
<223> Péptido enlazador 11

50

<400> 22

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

Gly Gly Gly Ser
20

<210> 23
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido enlazador 12

<400> 23

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25

<210> 24
<211> 15
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 24

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15

<210> 25
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Variante de polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de IgG1 humana

<400> 25

Glu Pro Lys Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15

<210> 26
<211> 12
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 26

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 27
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Variante 1 de polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de IgG2 humana

<400> 27

Glu Arg Lys Cys Ala Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 28

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Variante 2 del polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de IgG2 humana

<400> 28

Glu Arg Lys Ala Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 29

<211> 62

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 29

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys
1 5 10 15

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
20 25 30

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu
35 40 45

Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
50 55 60

<210> 30

<211> 12

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 30

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro
1 5 10

<210> 31

<211> 107

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 31

ES 2 667 864 T3

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
1 5 10 15

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
20 25 30

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
35 40 45

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
50 55 60

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
65 70 75 80

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
85 90 95

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
100 105

<210> 32

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio CH2 de IgG1 humana con las mutaciones L234A y L235A

<400> 32

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

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
20 25 30

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
35 40 45

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
50 55 60

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
65 70 75 80

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
85 90 95

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
100 105

15

<210> 33
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Dominio CH2 de IgG humana con las mutaciones L234A, L235A y P329G

<400> 33

10

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

<210> 34
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 34

20

Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu
1				5				10						15	

ES 2 667 864 T3

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
20 25 30

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
35 40 45

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
50 55 60

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
65 70 75 80

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
100 105

<210> 35

<211> 105

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Variante de botón del dominio CH3 de IgG1 humana

<400> 35

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu
1 5 10 15

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
20 25 30

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
35 40 45

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
50 55 60

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
65 70 75 80

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
100 105

<210> 36

<211> 105

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Variante de ojal del dominio CH3 de IgG1 humana

5

<400> 36

Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
1 5 10 15

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro
20 25 30

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
35 40 45

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
50 55 60

Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
65 70 75 80

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
100 105

10

<210> 37

<211> 232

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

15

<400> 37

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
35 40 45

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

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln

65				70				75				80			
Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr 85	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His 95	Gln
Asp	Trp	Leu	Asn 100	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys 105	Cys	Lys	Val	Ser	Asn 110	Lys	Ala
Leu	Pro	Ala 115	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr 120	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys 125	Gly	Gln	Pro
Arg	Glu 130	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr 135	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg 140	Asp	Glu	Leu	Thr
Lys 145	Asn	Gln	Val	Ser	Leu 150	Thr	Cys	Leu	Val	Lys 155	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser 160
Asp	Ile	Ala	Val	Glu 165	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly 170	Gln	Pro	Glu	Asn 175	Asn	Tyr
Lys	Thr	Thr	Pro 180	Pro	Val	Leu	Asp 185	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe 190	Leu	Tyr
Ser	Lys	Leu 195	Thr	Val	Asp	Lys	Ser 200	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly 205	Asn	Val	Phe
Ser	Cys 210	Ser	Val	Met	His	Glu 215	Ala	Leu	His	Asn 220	His	Tyr	Thr	Gln	Lys
Ser 225	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro 230	Gly	Lys								

<210> 38
<211> 232
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Región Fc de la cadena pesada de IgG1 humana con las mutaciones L234A y L235A

<400> 38

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val

ES 2 667 864 T3

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

<210> 39

<211> 232

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Región Fc de la cadena pesada de IgG1 humana con las mutaciones L234A y L235A como variante de ojal

<400> 39

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

ES 2 667 864 T3

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

<210> 40

<211> 232

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 667 864 T3

<220>

<223> Región Fc de la cadena pesada de IgG1 humana con la variante de botón de las mutaciones L234A y L235A

5 <400> 40

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
35 40 45

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

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr
130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 41
<211> 215
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena ligera de Ig

<400> 41

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Lys Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Lys Trp Pro Pro
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ser Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys

ES 2 667 864 T3

195

200

205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 42

<211> 448

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada de Ig (mutante L234A, L235A de IgG1)

<400> 42

Gln Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Gln Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ala Ile Ile Trp Phe Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

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

Leu Val Ser Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 43
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cadena pesada de Ig (mutante L234A, L235A de IgG1 con variación de botón)

<400> 43

Gln Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Gln Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Ala Ile Ile Trp Phe Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

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

Leu Val Ser Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205

ES 2 667 864 T3

Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr
210						215					220				
His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser
225					230					235					240
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg
				245					250					255	
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro
			260					265					270		
Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala
		275					280					285			
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val
	290					295					300				
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr
305					310					315					320
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr
				325					330					335	
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu
			340					345					350		
Pro	Pro	Cys	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Trp	Cys
		355					360					365			
Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser
	370					375					380				
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp
385					390					395					400
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser
				405					410					415	
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala
			420					425					430		
Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys
		435					440					445			

<210> 44
 <211> 448
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada de Ig (mutante L234A, L235A de IgG1 con variación de ojal)

5

<400> 44

```

Gln Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1          5          10          15

Ser Gln Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
          20          25          30

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

Ala Ile Ile Trp Phe Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
          50          55          60

Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75          80

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

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

Leu Val Ser Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
          115          120          125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
          130          135          140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145          150          155          160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
          165          170          175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
          180          185          190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
          195          200          205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
          210          215          220

```

ES 2 667 864 T3

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu
 340 345 350
 Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
 355 360 365
 Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 45
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Región Fc de la cadena pesada de Ig (región Fc de mutante L234A, L235A de IgG1)

ES 2 667 864 T3

<400> 45

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

<210> 46
 <211> 246
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> scFv

<400> 46

10

Gln Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Gln Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Ala Ile Ile Trp Phe Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

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

Leu Val Ser Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln
 130 135 140

Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser
 145 150 155 160

Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
 165 170 175

Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Lys Arg
 180 185 190

Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 195 200 205

ES 2 667 864 T3

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr
210 215 220

Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Lys Trp Pro Pro Trp Thr Phe Gly Cys Gly
225 230 235 240

Thr Lys Val Glu Ser Lys
245

<210> 47
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 47

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 48
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 48

Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro
1 5

<210> 49
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 49

Ala Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro
1 5

<210> 50
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 50

Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys Pro
1 5 10

<210> 51
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 51

Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro
1 5

<210> 52
<211> 9
<212> PRT
<213> *Virus del dengue*

<400> 52

Trp Tyr Ala Gln Ile Gln Pro His Trp
1 5

5 <210> 53
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus del dengue

10 <400> 53

Ala Phe Ser Gly Val Ser Trp Thr Met
1 5

15 <210> 54
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus del dengue

20 <400> 54

Ile Leu Ile Gly Val Val Ile Thr Trp
1 5

25 <210> 55
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus del dengue

30 <400> 55

Met Met Ile Pro Thr Val Val Ala Phe
1 5

35 <210> 56
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus del dengue

<400> 56

Pro Phe Pro Gln Ser Asn Ala Pro Ile
1 5

40 <210> 57
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus del dengue

45 <400> 57

Leu Leu Leu Thr Leu Leu Ala Thr Val
1 5

50 <210> 58
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus del dengue

55 <400> 58

Ile Val Leu Glu His Gly Ser Cys Val
1 5

<210> 59
 <211> 9
 <212> PRT
 5 <213> Virus del dengue

 <400> 59

 Leu Leu Phe Lys Thr Glu Asn Gly Val
 1 5
 10
 <210> 60
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Virus del dengue
 15
 <400> 60

 Pro Leu Asn Glu Ala Ile Met Ala Val
 1 5
 20
 <210> 61
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Virus del dengue
 25
 <400> 61

 Asn Leu Val Arg Leu Gln Ser Gly Val
 1 5
 30
 <210> 62
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Virus del dengue

 <400> 62
 35
 Leu Val Ile Ser Gly Leu Phe Pro Val
 1 5

 <210> 63
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Virus del dengue
 40
 <400> 63

 Leu Leu Leu Val Ala His Tyr Ala Ile
 1 5
 45
 <210> 64
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Virus del dengue
 50
 <400> 64

 Leu Ala Leu Leu Ala Ala Phe Lys Val
 1 5
 55
 <210> 65
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Virus del dengue

<400> 65

Val Ile Leu Ala Gly Pro Met Pro Val
1 5

5

<210> 66

<211> 9

<212> PRT

<213> Virus del dengue

10

<400> 66

His Val Leu Gly Arg Leu Ile Thr Val
1 5

15

<210> 67

<211> 9

<212> PRT

<213> Citomegalovirus humano

20

<400> 67

Val Thr Glu His Asp Thr Leu Leu Tyr
1 5

25

<210> 68

<211> 9

<212> PRT

<213> Citomegalovirus humano

30

<400> 68

Asn Thr Asp Phe Arg Val Leu Glu Leu
1 5

35

<210> 69

<211> 9

<212> PRT

<213> Citomegalovirus humano

40

<400> 69

Cys Val Glu Thr Met Cys Asn Glu Tyr
1 5

45

<210> 70

<211> 9

<212> PRT

<213> Citomegalovirus humano

<400> 70

Val Leu Glu Glu Thr Ser Val Met Leu
1 5

50

<210> 71

<211> 9

<212> PRT

<213> Citomegalovirus humano

<400> 71

Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val
 1 5
 <210> 72
 <211> 9
 5 <212> PRT
 <213> Citomegalovirus humano
 <400> 72
 Arg Ile Phe Ala Glu Leu Glu Gly Val
 10 1 5
 <210> 73
 <211> 9
 <212> PRT
 15 <213> Citomegalovirus humano
 <400> 73
 Ile Ile Tyr Thr Arg Asn His Glu Val
 20 1 5
 <210> 74
 <211> 9
 <212> PRT
 25 <213> Citomegalovirus humano
 <400> 74
 Val Leu Ala Glu Leu Val Lys Gln Ile
 30 1 5
 <210> 75
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Citomegalovirus humano
 35 <400> 75
 Ala Val Gly Gly Ala Val Ala Ser Val
 40 1 5
 <210> 76
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Citomegalovirus humano
 <400> 76
 45 Thr Val Arg Ser His Cys Val Ser Lys
 1 5
 <210> 77
 <211> 9
 50 <212> PRT
 <213> Citomegalovirus humano
 <400> 77
 Ile Met Arg Glu Phe Asn Ser Tyr Lys
 55 1 5
 <210> 78

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Citomegalovirus humano
 5 <400> 78
 Gly Pro Ile Ser His Gly His Val Leu Lys
 1 5 10
 <210> 79
 10 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Citomegalovirus humano
 <400> 79
 15 Ala Thr Val Gln Gly Gln Asn Leu Lys
 1 5
 <210> 80
 <211> 9
 20 <212> PRT
 <213> Citomegalovirus humano
 <400> 80
 Val Tyr Ala Leu Pro Leu Lys Met Leu
 25 1 5
 <210> 81
 <211> 10
 <212> PRT
 30 <213> Citomegalovirus humano
 <400> 81
 Ala Tyr Ala Gln Lys Ile Phe Lys Ile Leu
 35 1 5 10
 <210> 82
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Citomegalovirus humano
 40 <400> 82
 Gln Tyr Asp Pro Val Ala Ala Leu Phe
 1 5
 45 <210> 83
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Citomegalovirus humano
 50 <400> 83
 Tyr Val Lys Val Tyr Leu Glu Ser Phe
 1 5
 55 <210> 84
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Citomegalovirus humano

