(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 727 552**

(51) Int. CI.:

A61K 47/50 (2007.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.02.2016 PCT/EP2016/053332**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **25.08.2016 WO16131856**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.02.2016 E 16705139 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2019 EP 3258969**

(54) Título: **Inmunoconjugados para la inducción específica de la citotoxicidad de los linfocitos T frente a una célula diana**

(30) Prioridad:

18.02.2015 EP 15155598
10.12.2015 EP 15199306

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.10.2019

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

DZIADEK, SEBASTIAN;
LIFKE, ALEXANDER;
LIFKE, VALERIA y
HILLRINGHAUS, LARS

(74) Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

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

Inmunoconjugados para la inducción específica de la citotoxicidad de los linfocitos T frente a una célula diana

Campo de la invención

La presente invención se refiere a inmunoconjugados para la inducción específica de la citotoxicidad de los linfocitos T frente a una célula diana, que comprenden al menos un péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T que es presentable por medio del CPH de clase I acoplado a un resto de unión a célula diana y a procedimientos para su producción y a usos de los mismos.

Antecedentes de la invención

A diferencia de los linfocitos B, los linfocitos T reconocen péptidos derivados de antígenos procesados, que se presentan en la superficie de la célula por medio de moléculas de superficie de las células autólogas del complejo principal de histocompatibilidad (CPH).

La creencia actual sobre la presentación de antígenos por medio del CPH de clase II (CPH II) es que las proteínas exógenas acceden al CPH II a través de la fagocitosis y endocitosis, y las proteínas endógenas acceden al CPH II a través de la autofagia. Los antígenos se procesan a antígenos peptídicos (epítopos peptídicos) de una longitud apropiada (~10-16 aminoácidos) para su unión a moléculas de CPH II en el fagosoma, endosoma o autofagosoma. Los dímeros de cadena αβ del CPH II no cargado se ensamblan en el retículo endoplásmico (RE) como un complejo nonamérico con la cadena invariante (Ii), que protege frente a las interacciones prematuras de péptidos o proteínas en los compartimentos prelisosómicos. Este complejo se desplaza al compartimento lisosómico con el CPH II, donde la cadena invariante se somete a proteólisis secuencial. El producto de escisión final, un péptido conocido como péptido Ii asociado a clase II (CLIP), ocupa el surco de unión a péptido y se debe liberar antes de cargar las moléculas de CPH II con péptidos de alta afinidad (péptidos restringidos por CPH II) (Wearsch P y Creswell P, Nat. Rev. Immunol.: Antigen processing and presentation, cartel disponible en línea, http://www.nature.com/nri/posters/antigenprocessing).

La unión de los linfocitos T CD4 indiferenciados al CPH II cargado con péptidos en la superficie de la célula media en la inmunización con respecto al antígeno sensibilizando los linfocitos T CD4 indiferenciados para polarizarlos en linfocitos T efectores (Th1, Th2, Th17) o linfocitos T de memoria. De forma alternativa, dependiendo del medio local (por ejemplo, el equilibrio de citocinas) en el microentorno de la CPA, la unión de los linfocitos T CD4 indiferenciados al CPH II cargado con péptidos puede mediar en la tolerancia inmunitaria con respecto a un antígeno sensibilizando los linfocitos T CD4 indiferenciados para polarizarlos en linfocitos T reguladores (Treg).

Mientras que las moléculas de CPH II solo se producen normalmente en células presentadoras de antígeno, como macrófagos, linfocitos B y células dendríticas, el CPH de clase I (CPH I) se produce en todas las células nucleadas.

El mecanismo postulado actualmente sobre la presentación de antígenos por medio del CPH de clase I (CPH I) es que los antígenos endógenos, tales como proteínas víricas o proteínas autólogas, que se producen en el interior de la célula, se procesan en péptidos en el interior del citosol por el proteasoma y las proteasas citosólicas. A continuación, estos péptidos se transportan al RE a través de bombas específicas denominadas el complejo transportador asociado con el procesamiento de antígenos (TAP), donde se recortan además mediante las aminopeptidasas en el RE (APRE) para producir péptidos de 8-12 aminoácidos.

Se ha demostrado que los epítopos peptídicos de proteínas exógenas que se internalizan en células, preferentemente en células presentadoras de antígeno (CPA) profesionales, como las células dendríticas o macrófagos, también se pueden presentar por el CPH I. Esto se atribuye a la presencia de un dominio de translocación comprendido en la proteína exógena que contribuye a la retrotranslocación de dicha proteína de un fagosoma o endosoma y, de este modo, dirige a las proteínas al citoplasma de la célula (Donnelly JJ *et al*. Proc Natl Acad Sci USA. 15 de abril de 1993; 90(8):3530-4; Wearsch P y Creswell P, Nat. Rev. Immunol.: Antigen processing and presentation, cartel disponible en línea, http://www.nature.com/nri/posters/antigenprocessing).

El ensamblaje de los heterodímeros de cadena pesada-β2-microglobulina del CPH I con los péptidos cortos se coordina mediante el complejo de carga peptídica, que se compone de un dímero enlazado mediante disulfuro de tapasina y ERp57, calreticulina (CRT) y moléculas de TAP. La tapasina también contribuye a la edición de péptidos para seleccionar la presentación de complejos péptido-CPH I estables en la superficie de la célula (Wearsch P y Creswell P, Nat. Rev. Immunol.: Antigen processing and presentation, cartel disponible en línea, http://www.nature.com/nri/posters/antigenprocessing). Una vez que el péptido se carga sobre la molécula de CPH I, se disocia el complejo de carga peptídica y el CPH I cargado con péptidos abandona el RE a través de la vía secretora para alcanzar la superficie de la célula. Los péptidos que no consiguen unirse a las moléculas de CPH I en la luz del RE se retiran del RE por medio del canal de sec61 en el citosol, donde se podrían someter a otro recorte de tamaño y se podrían translocar mediante TAP de nuevo en el RE para unirse a una molécula de CPH I (Koopmann JO, Albring J, Hüter E, *et al*. (julio de 2000) Immunity, 13 (1): 117-27.; Albring J, Koopmann JO, Hämmerling GJ, Momburg F (enero de 2004), Mol. Immunol. 40 (10): 733-41).