<400> 84

Asp Ile Tyr Arg Ile Phe Ala Glu Leu
1 5

5 <210> 85
<211> 10
<212> PRT
<213> Citomegalovirus humano

10 <400> 85

Val Phe Glu Thr Ser Gly Gly Leu Val Val
1 5 10

15 <210> 86
<211> 9
<212> PRT
<213> Citomegalovirus humano

20 <400> 86

Lys Ala Arg Asp His Leu Ala Val Leu
1 5

25 <210> 87
<211> 9
<212> PRT
<213> Citomegalovirus humano

30 <400> 87

Gln Ala Arg Leu Thr Val Ser Gly Leu
1 5

35 <210> 88
<211> 9
<212> PRT
<213> Citomegalovirus humano

<400> 88

Lys Ala Arg Ala Lys Lys Asp Glu Leu
1 5

40 <210> 89
<211> 9
<212> PRT

45 <213> Citomegalovirus humano

<400> 89

Gln Ile Lys Val Arg Val Asp Met Val
1 5

50 <210> 90
<211> 9
<212> PRT
<213> Citomegalovirus humano

55 <400> 90

Arg Arg Arg His Arg Gln Asp Ala Leu
 1 5
 <210> 91
 <211> 9
 5 <212> PRT
 <213> Citomegalovirus humano
 <400> 91
 Ala Arg Val Tyr Glu Ile Lys Cys Arg
 10 1 5
 <210> 92
 <211> 9
 <212> PRT
 15 <213> Citomegalovirus humano
 <400> 92
 Lys Met Gln Val Ile Gly Asp Gln Tyr
 20 1 5
 <210> 93
 <211> 9
 <212> PRT
 25 <213> Citomegalovirus humano
 <400> 93
 Asn Val Arg Arg Ser Trp Glu Glu Leu
 1 5
 30 <210> 94
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Citomegalovirus humano
 35 <400> 94
 Cys Pro Ser Gln Glu Pro Met Ser Ile Tyr Val Tyr
 1 5 10
 40 <210> 95
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Citomegalovirus humano
 <400> 95
 45 Lys Pro Gly Lys Ile Ser His Ile Met Leu Asp Val Ala
 1 5 10
 <210> 96
 <211> 9
 50 <212> PRT
 <213> Citomegalovirus humano
 <400> 96
 Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met
 55 1 5
 <210> 97

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Citomegalovirus humano
 5 <400> 97

 Ile Pro Ser Ile Asn Val His His Tyr
 1 5

 <210> 98
 10 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Citomegalovirus humano

 <400> 98
 15 Phe Glu Gln Pro Thr Glu Thr Pro Pro
 1 5

 <210> 99
 <211> 9
 20 <212> PRT
 <213> Citomegalovirus humano

 <400> 99

 Tyr Ala Tyr Ile Tyr Thr Thr Tyr Leu
 25 1 5

 <210> 100
 <211> 11
 <212> PRT
 30 <213> Citomegalovirus humano

 <400> 100

 Gln Glu Phe Phe Trp Asp Ala Asn Asp Ile Tyr
 1 5 10
 35
 <210> 101
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Citomegalovirus humano
 40
 <400> 101

 Tyr Glu Gln His Lys Ile Thr Ser Tyr
 1 5

 <210> 102
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Citomegalovirus humano
 45
 <400> 102

 Gln Glu Pro Met Ser Ile Tyr Val Tyr
 1 5

 <210> 103
 55 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Citomegalovirus humano

<400> 103

Ser Glu His Pro Thr Phe Thr Ser Gln Tyr
1 5 10

5 <210> 104
<211> 9
<212> PRT
<213> Citomegalovirus humano

10 <400> 104

Gln Ala Ile Arg Glu Thr Val Glu Leu
1 5

15 <210> 105
<211> 9
<212> PRT
<213> Citomegalovirus humano

20 <400> 105

Thr Arg Ala Thr Lys Met Gln Val Ile
1 5

25 <210> 106
<211> 8
<212> PRT
<213> Citomegalovirus humano

30 <400> 106

Asp Ala Leu Pro Gly Pro Cys Ile
1 5

35 <210> 107
<211> 9
<212> PRT
<213> Citomegalovirus humano

<400> 107

Cys Glu Asp Val Pro Ser Gly Lys Leu
1 5

40 <210> 108
<211> 9
<212> PRT

45 <213> Citomegalovirus humano

<400> 108

His Glu Arg Asn Gly Phe Thr Val Leu
1 5

50 <210> 109
<211> 13
<212> PRT
<213> Citomegalovirus humano

55 <400> 109

	Pro	Thr	Phe	Thr	Ser	Gln	Tyr	Arg	Ile	Gln	Gly	Lys	Leu
	1				5					10			

<210> 110
 <211> 9
 5 <212> PRT
 <213> Citomegalovirus humano
 <400> 110

	Gln	Met	Trp	Gln	Ala	Arg	Leu	Thr	Val
10	1				5				

<210> 111
 <211> 12
 <212> PRT
 15 <213> Citomegalovirus humano
 <400> 111

	His	Glu	Leu	Leu	Val	Leu	Val	Lys	Lys	Ala	Gln	Leu
	1				5					10		

20 <210> 112
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Citomegalovirus humano
 25 <400> 112

	Asp	Asp	Tyr	Ser	Asn	Thr	His	Ser	Thr	Arg	Tyr	Val
	1				5					10		

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la producción recombinante de un complejo que comprende

i) un polipéptido de fusión que comprende en dirección de extremo N a C un péptido que provoca respuesta de linfocitos T, (microglobulina β_2 y los dominios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de un 1 % o más,

ii) un par de cadenas polipeptídicas unidas por disulfuro derivadas de una región bisagra de anticuerpo, y en las que cada cadena polipeptídica unida por disulfuro comprende un dominio CH2 y un dominio CH3 de origen humano, en las que un dominio CH3 comprende la mutación T366W y el otro dominio CH3 comprende las mutaciones T366S, L368A e Y407V (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat); y

iii) al menos un par de un dominio variable de la cadena ligera de anticuerpo y un dominio variable de la cadena pesada de anticuerpo en una célula eucariota,

que comprende las siguientes etapas:

- cultivar una célula eucariota que comprende uno o más ácidos nucleicos que codifican el complejo, y

- recuperar el complejo de la célula o del medio de cultivo,

en el que el complejo comprende exactamente un polipéptido de fusión de un péptido que provoca respuesta de linfocitos T, (microglobulina β_2 y los dominios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de una molécula de MHC de clase I, y

en el que el polipéptido de fusión

- se une covalentemente ya sea al extremo C o al extremo N de una de las cadenas polipeptídicas unidas por disulfuro, o

- se une covalentemente al extremo N de un dominio variable de anticuerpo que es el dominio variable de la cadena pesada o ligera complementario al comprendido en la primera cadena polipeptídica unida por disulfuro, o

- se une covalentemente al extremo C de un dominio constante de anticuerpo que es el dominio constante de la cadena pesada o ligera complementario al comprendido en la primera cadena polipeptídica unida por disulfuro.

2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que el complejo se obtiene con una concentración de 1 mg/ml o más en el medio de cultivo.

3. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que la célula eucariota es una célula de mamífero.

4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado por que la célula de mamífero es una célula de riñón embrionario humana, o una célula de ovario de hámster chino, o una célula de riñón de cría de hámster, o una célula de mieloma de ratón.

5. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que las cadenas polipeptídicas unidas por disulfuro derivadas de una región bisagra de anticuerpo i) se unen mediante uno o más enlaces disulfuro, ii) la primera cadena polipeptídica unida por disulfuro comprende en dirección de extremo N a C un dominio variable de la cadena ligera o pesada de inmunoglobulina, un dominio constante de la cadena ligera o pesada de inmunoglobulina y un polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo, y la segunda cadena polipeptídica unida por disulfuro comprende un polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo.

6. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que el péptido que provoca respuesta de linfocitos T es un péptido derivado de virus.

7. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que el polipéptido de fusión comprende en dirección de extremo N a C

(i) un péptido derivado de virus que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 01 a SEQ ID NO: 09,

- (ii) un primer péptido enlazador que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 16, 17, 18, 21, 22 y 23,
- 5 (iii) una microglobulina β_2 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10,
- (iv) un segundo péptido enlazador que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 16, 17, 18, 21, 22 y 23,
- 10 (v) los dominios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de una molécula de MHC de clase I que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, y
- (vi) un tercer péptido enlazador que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 12, 16, 17, 18, 21, 22 y 23.
- 15 8. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que la primera cadena polipeptídica unida por disulfuro y la segunda cadena polipeptídica unida por disulfuro comprenden i) un dominio CH2 de IgG1 humana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 31, 32 y 33, y un dominio CH3 de IgG1 humana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 34, 35 y 36.
- 20 9. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8, caracterizado por que el complejo comprende i) un primer péptido enlazador que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 21, y/o ii) un segundo péptido enlazador que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22, y/o iii) un tercer péptido enlazador que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, y/o iv) un dominio CH2 de IgG1 humana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32 o 33, y/o v) en el primer polipéptido unido por disulfuro un dominio CH3 de IgG1 humana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 35 y en el segundo polipéptido unido por disulfuro un dominio CH3 de IgG1 humana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36.
- 25 30 10. Un complejo, caracterizado por que comprende
- un polipéptido de fusión que comprende en dirección de extremo N a C
- 35 (i) un péptido que provoca respuesta de linfocitos T,
- (ii) una microglobulina β_2 , y
- (iii) los dominios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia
- 40 relativa de un 1 % o más,
- y
- dos cadenas polipeptídicas, que se unen mediante uno o más enlaces disulfuro,
- 45 en el que la primera cadena polipeptídica unida por disulfuro comprende en dirección de extremo N a C
- (i) un dominio variable de la cadena ligera o pesada de inmunoglobulina,
- 50 (ii) un dominio constante de la cadena ligera o pesada de inmunoglobulina, y
- (iii) un polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo,
- y
- 55 en el que la segunda cadena polipeptídica unida por disulfuro comprende un polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo, en el que la primera cadena polipeptídica unida por disulfuro y la segunda cadena polipeptídica unida por disulfuro comprenden ambas un dominio CH2 y un dominio CH3 de origen humano, en las que un dominio CH3 comprende la mutación T366W y el otro dominio CH3 comprende las mutaciones T366S, L368A e Y407V (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat);
- 60 en el que el polipéptido de fusión
- se une covalentemente ya sea al extremo C o al extremo N de una de las cadenas polipeptídicas unidas por
- 65 disulfuro, o