Las moléculas de CPH I en la superficie de la célula presentan sus péptidos cargados a los linfocitos T CD8 citotóxicos (linfocitos T CD8, también denominados CTL). Los CTL desencadenan que la célula, que presenta epítopos peptídicos por medio del CPH I, se someta a muerte celular programada mediante apoptosis. De ahí que el CPH I medie en la inmunidad mediada por células, que es el medio principal del sistema inmunitario para hacer frente a los patógenos intracelulares, pero también para hacer frente a las células propias que expresan proteínas mutadas o anómalas.

En los últimos años, el centro de interés de la investigación ha sido explotar el mecanismo de inducción de la inmunidad mediada por células para inducir la destrucción de una variedad de células enfermas (por ejemplo, células tumorales) que no se ven afectadas por patógenos intracelulares. Como todas las células nucleadas expresan el CPH I, la inducción de la presentación de antígenos de patógenos intracelulares por medio del CPH I es un enfoque prometedor para inducir la muerte celular programada por medio de CTL en una variedad de poblaciones de células enfermas, por ejemplo, células tumorales.

A este respecto, se han desarrollado enfoques para administrar antígenos derivados de patógenos intracelulares, por ejemplo, de virus, mediante inmunoconjugados formados por un ligando que se une a una célula diana y una fracción peptídica del patógeno intracelular a una determinada población de células enfermas para inducir la presentación de fragmentos procesados de los péptidos transportados en la superficie de la célula enferma por medio del CPH I. A continuación, se eliminará la célula enferma mediante los CTL.

Un enfoque se divulga en el documento EP 0659439 A1. El documento EP 0659439 A1 divulga un inmunoconjugado, en el que se acopla un péptido derivado de virus (péptido 57-68 de la matriz de la gripe modificado) o un péptido derivado de bacteria (péptido 249-260 de *Plasmodium berghei*) a un anticuerpo de unión a célula diana. El péptido respectivo se acopla al anticuerpo mediante adición de un residuo de cisteína N terminal y reticulación posterior por medio de un conector SPDP al anticuerpo para producir el inmunoconjugado. Tras la internalización, el péptido respectivo que incluye el residuo de cisteína N terminal añadido se separa del conjugado, se procesa además en la célula y se presenta por el CPH I. Sin embargo, el valor de CI50 de los inmunoconjugados fue muy alto (0,5 µmol/l).

Como se describe en el enfoque de acuerdo con el documento EP 0659439 A1, un desafío importante es estimular una respuesta de los CTL restringidos por CPH I frente a antígenos exógenos. En la mayoría de los casos, cuando el antígeno se proporciona de forma exógena, no se envía al citoplasma desde donde se podría transportar a la vía del CPH I.

Una metodología para mejorar el valor de CI50 para inmunoconjugados que incluyan péptidos que se pueden presentar por medio del CPH I tras el procesamiento se sugiere en el documento EP 0659439 A1. Aquí, se recomienda incluir un dominio de translocación en el inmunoconjugado para enviar el inmunoconjugado al citoplasma por medio de retrotranslocación. Sin embargo, el documento EP 0659439 A1 no demuestra resultados en relación con esta metodología.

Por lo tanto, todavía existe la necesidad de obtener enfoques mejorados para inducir la destrucción de las células diana induciendo la inmunidad mediada por células.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un inmunoconjugado que comprende al menos un péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T natural que es presentable por medio del CPH de clase I acoplado a un anticuerpo de unión a célula diana por medio de un enlace escindible, en el que el enlace escindible se dispone de tal manera que tras la escisión dicho péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T, que es directamente presentable por medio de una molécula de CPH de clase I, se libera del inmunoconjugado, caracterizado por que el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T natural comprende al menos un residuo de cisteína y por que el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T no modificado se acopla covalentemente al anticuerpo de unión a célula diana por medio de un enlace disulfuro.

Un modo de realización de la invención se refiere a un inmunoconjugado, en el que el enlace escindible es escindible en el compartimento endosómico de la célula diana.

Un modo de realización de la invención se refiere a un inmunoconjugado, en el que el inmunoconjugado no comprende un dominio de translocación.

Un modo de realización de la invención se refiere a un inmunoconjugado, en el que en menos de 12 horas después de la internalización del inmunoconjugado en la célula diana, el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T se presenta en la superficie de la célula diana por medio de una molécula de CPH de clase I.

Otro aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende un inmunoconjugado de acuerdo con la invención en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto de la divulgación es el uso de un inmunoconjugado de acuerdo con la invención para inducir específicamente la citotoxicidad de los linfocitos T frente a la célula diana.

Otro aspecto de la invención es un procedimiento para la generación de un inmunoconjugado de acuerdo con la invención, que comprende las etapas de

a) proporcionar el resto de unión a célula diana recombinante,

b) proporcionar el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T, y

c) acoplar al menos uno de dichos péptidos que provocan la respuesta de los linfocitos T a dicho resto de unión a célula diana por medio del enlace escindible.

Un modo de realización de la invención se refiere a un procedimiento para la generación de un inmunoconjugado, en el que un péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T no modificado se acopla al resto de unión a célula diana.

Otro aspecto de la invención es el inmunoconjugado de acuerdo con la invención para su uso como un medicamento.

Otro aspecto de la invención es el inmunoconjugado de acuerdo con la invención, que comprende un resto de unión a célula cancerosa, para el tratamiento del cáncer.

Otro aspecto de la invención es el inmunoconjugado de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento de enfermedades infecciosas, enfermedades autoinmunitarias, diabetes o alergia.

Otro aspecto de la divulgación es un procedimiento de tratamiento de un paciente que padece una enfermedad mediante administración de un inmunoconjugado de acuerdo con la invención al paciente que necesita dicho tratamiento.

De acuerdo con la invención, el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T escindido del inmunoconjugado se puede presentar directamente por medio de moléculas de CPH de clase I sin otro procesamiento o recorte en la célula diana. El péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T se escinde del inmunoconjugado en el compartimento endosómico de la célula diana tras la internalización del inmunoconjugado, y el péptido se carga directamente (es decir, sin otro procesamiento o recorte) sobre las moléculas de CPH de clase I en el compartimento endosómico y se transporta a la superficie de la célula diana para su presentación por medio del CPH de clase I. De forma sorprendente, se alcanzan valores de CI50 considerablemente más bajos en comparación con los enfoques conocidos en la técnica.

Descripción de las figuras

Figura 1: Activación de los linfocitos T disminuida en péptidos de CMV modificados como se mide mediante IFNγ-ELISPOT usando líneas de células tumorales y medios de cultivo de células diferentes. **A)** Células MDA-MB231 en RPMI+, **B)** células MDA-MB231 en AIM-V, **C)** células HCT-116 en RPMI+, **D)** células HCT-116 en AIM-V, **E)** linfocitos T2 en RPMI+. Se realizaron los análisis usando concentraciones de péptidos de 13,245 µM o 1,3245 µM como se indica.

Figura 2: Modo de acción propuesto del inmunoconjugado de acuerdo con la invención. **A:** Unión de inmunoconjugado a la célula diana. **B:** Internalización del inmunoconjugado en el compartimento endosómico. **C:** Liberación del péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T del inmunoconjugado en el compartimento endosómico. **D:** Carga de moléculas de CPH I con péptido liberado en el compartimento endosómico. **E:** Envío de moléculas de CPH I cargado con péptidos a la superficie de la célula diana. **F:** Reconocimiento de moléculas de CPH I cargado con péptidos en la superficie de la célula diana mediante linfocitos T CD8 específicos para péptidos que inducen la muerte celular en la célula diana.

Figura 3: Unión de inmunoconjugados que comprenden anticuerpo anti-CDCP1 acoplado al péptido de VEB y/o de la GRIPE a células MDA-MB 231 que expresan CDCP1.

Figura 4: Unión de inmunoconjugados que comprenden anticuerpo anti-CD19 acoplado al péptido de VEB y/o de la GRIPE a células RL que expresan CD19.

Figura 5: Resultados de IFN-γ ELISPOT usando inmunoconjugados de acuerdo con la invención para la activación de los linfocitos T específicos para péptidos. Las concentraciones indicadas se refieren a las concentraciones de péptidos. **A)** Células HCT-116 que expresan CDCP-1 tratadas con inmunoconjugados que comprenden anticuerpo anti-CDCP-1 monoclonal y péptido de VEB restringido por HLA-A2. **B)** Células RL positivas para HLA-A2 que expresan CD19 y Ramos negativas para HLA-A2 tratadas con inmunoconjugados que comprenden anticuerpo anti-CD19 monoclonal y péptido de VEB restringido por HLA-A2. **C)** Células tumorales que expresan CDCP-1 diferentes tratadas con inmunoconjugados que comprenden anticuerpo anti-CDCP-1 monoclonal y péptido de VEB restringido por HLA-A2.

Figura 6: Destrucción de las células tumorales de células tumorales indicadas evaluada mediante xCELLigence y ensayo de liberación de LDH. **(A)** Destrucción de las células tumorales de células MDA-MB231 positivas para HLA-A2 mediada por inmunoconjugado que comprende anticuerpo anti-CDCP1 acoplado al péptido de VEB restringido por HLA-A2. **(B)** Destrucción específica de células A-375 mediada por inmunoconjugado que comprende anticuerpo anti-CDCP1 acoplado al péptido de VEB restringido por HLA-A2 con un residuo de cisteína no terminal. **(C)** Destrucción específica de células MDA-MB231 positivas para HLA-A2 mediada por inmunoconjugado que comprende anticuerpo anti-CDCP1 acoplado al

péptido de VEB restringido por HLA-A2 con un residuo de cisteína no terminal. Las concentraciones indicadas se refieren a las concentraciones de péptidos.

Figura 7: Destrucción de las células tumorales de células tumorales positivas para HLA-A1 mediada por inmunoconjugado que comprende péptido de la GRIPE restringido por HLA-A1. **A-C)** Resultados medidos mediante el ensayo xCELLigence después de 6, 10 y 18 horas. **D-F)** Resultados medidos mediante el ensayo de liberación de LDH. **A y D)** Células A-375 en una proporción de células efectoras con respecto a células diana (E:T) de 1:1 y 1:2, **B y E)** células HCT-116, **C y F)** células PC3.

Figura 8: Actividad antitumoral de inmunoconjugados de acuerdo con la invención que comprenden anticuerpo anti-CDCP1 monoclonal en el modelo s.c. de MDA-MB231 con transferencia i.v. de huPBMC. Esquema de pruebas (**fig. 8A**) y resultados (**fig. 8B**).

Figura 9: Actividad antitumoral de inmunoconjugados de acuerdo con la invención que comprenden anticuerpo anti-CDCP1 monoclonal en combinación con tratamiento anti-PD1 en el modelo s.c. de MDA-MB231 establecido con transferencia i.v. de huPBMC. Esquema de pruebas (**fig. 9A**) y resultados de la inhibición del crecimiento tumoral (**fig. 9B**) e incremento de los linfocitos T (**fig. 9C**).

Descripción detallada de la invención

1. Definiciones

El término “inmunoconjugado” como se usa en el presente documento se refiere a un resto de unión a célula diana (por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a una célula diana o un ligando que se une a su receptor en la célula diana) acoplado a una molécula funcional heteróloga. La molécula funcional presente esencialmente en los inmunoconjugados de acuerdo con la invención es un péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T. Adicionalmente, se pueden emplear otras moléculas funcionales, como agentes citotóxicos.

Un “resto de unión a célula diana” como se usa en el presente documento se refiere a un resto que se une específicamente a una célula diana. El término incluye anticuerpos, así como otras moléculas naturales (por ejemplo, receptores, ligandos) o sintéticas (por ejemplo, DARPins), que se puedan unir específicamente a una célula diana. Con “que se une específicamente a una célula diana” como se usa en el presente documento se quiere decir que dicho resto se une preferentemente a la célula diana en una mezcla de complejo.

La afinidad de la unión de un resto de unión a célula diana a la célula diana se define mediante los términos k_a (constante de velocidad para la asociación de la proteína del complejo proteína/célula diana), k_D (constante de disociación) y K_D (k_D/k_a). En un modo de realización en el que el resto de unión a célula diana es un anticuerpo que se une específicamente a una célula diana se quiere decir una afinidad de unión (K_D) de 10^{-8} mol/l o menos, en un modo de realización de 10^{-8} M a 10^{-13} mol/l.

Se usa el término “anticuerpo” en el presente documento en el sentido más amplio y engloba diversas estructuras de anticuerpos, incluyendo, pero sin limitarse a anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo siempre que presenten la actividad de unión a antígeno deseada.