- se une covalentemente al extremo N de un dominio variable de anticuerpo que es el dominio variable de la cadena pesada o ligera complementario al comprendido en la primera cadena polipeptídica unida por disulfuro, o
 - 5 - se une covalentemente al extremo C de un dominio constante de anticuerpo que es el dominio constante de la cadena pesada o ligera complementario al comprendido en la primera cadena polipeptídica unida por disulfuro
- con la condición de que el complejo comprenda exactamente un polipéptido de fusión.
- 10 11. El complejo de la reivindicación 10, caracterizado por que el péptido que provoca respuesta de linfocitos T es un péptido derivado de virus.
12. El complejo de una cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, caracterizado por que el polipéptido de fusión
- 15 comprende en dirección de extremo N a C
- (i) un péptido derivado de virus que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 01 a SEQ ID NO: 09,
 - 20 (ii) un primer péptido enlazador que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 16, 17, 18, 21, 22 y 23.
 - (iii) una microglobulina β_2 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10,
 - 25 (iv) un segundo péptido enlazador que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 16, 17, 18, 21, 22 y 23.
 - (v) los dominios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de una molécula de MHC de clase I que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, y
 - 30 (vi) un tercer péptido enlazador que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 12, 16, 17, 18, 21, 22 y 23.
13. El complejo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, caracterizado por que el primer polipéptido unido por disulfuro y el segundo polipéptido unido por disulfuro comprenden adicionalmente
- 35 - un dominio CH2 de IgG1 humana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 31, 32 y 33, y
- 40 - un dominio CH3 de IgG1 humana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 34, 35 y 36.
14. El complejo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, caracterizado por que
- 45 - el primer péptido enlazador tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21, y/o
- el segundo péptido enlazador tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22, y/o
- 50 - el tercer péptido enlazador tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, y/o
- el dominio CH2 de IgG1 humana tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32 o 33, y/o
- el dominio CH3 de IgG1 humana de un polipéptido unido por disulfuro tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 y el dominio CH3 de IgG1 humana del otro polipéptido unido por disulfuro tiene la
- 55 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36.
15. Un ácido nucleico que codifica el complejo de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14.
16. Una célula huésped que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 15.
- 60 17. Una formulación farmacéutica que comprende el complejo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14 y opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.
18. El complejo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14 para su uso como medicamento.
- 65 19. El complejo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14 para su uso en el tratamiento del

cáncer o de una infección vírica crónica.

5

20. El complejo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14 para su uso en el tratamiento mediante la atracción de linfocitos T citotóxicos específicos de virus de un individuo a una diana.
21. El complejo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14 para su uso en el tratamiento mediante la eliminación de células cancerosas o de células infectadas por virus.

Fig. 1

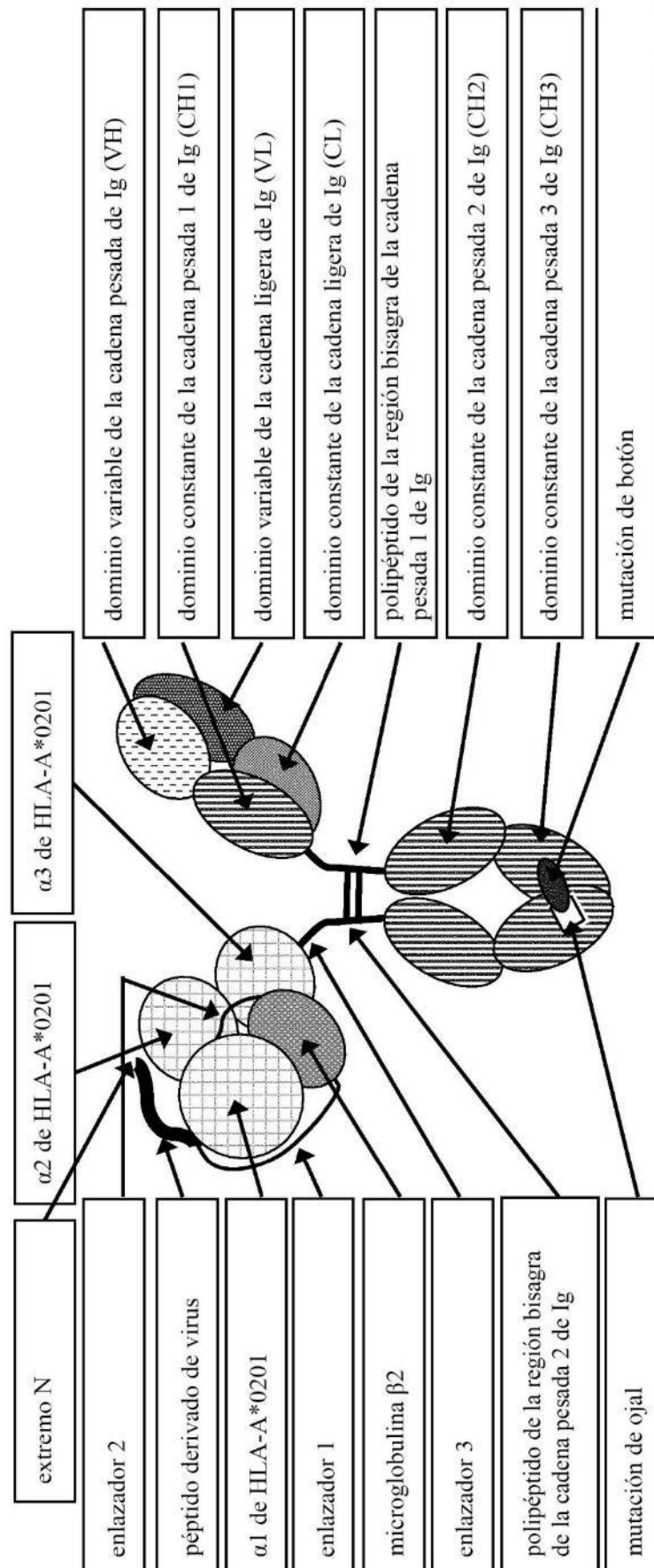


Fig. 2

péptido señal	péptido derivado de virus	microglobulina $\beta 2$	$\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$ de MHC I	cadena ligera de anticuerpo/región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo que comprende el polipéptido
	péptido señal	microglobulina $\beta 2$	$\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$ de MHC I	cadena ligera de anticuerpo/región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo que comprende el polipéptido
péptido señal	péptido derivado de virus	$\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$ de MHC I	microglobulina $\beta 2$	cadena ligera de anticuerpo/región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo que comprende el polipéptido
	péptido señal	$\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$ de MHC I	microglobulina $\beta 2$	cadena ligera de anticuerpo/región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo que comprende el polipéptido