Se usa el término “ligando” en el presente documento para una molécula, preferentemente una proteína, que forma un complejo con una biomolécula en la célula diana, para cumplir una función biológica. En un modo de realización, el ligando es un ligando selectivo que tiene una tendencia a unirse a tipos limitados de receptores.

Un “péptido” como se usa en el presente documento es una cadena corta de monómeros de aminoácido enlazados mediante enlaces peptídicos. Los péptidos que se unen al CPH de clase I son típicamente de 8 a 12 aminoácidos de longitud. El término “péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T que es presentable por medio del CPH de clase I” como se usa en el presente documento se refiere a péptidos que son presentables por medio de moléculas de CPH de clase I, pero que no son presentables por medio del CPH II y que desencadenan una respuesta de los linfocitos T CD8. Para su simplificación, en el presente documento el término también se puede denominar solo “péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T”.

Los péptidos que provocan la respuesta de los linfocitos T usados dentro del alcance de la invención se derivan típicamente de una fuente patógena no propia (es decir, no humana). El término “derivado de” en este contexto quiere decir que el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T es idéntico a un epítopo para linfocitos T natural de la fuente patógena no propia (es decir, comparte la misma secuencia de aminoácidos). En otras palabras, la secuencia de aminoácidos del péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T es idéntica a una secuencia parcial de la secuencia de aminoácidos de un antígeno proteico de la fuente patógena no propia. Aunque la fuente patógena del péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T puede ser de origen vírico o bacteriano, típicamente, los péptidos que provocan la respuesta de los linfocitos T presentables mediante el CPH I se derivan de patógenos intracelulares o extracelulares. Los patógenos intracelulares incluyen virus, bacterias intracelulares o parásitos. Los patógenos extracelulares incluyen

parásitos y bacterias. Aunque los péptidos que provocan la respuesta de los linfocitos T usados para la invención comparten la misma secuencia de aminoácidos que el epítopo para linfocitos T natural correspondiente, los péptidos que provocan la respuesta de los linfocitos T de un inmunoconjugado de acuerdo con la invención son típicamente de origen sintético.

En la técnica, los péptidos derivados de patógenos intracelulares usados para inducir la citotoxicidad de los linfocitos T dirigida frente a células diana se modificaron ocasionalmente mediante sustituciones o adiciones de aminoácidos para mejorar sus propiedades fisiológicas, por ejemplo, su solubilidad. Para la presente invención, sin embargo, solo se usan péptidos que provocan la respuesta de los linfocitos T naturales (es decir, péptidos que comparten la secuencia de aminoácidos de un péptido patógeno natural sin incluir otras modificaciones de la secuencia de aminoácidos).

Por “natural” como se usa en el presente documento se quiere decir que el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T que es presentable por medio del CPH de clase I que se acopla al resto de unión a célula diana comparte (es decir, consiste en) la secuencia de aminoácidos de un epítopo para linfocitos T patógeno no propio correspondiente presentable por medio del CPH de clase I. En otras palabras, el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T consiste en una secuencia de aminoácidos que es idéntica a una secuencia de aminoácidos producible mediante escisión del patógeno no propio natural correspondiente en la célula diana. De ahí que un “péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T natural” o “péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T natural que es presentable por medio del CPH de clase I”, en términos de la invención, pueda ser de origen sintético, sin embargo, su secuencia de aminoácidos no comprende ninguna modificación de aminoácidos, en particular, ninguna adición, deleción o sustitución de aminoácidos, en comparación con un péptido producible mediante escisión del patógeno no propio natural correspondiente. Una vez más, expresado en otras palabras, la secuencia de aminoácidos de un péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T natural acoplado a un resto de unión a célula diana es idéntica a una secuencia parcial (en un modo de realización preferente, de 8 a 12 aminoácidos de largo) de la secuencia de aminoácidos del antígeno proteico del patógeno no propio.

Al afirmar que el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T “comprende de forma natural” un residuo de aminoácido distinto se quiere decir que el residuo de aminoácido distinto está presente en la misma posición en el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T natural correspondiente. De ahí que un péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T que comprende de forma natural un residuo de cisteína quiera decir un péptido derivado de un patógeno no propio, en el que la secuencia parcial de la secuencia de aminoácidos de un antígeno proteico del patógeno no propio, que se corresponde con la secuencia de aminoácidos de dicho péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T, comprende un residuo de cisteína en la misma posición.

Cuando se indica que el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T se proporciona “sin modificación de la secuencia de aminoácidos” con respecto al epítopo para linfocitos T patógeno natural, se quiere decir que la secuencia de aminoácidos del péptido es idéntica a la secuencia de aminoácidos del epítopo para linfocitos T derivable de forma natural correspondiente del patógeno no propio (es decir, el epítopo para linfocitos T producible mediante escisión del patógeno no propio natural correspondiente). En particular, la secuencia de aminoácidos del péptido no incluye adiciones, deleciones o sustituciones de residuos de aminoácido cuando se compara con el péptido natural.

El término “aminoácido” como se usa en el presente documento indica una molécula orgánica que posee un resto amino localizado en la posición α con respecto a un grupo carboxílico. Los ejemplos de aminoácidos incluyen: arginina, glicina, ornitina, lisina, histidina, ácido glutámico, ácido aspártico, isoleucina, leucina, alanina, fenilalanina, tirosina, triptófano, metionina, serina, prolina. El aminoácido empleado es opcionalmente en cada caso la forma L. Los aminoácidos se pueden agrupar de acuerdo con propiedades de cadena lateral comunes:

(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.

Tabla - Aminoácidos con propiedades específicas

Aminoácido	**3 letras**	**1 letra**	**Polaridad de cadena lateral**	**Carga de cadena lateral (pH 7,4)**
Alanina	Ala	A	No polar	neutro
Arginina	Arg	R	polar básico	positivo

Aminoácido	3 letras	1 letra	Polaridad de cadena lateral	Carga de cadena lateral (pH 7,4)
Asparagina	Asn	N	Polar	neutro
Ácido aspártico	Asp	D	polar ácido	negativo
Cisteína	Cys	C	No polar	neutro
Ácido glutámico	Glu	E	polar ácido	negativo
Glutamina	Gin	Q	Polar	neutro
Glicina	Gly	G	No polar	neutro
Histidina	His	H	Polar básico	positivo (10 %) neutro (90 %)
Isoleucina	Ile	I	No polar	neutro
Leucina	Leu	L	No polar	neutro
Lisina	Lys	K	polar básico	positivo
Metionina	Met	M	No polar	neutro
Fenilalanina	Phe	F	No polar	neutro
Prolina	Pro	P	No polar	neutro
Serina	Ser	S	Polar	neutro
Treonina	Thr	T	Polar	neutro
Triptófano	Trp	W	No polar	neutro
Tirosina	Tyr	Y	Polar	neutro
Valina	Val	V	No polar	neutro

Un “epítopo” es la parte de un antígeno proteico que se reconoce por el sistema inmunitario, por ejemplo, por anticuerpos, linfocitos B o linfocitos T. Un “epítopo para linfocitos T” se presenta en la superficie de una célula, donde se une a las moléculas de CPH. Los epítopos para linfocitos T presentables mediante el CPH I se pueden unir mediante el receptor de linfocitos T de los linfocitos T CD8 citotóxicos (linfocitos T CD8 o CTL). Los epítopos para linfocitos T presentables mediante el CPH I son típicamente péptidos de 8 a 12 aminoácidos de longitud. De ahí que un “péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T que es presentable por medio del CPH de clase I” como se hace referencia en el presente documento quiera decir un péptido derivado de patógeno (en un modo de realización, un péptido que consiste en de 8 a 12 residuos de aminoácido) que se puede unir al complejo CPH I (pero no al CPH II) sin requerir que se procese (por ejemplo, mediante escisión de uno o más residuos de aminoácido) en la célula diana.

Un “enlace escindible”, en términos de la invención, se relaciona con un enlace en el inmunoconjugado dispuesto entre el resto de unión a célula diana y el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T que permite que el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T se separe para que se presente directamente por una molécula de CPH de clase I. El enlace escindible se localiza en conexión directa con el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T. La escisión del péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T del inmunoconjugado da como resultado la liberación del péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T de su secuencia de aminoácidos original y sin ningún residuo de aminoácido adicional.

Dependiendo del tipo del enlace escindible, el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T se libera del inmunoconjugado tras la escisión “sin trazas” o bien “con trazas”. Por liberación “con trazas” como se usa en el presente documento se quiere decir que el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T liberado incluye trazas de un conector (es decir, trazas en forma de un resto químico, aparte de aminoácido(s)), con la condición de que dichas trazas no interfieran en la unión al CPH de clase I. Se menciona expresamente que, en términos de la presente invención, una “liberación con trazas”, como se hace referencia en el presente documento, no incluye la liberación del péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T que incluye un residuo(s) de aminoácido adicional(es). Por liberación “sin trazas” como se usa en el presente documento se quiere decir que el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T liberado no incluye ninguna traza de un conector.

Por “escisión dependiente del pH” se quiere decir que se desencadena la escisión del enlace escindible mediante un cambio del pH. En un modo de realización de la invención, se desencadena la escisión dependiente del pH a un pH presente en el compartimento endosómico de la célula diana. En un modo de realización de la invención, se desencadena la escisión dependiente del pH a pH 5,5 - 6,5.

Por “escisión enzimática” como se usa en el presente documento se quiere decir la escisión proteolítica del inmunoconjugado, que, en general, se produce mediante hidrólisis del enlace peptídico. La escisión enzimática se ve afectada por las proteasas, por ejemplo, furina. Se puede lograr la creación de un enlace escindible en el inmunoconjugado que sea escindible mediante escisión enzimática, por ejemplo, mediante unión del péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T al resto de unión a célula diana por medio de un conector peptídico.

La unión del péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T al resto de unión a célula diana se puede efectuar mediante un enlace disulfuro, un enlace éster, un conector químico, un conector peptídico o mediante unión no covalente (por ejemplo, mediante biotina/estreptavidina, biotina/teofilina).

Por “acoplamiento covalente” o “unión covalente” del péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T al resto de unión a célula diana se quiere decir un acoplamiento mediante un enlace químico que implica el intercambio de pares de electrones entre un átomo del péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T y un átomo del resto de unión a célula diana.

Por “acoplamiento no covalente” o “unión no covalente” del péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T al resto de unión a célula diana se quiere decir un acoplamiento que no implica el intercambio de electrones. Los ejemplos de acoplamientos no covalentes incluyen uniones inmunológicas o uniones por medio de biotina/avidina, biotina/estreptavidina y similares. En un modo de realización de una unión inmunológica, el acoplamiento se ve afectado por medio de un anticuerpo que se incluye en el inmunoconjugado, en el que el anticuerpo se une específicamente a una molécula orgánica, que se une al péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T. Para liberar el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T después de la internalización, en este modo de realización, el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T se acopla a dicha molécula orgánica por medio de un enlace escindible. La molécula orgánica es preferentemente una micromolécula con un peso molecular de hasta 900 Da. Los ejemplos de dichas moléculas orgánicas incluyen biotina y teofilina.

Un “conector peptídico” o “péptido conector” como se usa en el presente documento se refiere a un péptido con una secuencia de aminoácidos, que es preferentemente de origen sintético. Un conector peptídico usado en el presente documento comprende un dominio funcional que incluye un sitio de escisión, en un modo de realización, un sitio de escisión por proteasa, o bien el conector peptídico crea un sitio de escisión, en un modo de realización, un sitio de escisión por proteasa, cuando se fusiona al péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T. La secuencia de aminoácidos de un conector peptídico usado en el presente documento tiene típicamente una longitud de 8 a 50 residuos de aminoácido. En un modo de realización, el conector peptídico usado en el presente documento comprende un sitio de escisión por furina y la secuencia de aminoácidos del conector peptídico comprende:

- R-X-R-R, siendo X cualquier residuo de aminoácido, o

- R-X-K-R, siendo X cualquier residuo de aminoácido.

Un “dominio de translocación”, en términos de la invención, es un dominio de proteína estructural, que es responsable de la translocación en la membrana, lo que posibilita el acceso al citosol, o una parte funcional de dicho dominio de proteína. Un ejemplo de un dominio de translocación es el dominio II de la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*.