Fig. 3

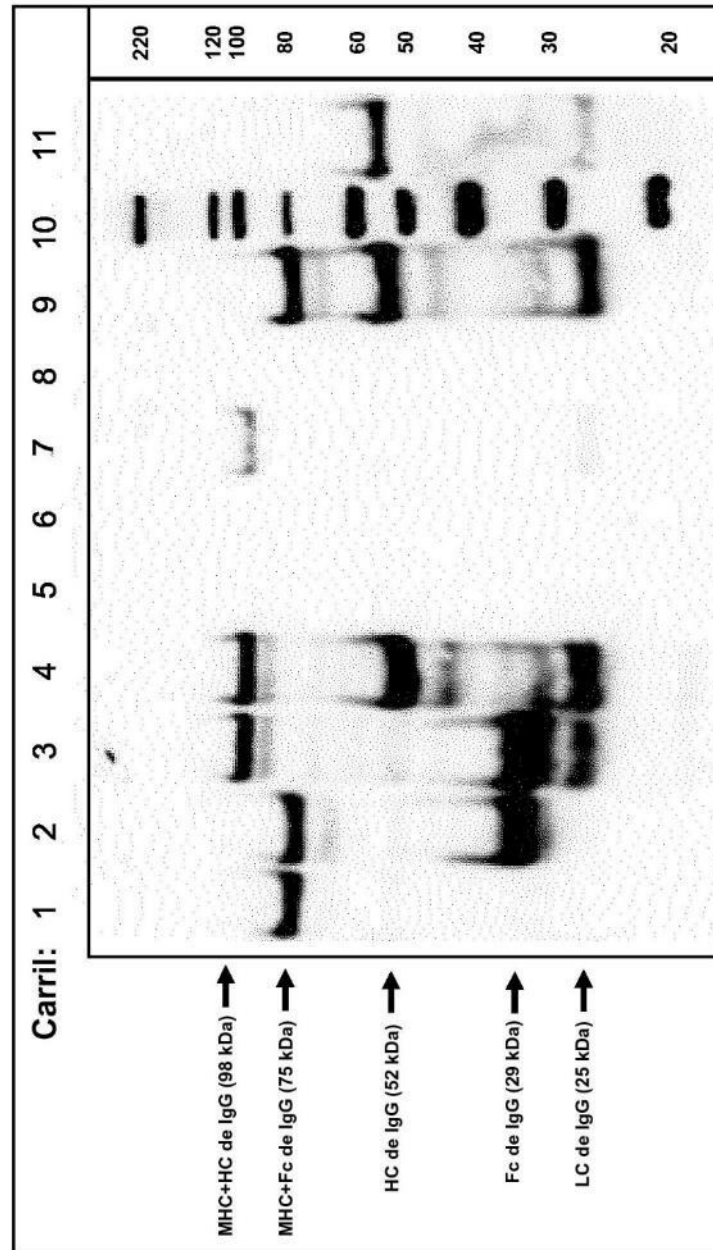


Fig. 4a

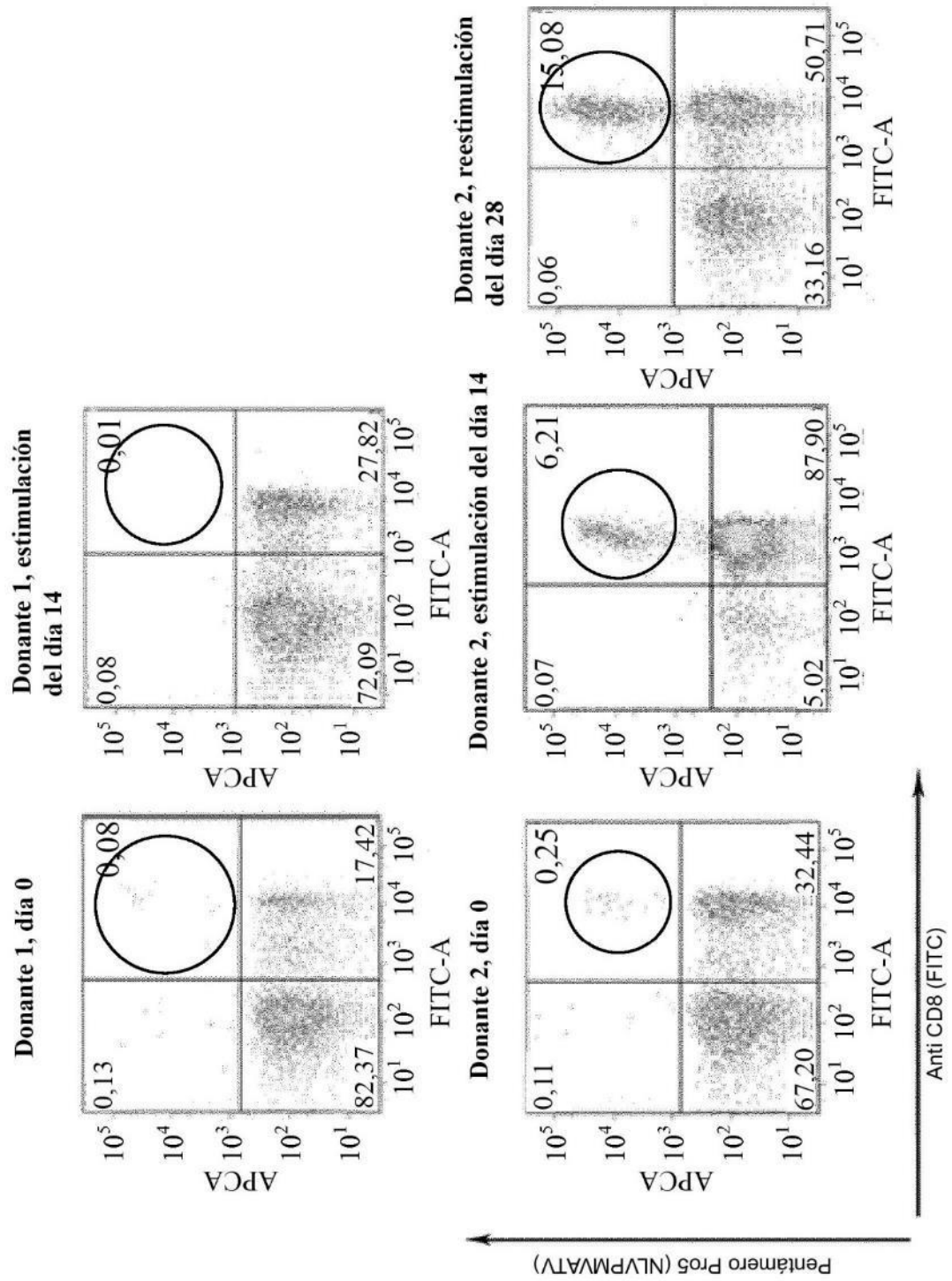


Fig. 4b

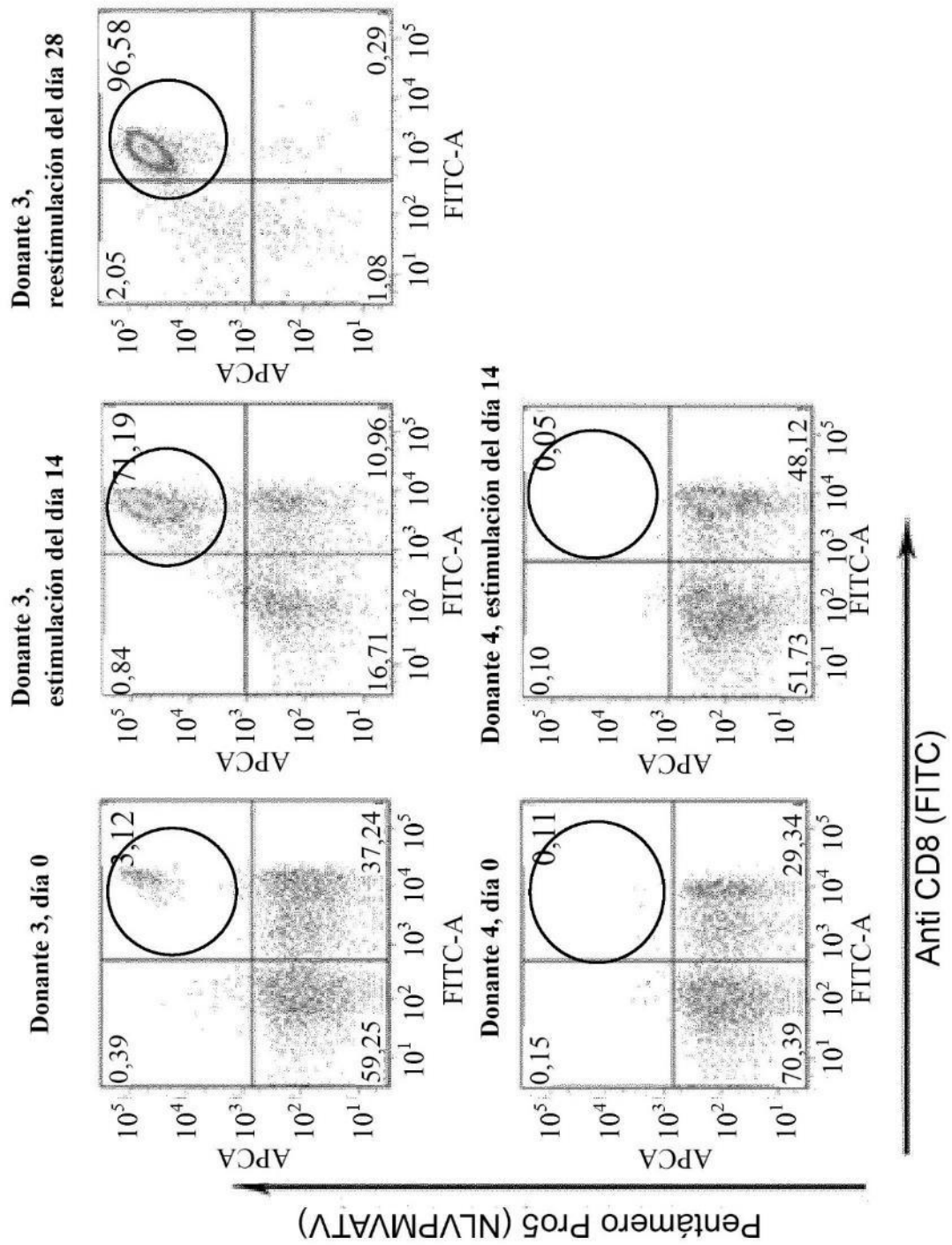


Fig. 5a