El término "composición farmacéutica" se refiere a una preparación que está en tal forma que permite que la actividad biológica de un ingrediente activo contenido en la misma sea eficaz, y que no contiene ningún componente adicional que sea inaceptablemente tóxico para un sujeto al que se administraría la composición. Una composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica. Como se apreciará por el experto en la técnica, la vía y/o modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. Para administrar un inmunoconjugado de acuerdo con la invención mediante determinadas vías de administración, puede ser necesario recubrir el inmunoconjugado con, o coadministrar el inmunoconjugado con, un material para prevenir su inactivación. Por ejemplo, el inmunoconjugado se puede administrar a un sujeto en un vehículo apropiado, por ejemplo, liposomas o un diluyente. Los diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones tampón salinas y acuosas.

Un “vehículo farmacéuticamente aceptable” se refiere a un ingrediente en una formulación farmacéutica, distinto de un ingrediente activo, que no sea tóxico para un sujeto. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen todos y cada uno de disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retraso de la absorción, y similares, que sean fisiológicamente compatibles. Preferentemente, el vehículo es adecuado para su administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, raquídea o epidérmica (por ejemplo, mediante inyección o infusión).

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención también pueden contener adyuvantes, tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos se puede garantizar tanto mediante procedimientos de esterilización, *supra*, como mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio y similares, en las composiciones. Además, se puede producir la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable mediante la inclusión de agentes que retrasen la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

Las frases “administración parenteral” y “administrado por vía parenteral” como se usa en el presente documento quieren decir modos de administración distinta de administración enteral y tópica, normalmente mediante inyección, e incluyen, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intrarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital,

intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intrarticular, subcapsular, subaracnoidea, intrarraquídea, epidural e intraesternal.

Independientemente de la vía de administración seleccionada, los inmunoconjugados de la presente invención, que se pueden usar en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables mediante procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la técnica.

Se pueden variar las concentraciones de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particulares, sin que sean tóxicas para el paciente. La concentración de dosificación seleccionada dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos, incluyendo la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleadas, la vía de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción del compuesto particular que se emplea, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, estado, salud general y antecedentes médicos anteriores del paciente que se trata, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

La composición debe ser estéril y fluida en la medida en que la composición sea administrable mediante jeringuilla. Además del agua, el vehículo es preferentemente una solución salina tamponada isotónica.

La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, es preferente incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol o sorbitol, y cloruro de sodio en la composición.

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 la muerte o destrucción celular. Los agentes citotóxicos incluyen, pero no se limitan a, isótopos radioactivos (por ejemplo, At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32}, Pb^{212} e isótopos radioactivos de Lu); agentes o fármacos quimioterápicos (por ejemplo, metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorrubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorrubicina u otros agentes de intercalación); agentes inhibidores del crecimiento; enzimas y fragmentos de las mismas, tales como enzimas nucleolíticas; antibióticos; toxinas, tales como toxinas de micromoléculas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de las mismas; y los diversos agentes antitumorales o antineoplásicos divulgados a continuación.

El término “cáncer” como se usa en el presente documento se refiere a enfermedades proliferativas, tales como linfomas, leucemias linfocíticas, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), cáncer de pulmón de tipo bronquioloalveolar, cáncer de huesos, cáncer pancreático, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer uterino, cáncer ovárico, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer uterino, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma de endometrio, carcinoma de cuello uterino, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, enfermedad de Hodgkin, cáncer de esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroidea, cáncer de la glándula paratiroidea, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de partes blandas, cáncer de uretra, cáncer de pene, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de riñón o uréter, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis renal, mesotelioma, cáncer hepatocelular, cáncer biliar, neoplasias del sistema nervioso central (SNC), tumores de la médula espinal, glioma del tronco encefálico, glioblastoma multiforme, astrocitomas, schwanomas, ependimonas, meduloblastomas, meningiomas, carcinomas de células escamosas, adenoma hipofisario y sarcoma de Ewing, incluyendo versiones resistentes al tratamiento de cualquiera de los cánceres anteriores o una combinación de uno o más de los cánceres anteriores.

El término “concentración inhibidora semimáxima” (“CI50”) indica la concentración de un compuesto o molécula particular requerida para obtener un 50 % de la inhibición de un proceso biológico *in vitro*. Los valores de CI50 se pueden convertir logarítmicamente en valores de pCI50 (-log CI50), en los que los valores más altos indican una potencia exponencialmente mayor. El valor de CI50 no es un valor absoluto, sino que depende de las condiciones experimentales, por ejemplo, las concentraciones empleadas. El valor de CI50 se puede convertir en una constante de inhibición absoluta (Ki) usando la ecuación de Cheng-Prusoff (Biochem. Pharmacol. (1973) 22:3099).

Una "proteína recombinante" es una proteína que se ha producido por una célula huésped genomanipulada de forma recombinante. Se aísla o purifica opcionalmente.

En caso de que el resto de unión a célula diana sea una proteína, la proteína de unión a célula diana se produce preferentemente mediante medios recombinantes. Son conocidos ampliamente procedimientos para la producción recombinante de proteínas en el estado de la técnica y comprenden la expresión de proteínas en células procariotas y eucariotas con el aislamiento posterior de la proteína y, normalmente, la purificación hasta una pureza farmacéuticamente aceptable. Para la expresión de las proteínas en una célula huésped, los ácidos nucleicos que codifican la proteína o

partes de la misma se insertan en vectores de expresión mediante procedimientos estándar. La expresión se realiza en células huésped procariotas o eucariotas apropiadas, como células CHO, células NS0, células SP2/0, células HEK293, células COS, células PER.C6, levaduras o células de *E. coli* y la proteína se recupera de las células (sobrenadante o células después de la lisis). Son bien conocidos procedimientos generales para la producción recombinante de anticuerpos en el estado de la técnica y se describen, por ejemplo, en los artículos de revisión de Makrides, S.C., Protein Expr. Purif. 17 (1999) 183-202; Geisse, S., *et al*., Protein Expr. Purif. 8 (1996) 271-282; Kaufman, R.J., Mol. Biotechnol. 16 (2000) 151-161; Werner, R.G., Drug Res. 48 (1998) 870-880.

2. Descripción detallada de los modos de realización de la invención

Los conjugados que comprenden un péptido patógeno específico para linfocitos T y una proteína que se une específicamente al receptor de superficie en una célula diana son conocidos a partir del documento EP 0 659 437 A1. Sin embargo, la eficacia de la presentación de péptidos mediante el CPH de clase I en la superficie de la célula y la activación de los linfocitos T fue baja en el enfoque divulgado en el documento EP 0 659 437 A1. Los autores de la presente invención observaron que, sin quedar vinculado a esta teoría, este efecto se produce debido al hecho de que el conjugado que contiene el péptido divulgado en el documento EP 0 659 437 A1 requiere otro procesamiento en la célula diana. Esto se limita por el problema de que, en la mayoría de los casos, el antígeno proporcionado de forma exógena no se envía al citoplasma, donde se puede procesar mediante los proteosomas y transportar además a la vía del CPH de clase I y presentar en la superficie de la célula. Otro efecto, que supuestamente se produce adicionalmente, podría ser que la maquinaria de procesamiento de antígenos y el proceso de presentación, en especial, en las células tumorales, sea defectuoso (Ferrone S., Advances in Cancer Research, 93 (2005) 189-234).

La presente invención proporciona un enfoque para mejorar la presentación mediante el CPH de clase I de péptidos patógenos específicos para linfocitos T. De acuerdo con la invención, el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T liberado del inmunoconjugado en el compartimento endosómico después de la internalización del inmunoconjugado es directamente adecuado para su presentación por medio de la unión al complejo CPH de clase I (sin requerir otro procesamiento o recorte en la célula diana). El péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T se une a las moléculas de CPH de clase I en el compartimento endosómico, se dirige a la superficie de la célula diana en contexto con el CPH de clase I mediante la vía de reciclaje del endosoma (Donaldson J.G., Nat Rev Mol Cell Biol. Sep. 2009; 10(9): 597-608) y no requiere su transporte a la maquinaria de procesamiento de antígenos en el citosol ni otro procesamiento en la célula. De ahí que el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T y un resto de unión a célula diana se acoplen entre sí por medio de un enlace escindible para liberar (después de la escisión) el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T que consiste en su secuencia de aminoácidos original. En otras palabras, cuando el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T se escinde del inmunoconjugado, no comprende ningún residuo de aminoácido adicional o carece de cualquier residuo de aminoácido cuando se compara con la secuencia de aminoácidos del péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T natural (es decir, el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T liberado es de la misma longitud que el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T natural correspondiente). Debido a esto, los inmunoconjugados de acuerdo con la invención son candidatos más adecuados para mediar en la activación de los linfocitos T CD8 e inducir la muerte celular en las células diana. Con los inmunoconjugados de acuerdo con la invención, se induce la lisis de las células diana (a) con cantidades considerablemente reducidas de inmunoconjugado requerido y (b) más rápidamente, específicamente cuando se compara con construcciones de las que se separa un péptido que requiere otro procesamiento en la célula diana.

La invención se refiere a un inmunoconjugado que comprende al menos un péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T que es presentable por medio del CPH de clase I acoplado a un resto de unión a célula diana por medio de un enlace escindible, en el que el enlace escindible se dispone de tal manera que tras la escisión dicho péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T, que es directamente presentable por medio de una molécula de CPH de clase I, se libera del inmunoconjugado, caracterizado por que el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T natural comprende al menos un residuo de cisteína y por que el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T no modificado se acopla covalentemente al anticuerpo de unión a célula diana por medio de un enlace disulfuro. En un modo de realización de la invención, el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T se libera en el compartimento endosómico de la célula diana. En otro modo de realización de la invención, el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T liberado es presentable por medio del CPH de clase I sin otro procesamiento en la célula diana.

En un modo de realización de la invención, la secuencia de aminoácidos del péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T liberado es idéntica a una secuencia de aminoácidos de un péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T natural.

En un modo de realización de la invención, la secuencia de aminoácidos del péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T liberado es idéntica a la secuencia de aminoácidos del péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T acoplado al resto de unión a célula diana.

En un modo de realización de la invención, el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T liberado consiste en el número idéntico de aminoácidos que el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T acoplado a la proteína de unión a célula diana y en el que el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T liberado es adecuado para su presentación por medio del complejo CPH de clase I.

En un modo de realización de la invención, el inmunoconjugado comprende al menos un péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T que consiste en de 8 - 12 residuos de aminoácido que es presentable por medio del CPH de clase I acoplado a un resto de unión a célula diana por medio de un enlace escindible, en el que el enlace escindible se dispone de tal manera que tras la escisión dicho péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T se libera del inmunoconjugado, en el que el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T liberado consiste en el número idéntico de aminoácidos que el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T unido al resto de unión a célula diana.

En un modo de realización de la invención, el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T consiste en de 8 a 12 aminoácidos.

En un modo de realización de la invención, el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T es un péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T natural.

En un modo de realización de la invención, el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T comprende al menos un residuo de cisteína. En un modo de realización de la invención, el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T es un péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T natural que comprende al menos un residuo de cisteína. En un modo de realización de la invención, el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T comprende un residuo de cisteína N o C terminal. En un modo de realización de la invención, el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T es un péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T natural que comprende un residuo de cisteína N o C terminal.

En un modo de realización de la invención, el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T comprende un residuo de cisteína en la posición N terminal (posición 1 desde el sentido N terminal al C terminal) de su secuencia de aminoácidos. En un modo de realización de la invención, el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T comprende de forma natural un residuo de cisteína en la posición N terminal (posición 1 desde el sentido N terminal al C terminal) de su secuencia de aminoácidos.

En un modo de realización de la invención, el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T comprende un residuo de leucina en la posición 2 desde el sentido N terminal al C terminal de su secuencia de aminoácidos. En un modo de realización de la invención, el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T comprende de forma natural un residuo de leucina en la posición 2 desde el sentido N terminal al C terminal de su secuencia de aminoácidos. En un modo de realización de la invención, el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T consiste en de 8 - 12 residuos de aminoácido y comprende de forma natural un residuo de leucina en la posición 2 desde el sentido N terminal al C terminal de su secuencia de aminoácidos.

En un modo de realización de la invención, el inmunoconjugado incluye hasta cinco péptidos que provocan la respuesta de los linfocitos T. En un modo de realización de la invención, el inmunoconjugado incluye hasta diez péptidos que provocan la respuesta de los linfocitos T.

En un modo de realización de la invención, el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T se deriva de un patógeno no propio, que se reconoce por las células inmunitarias del organismo huésped de las células diana. En un modo de realización de la invención, el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T se deriva de un patógeno intracelular o extracelular. En un modo de realización de la invención, el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T se deriva de un patógeno intracelular. En un modo de realización de la invención, el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T se deriva de un patógeno intracelular vírico.