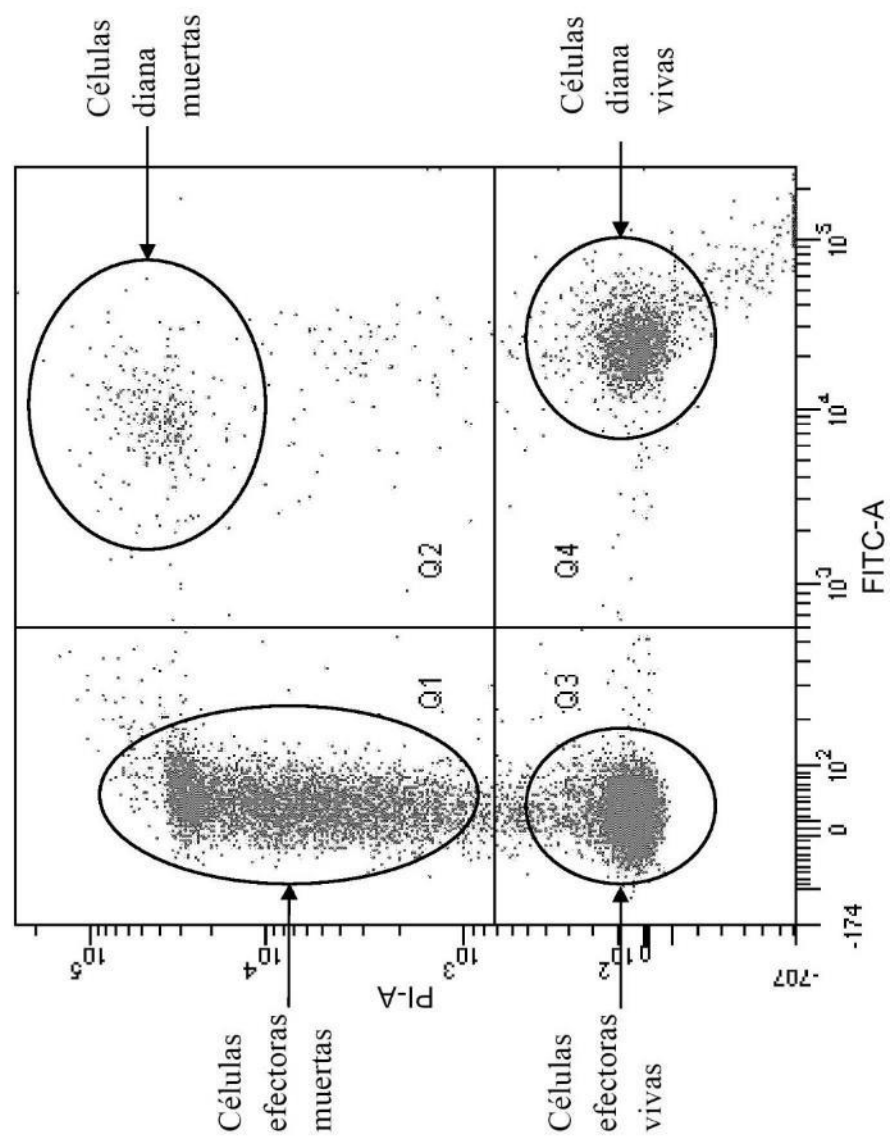


Fig. 5b

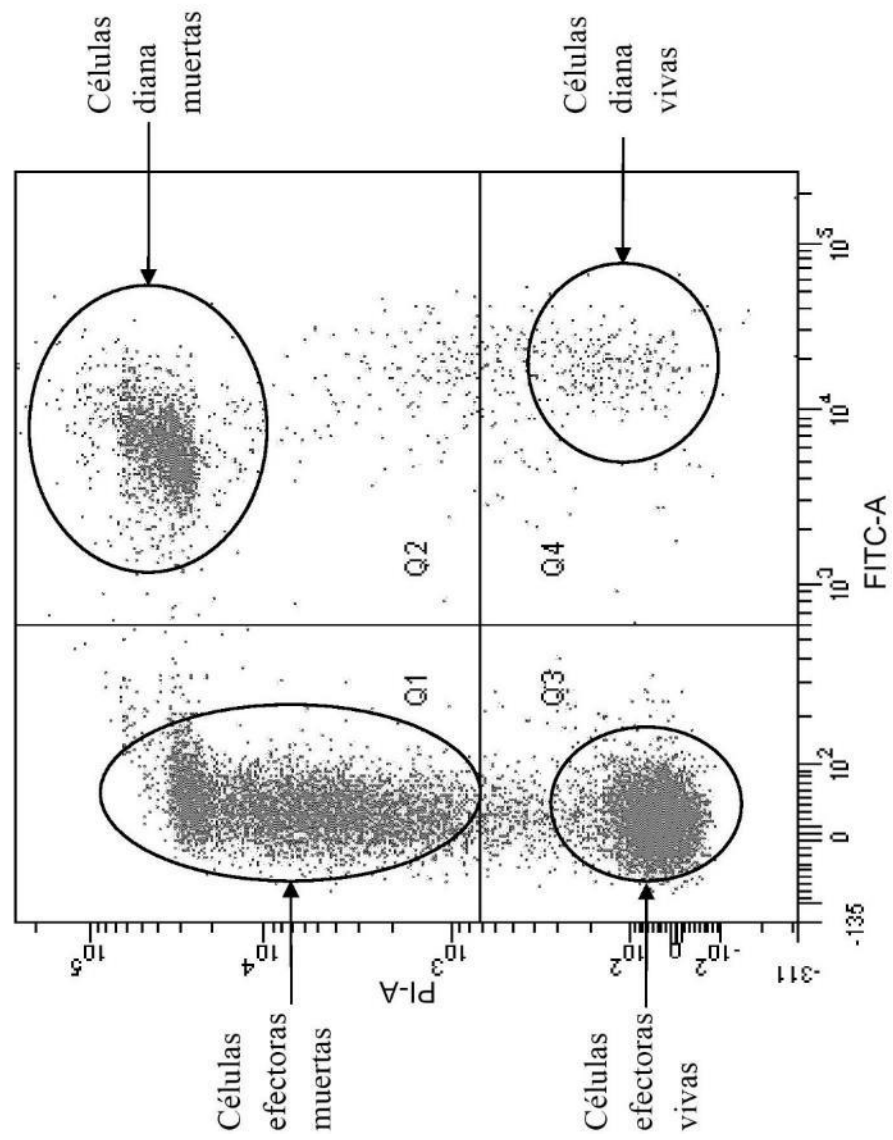


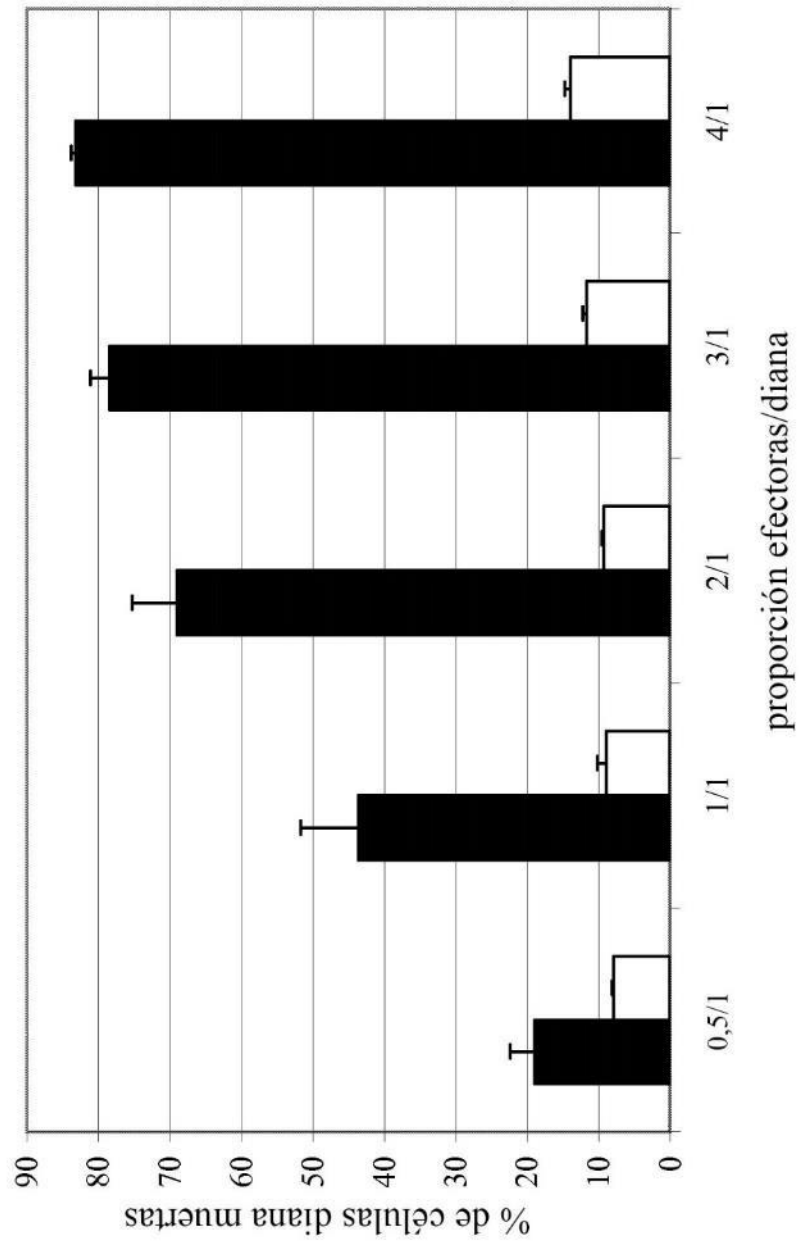
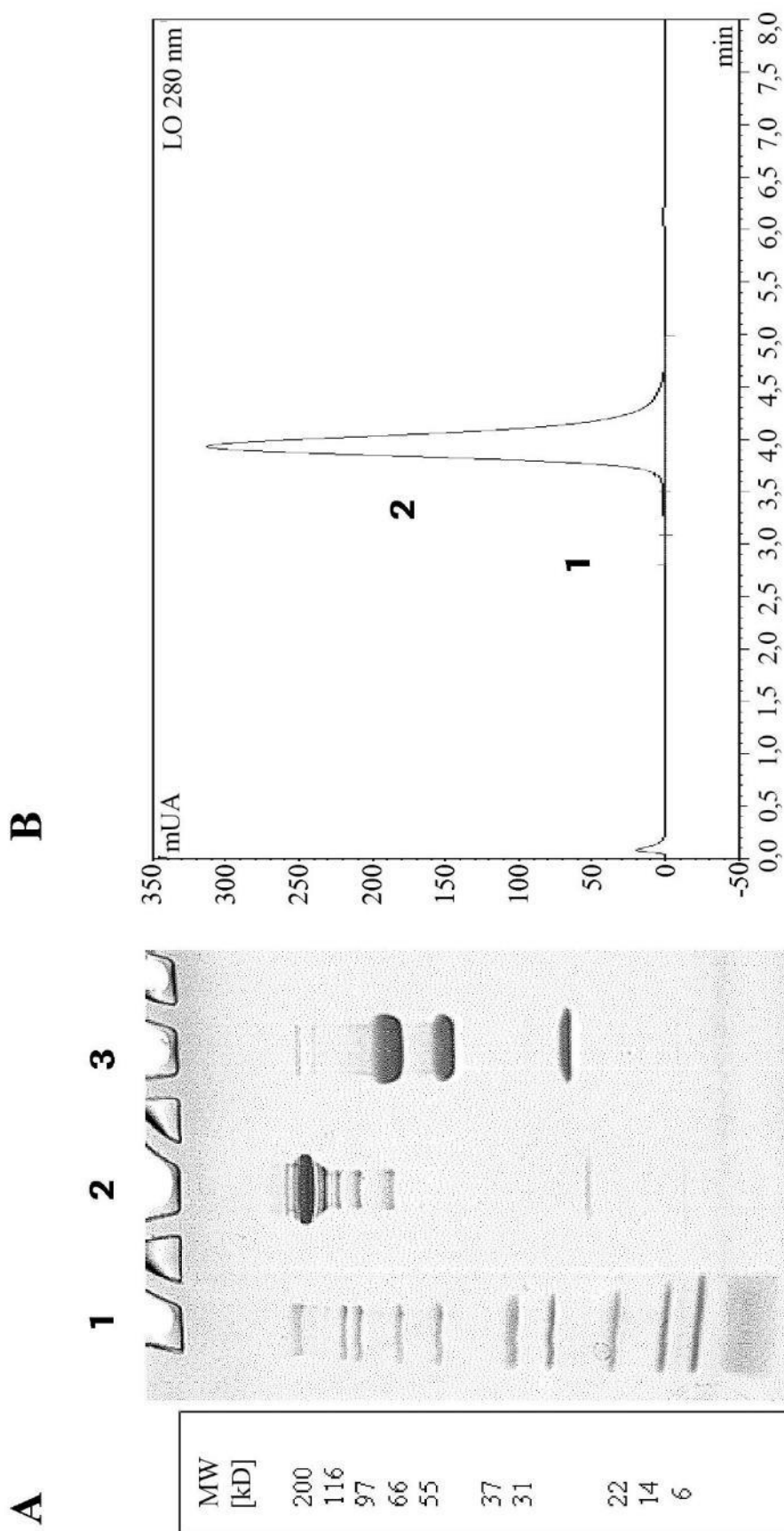
Fig. 6

Fig. 7



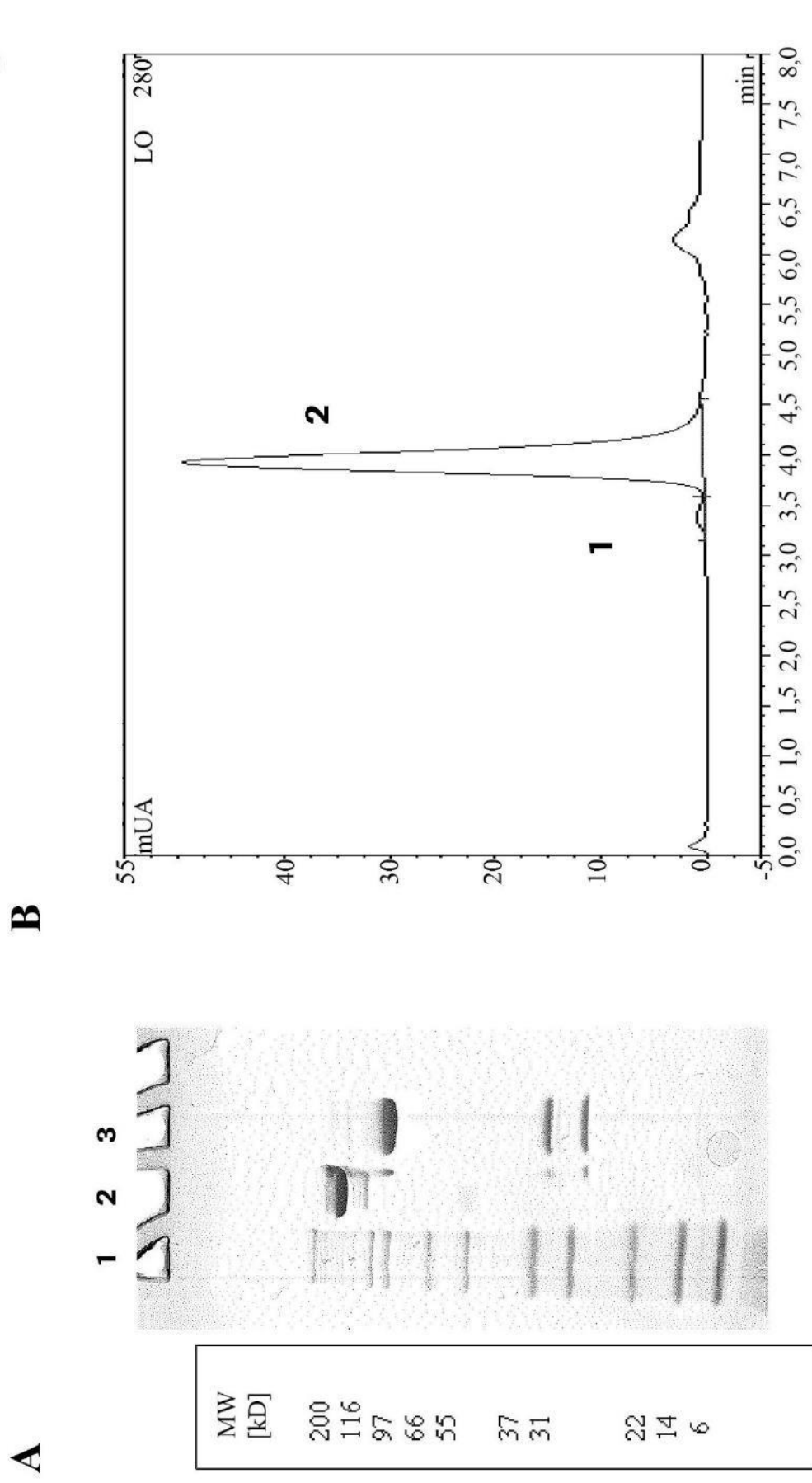


Fig. 8

Fig. 9a

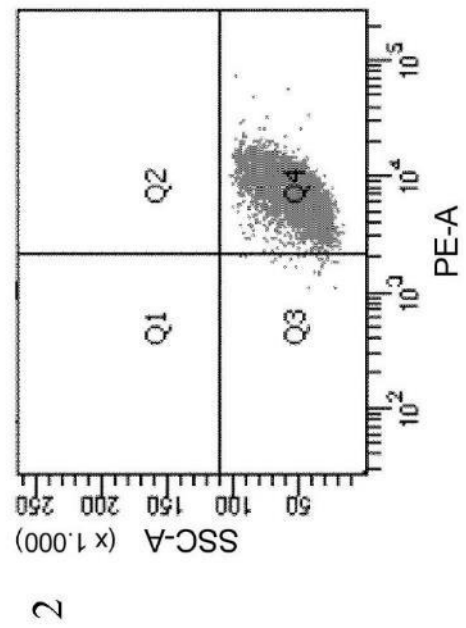
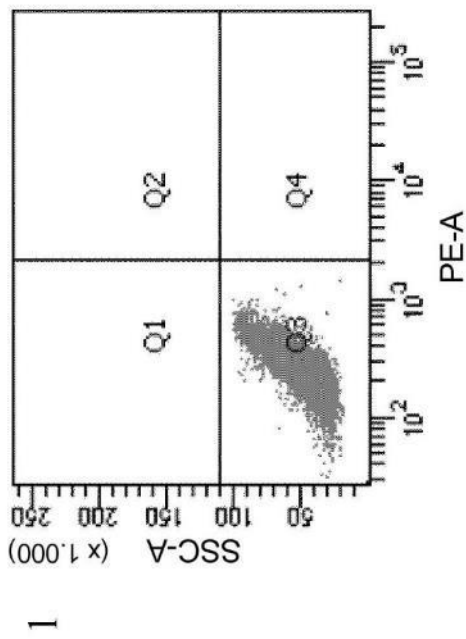
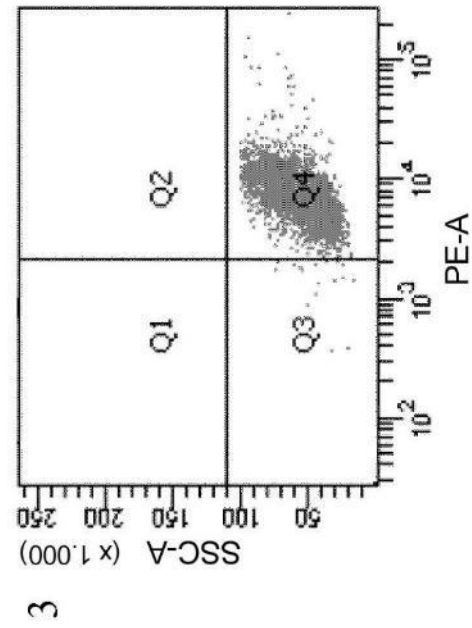
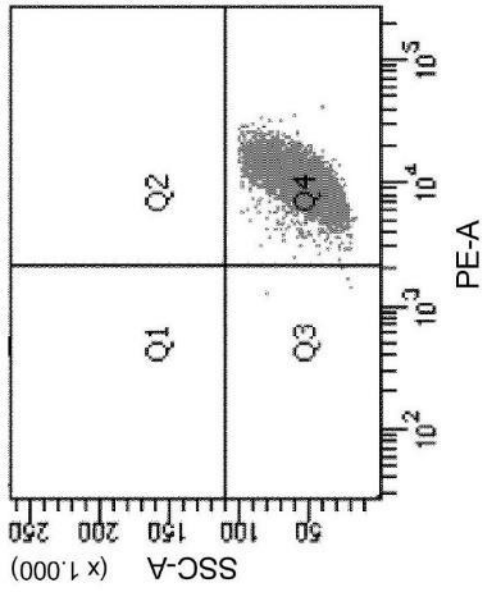
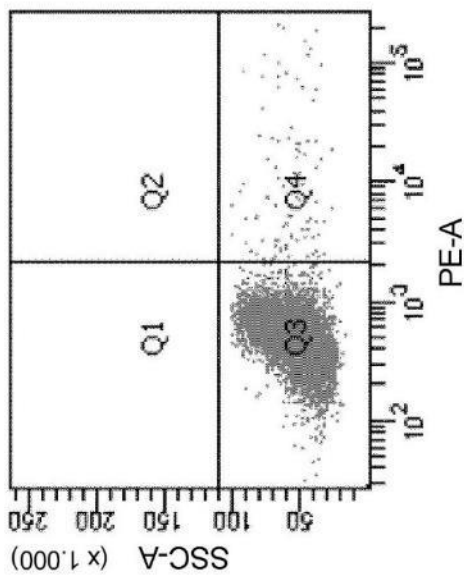


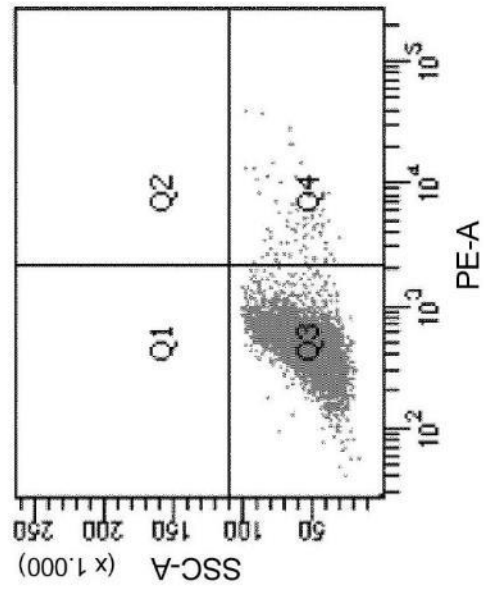
Fig. 9b



6



4



5

Fig. 10

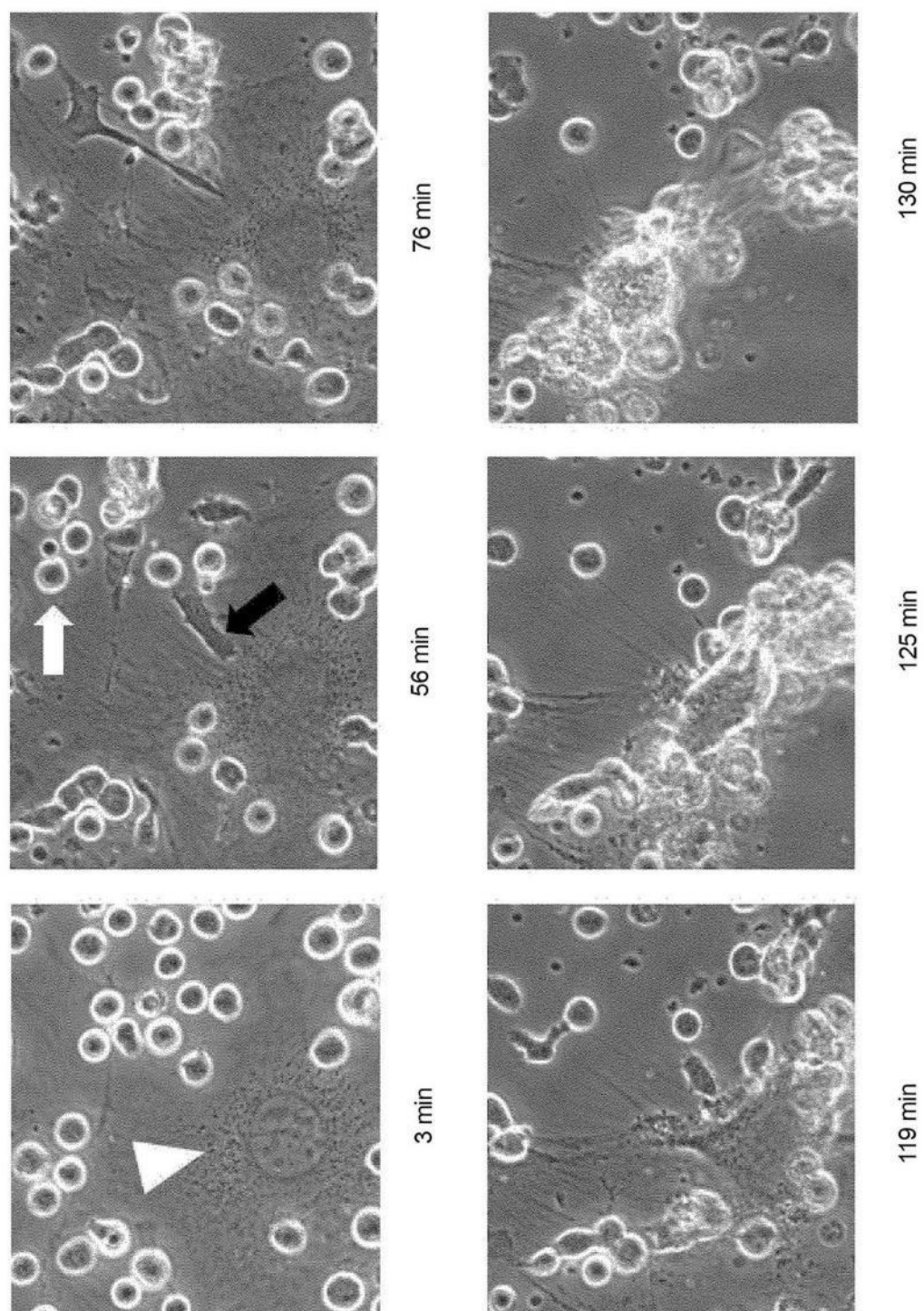


Fig. 11

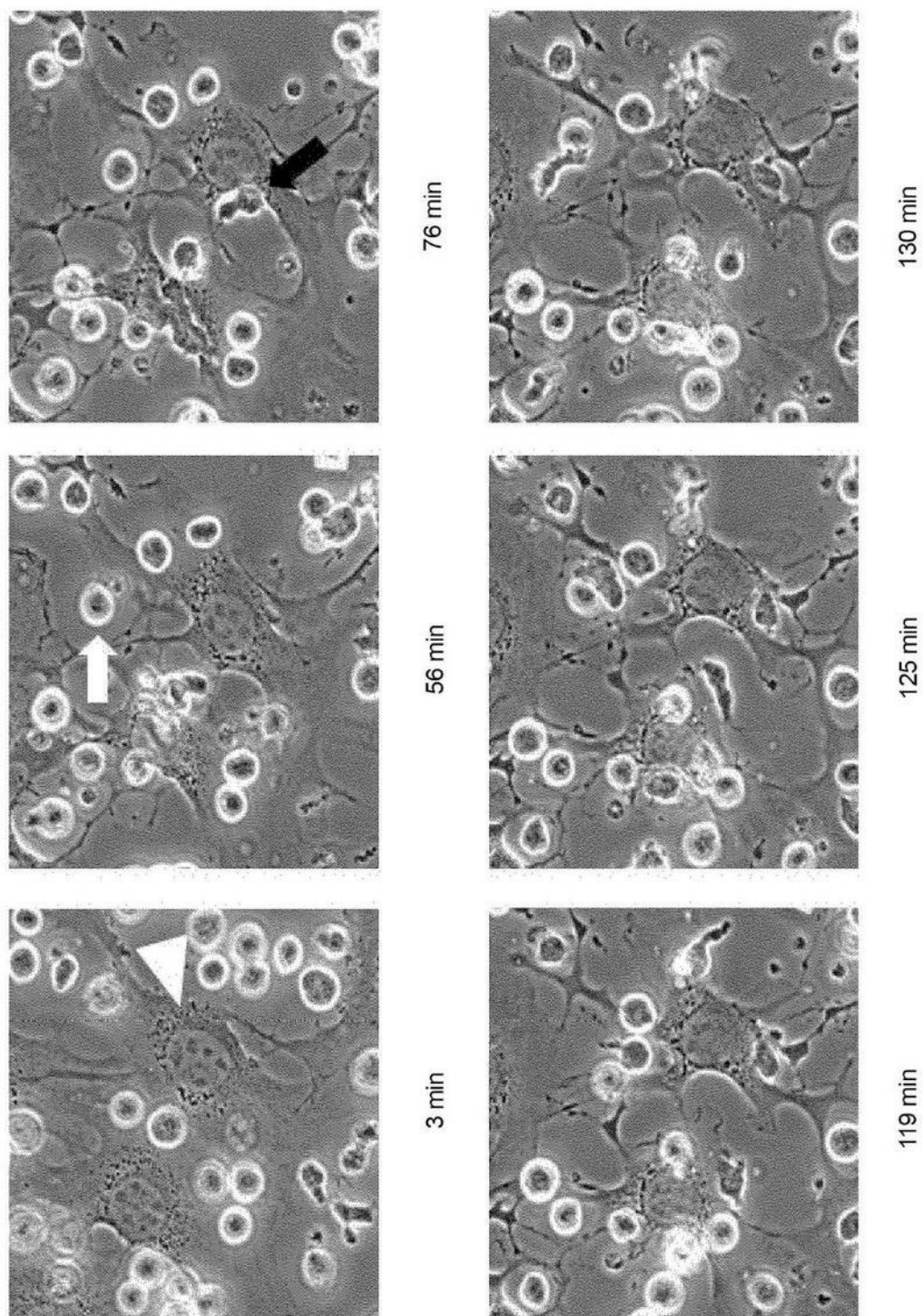


Fig. 12

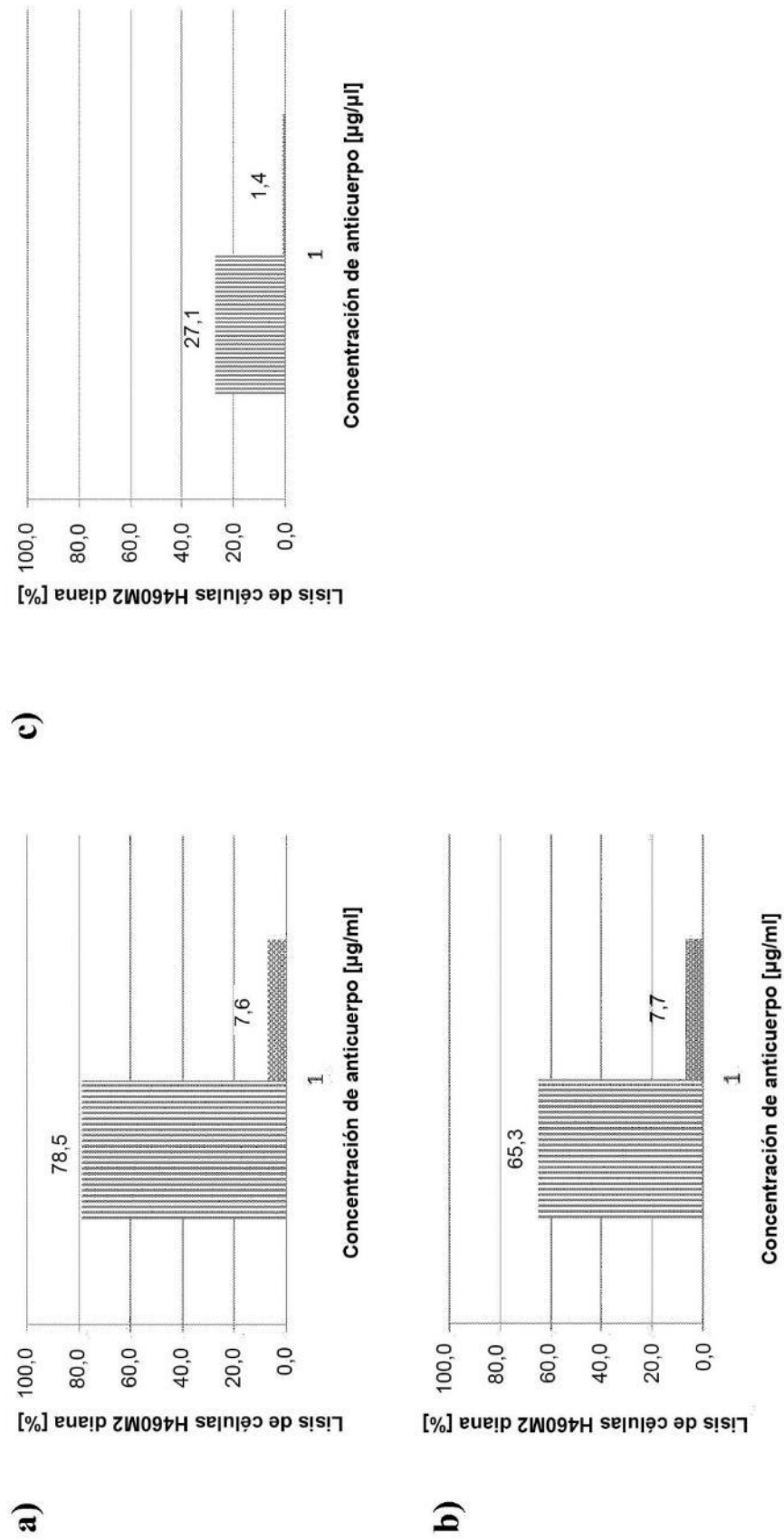
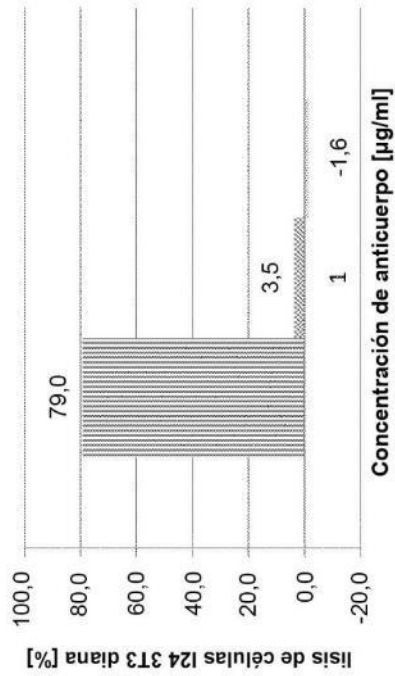
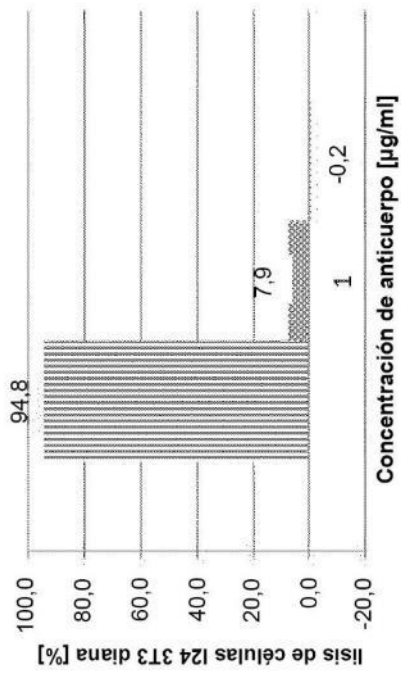


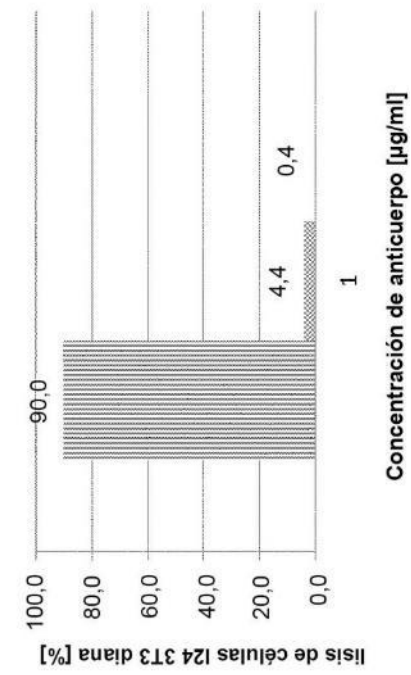
Fig. 13



c)



a)



b)

Fig. 14

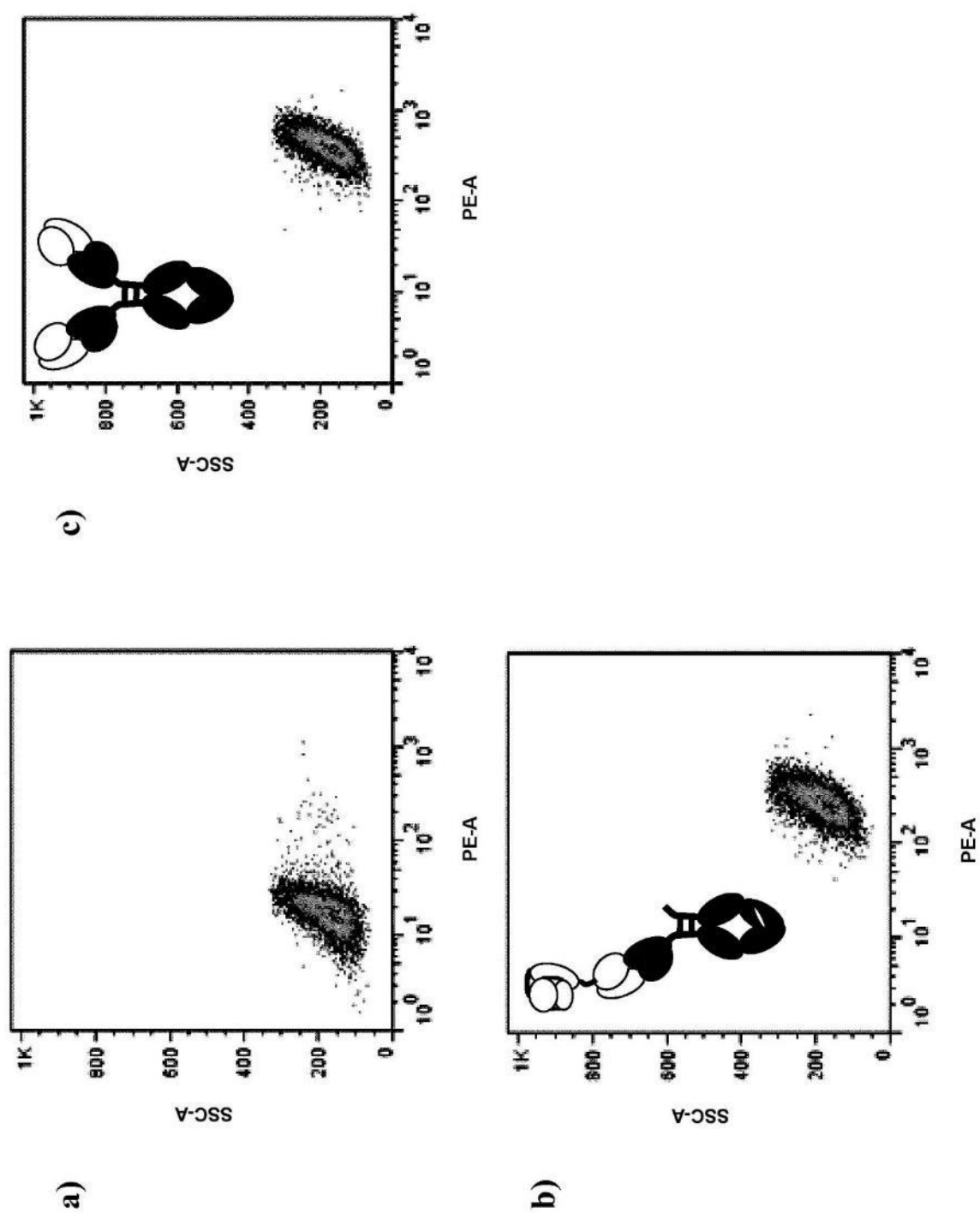


Fig. 15

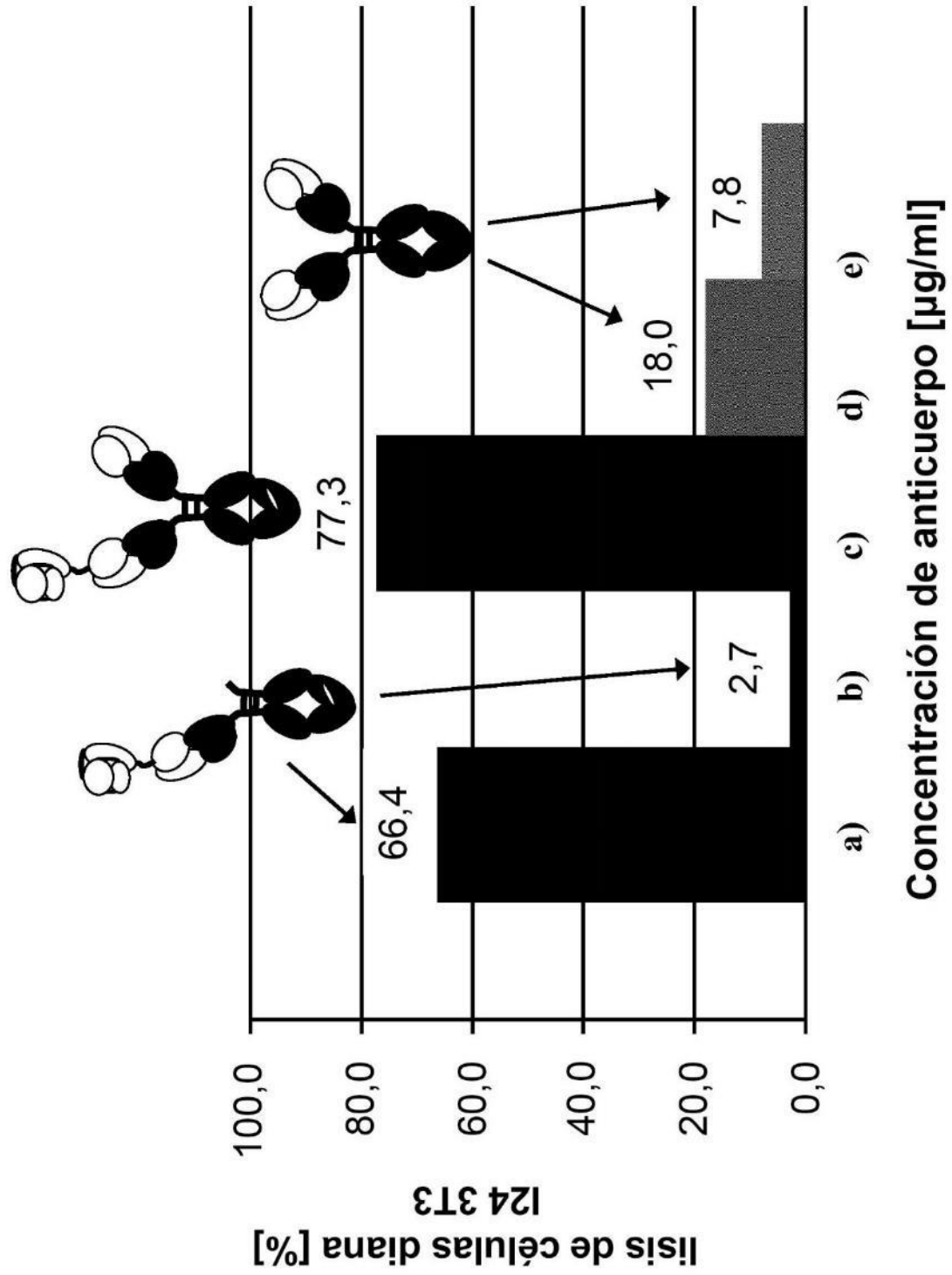


Fig. 16

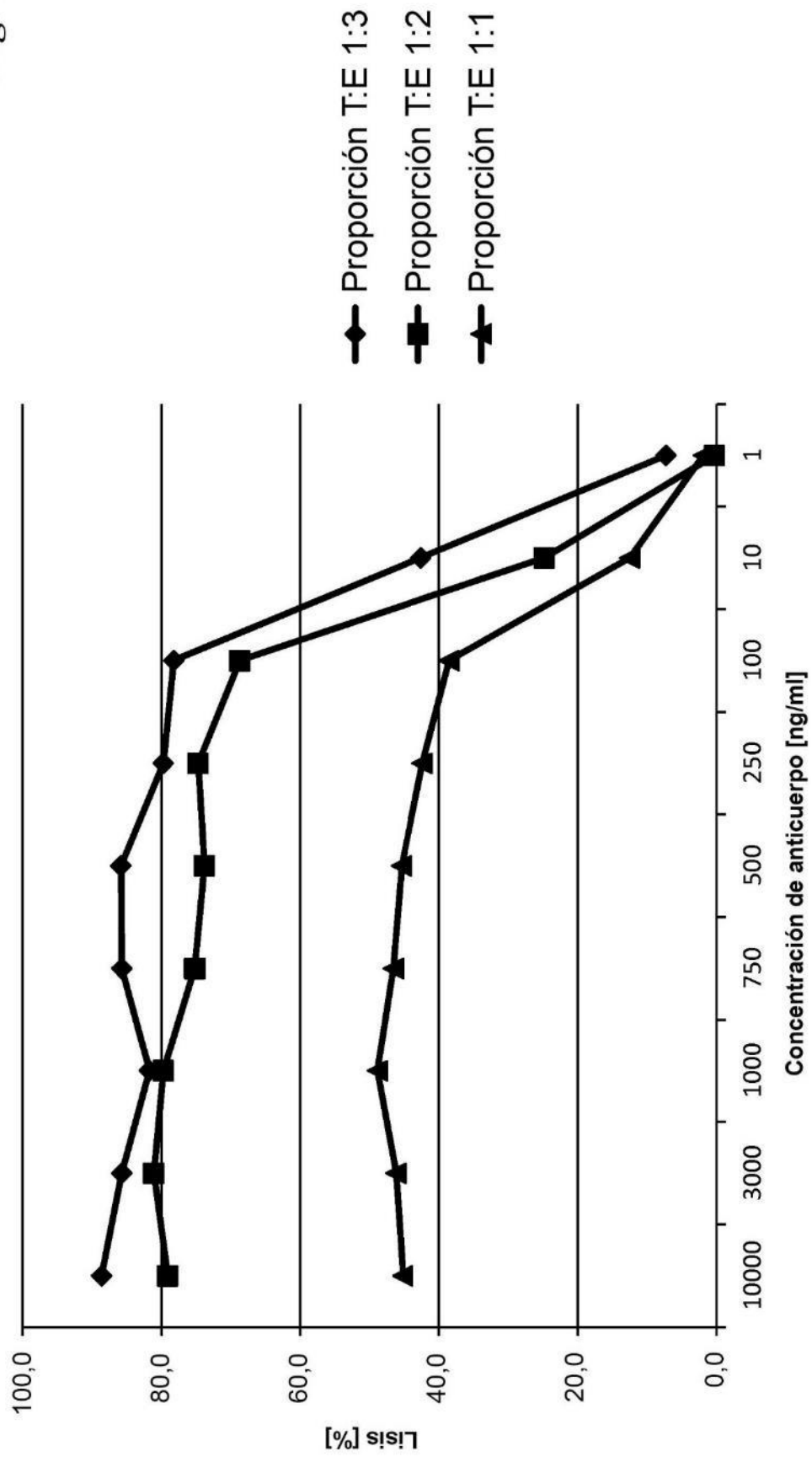


Fig. 17