En un modo de realización, el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T se selecciona de la SEQ ID NO: 2 a la SEQ ID NO: 5.

En un modo de realización, el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T se deriva del virus de Epstein-Barr. En un modo de realización, el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T se deriva del virus de Epstein-Barr y se selecciona de la SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4.

En un modo de realización, el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T se deriva del virus del herpes humano 5. En un modo de realización, el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T se deriva del virus del herpes humano 5 y es de la SEQ ID NO: 5.

En un modo de realización, el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T se deriva de la gripe A. En un modo de realización, el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T se deriva de la gripe A y es de la SEQ ID NO: 3.

En un modo de realización, la secuencia de aminoácidos del péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T acoplado al resto de unión a célula diana es idéntica a una secuencia parcial, preferentemente de 8 a 12 aminoácidos de largo, de la secuencia de aminoácidos de un antígeno proteico de un patógeno no propio (en un modo de realización, un patógeno intracelular).

El péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T se une al resto de unión a célula diana por medio de un enlace escindible. En un modo de realización de la invención, el enlace escindible es escindible mediante escisión química, dependiente del pH o enzimática.

En un modo de realización de la invención, el enlace escindible es escindible después de la internalización del inmunoconjugado en la célula diana.

En un modo de realización de la invención, el enlace escindible es escindible en el compartimento endosómico de la célula diana. En un modo de realización de la invención, el enlace escindible es escindible después de la internalización del inmunoconjugado en la célula diana en el compartimento endosómico de la célula diana.

En un modo de realización de la invención, el enlace escindible permite la liberación sin trazas del péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T del inmunoconjugado.

En un modo de realización de la invención, el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T se acopla covalentemente al resto de unión a célula diana. En un modo de realización de la invención, el enlace escindible es un enlace disulfuro. En un modo de realización de la invención, el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T comprende al menos un residuo de cisteína y el enlace escindible es un enlace disulfuro. En un modo de realización preferente de la invención, el resto de unión a célula diana es una proteína y se forma un enlace disulfuro entre un residuo de cisteína del péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T y un residuo de cisteína de la proteína de unión a célula diana. En otro modo de realización preferente, un conector peptídico está presente entre el resto de unión a célula diana y el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T. En este caso, se forma el enlace disulfuro entre un residuo de cisteína del péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T y un residuo de cisteína del conector peptídico.

En un modo de realización de la invención, el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T y el resto de unión a célula diana se acoplan por medio de un resto conector escindible.

El inmunoconjugado de acuerdo con la invención comprende un resto de unión a célula diana para enviar el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T a la célula diana.

En un modo de realización de la invención, el resto de unión a célula diana se puede internalizar en la célula diana.

En un modo de realización de la invención, el resto de unión a célula diana se une a un antígeno de superficie celular de la célula diana.

En un modo de realización de la invención, la célula diana es una célula tumoral. En otro modo de realización de la invención, en el que la célula diana es una célula tumoral, el resto de unión a célula diana se puede unir específicamente a un antígeno específico de tumor (AET, que solo está presente en células tumorales y no en otras células) expresado en la superficie o un antígeno asociado a tumor (AAT, que está presente en células tumorales y, en menor medida, en algunas otras células) expresado en la superficie.

En un modo de realización de la invención, la célula diana es una célula asociada con la gravedad de la enfermedad en una enfermedad infecciosa, una enfermedad autoinmunitaria, diabetes o alergia.

En un modo de realización preferente de la invención, el resto de unión a célula diana es un anticuerpo.

En un modo de realización, el resto de unión a célula diana se une específicamente a CD19 o CDCP-1. En un modo de realización, el resto de unión a célula diana se une específicamente a CD19. En un modo de realización, el resto de unión a célula diana se une específicamente a CDCP-1.

En un modo de realización preferente de la invención, el resto de unión a célula diana es un anticuerpo que se une específicamente a CD19 o CDCP-1. En un modo de realización preferente de la invención, el resto de unión a célula diana es un anticuerpo que se une específicamente a CD19. En un modo de realización preferente de la invención, el resto de unión a célula diana es un anticuerpo que se une específicamente a CDCP-1.

En un modo de realización de la invención, el inmunoconjugado se puede internalizar en la célula diana.

De acuerdo con la invención, el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T es directamente presentable mediante el CPH de clase I y no requiere otro procesamiento en la célula diana. Por lo tanto, en un modo de realización de la invención, el inmunoconjugado no comprende un dominio de translocación.

Con la invención, se proporciona un inmunoconjugado que permite la liberación de un péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T que es directamente presentable por medio del CPH de clase I. Como el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T liberado no requiere su transporte a la maquinaria de procesamiento de antígenos en el citosol, el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T se presenta en la superficie de la célula diana en un corto periodo de tiempo. De ahí que, en un modo de realización de la invención, en menos de 12 horas después de la

internalización del inmunoconjugado en la célula diana, el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T se presente en la superficie de la célula diana por medio de una molécula de CPH de clase I. En otro modo de realización de la invención, en menos de 6 horas después de la internalización del inmunoconjugado en la célula diana, el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T se presenta en la superficie de la célula diana por medio de una molécula de CPH de clase I. En otro modo de realización de la invención, el inmunoconjugado puede mediar en la citotoxicidad de los linfocitos T frente a la célula diana en menos de 6 horas después de la internalización del inmunoconjugado en la célula diana.

La invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende un inmunoconjugado de acuerdo con la invención. Un modo de realización de la invención es una composición farmacéutica que comprende un inmunoconjugado de acuerdo con la invención en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto de la invención es el uso de un péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T que es presentable por medio del CPH de clase I como se describe y define además anteriormente para la generación de un inmunoconjugado de acuerdo con la invención.

En el presente documento se divulga el uso de un inmunoconjugado de acuerdo con la invención para inducir específicamente la citotoxicidad de los linfocitos T frente a la célula diana. En un modo de realización de la presente divulgación, se usa el inmunoconjugado para inducir específicamente la inmunidad mediada por células por medio de linfocitos T CD8 frente a una célula diana. En un modo de realización de la presente divulgación, se internaliza el inmunoconjugado en la célula diana y se libera el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T del inmunoconjugado en el compartimento endosómico de la célula diana. En un modo de realización de la presente divulgación, en menos de 12 horas después de la internalización del inmunoconjugado en la célula diana, el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T se presenta en la superficie de la célula diana por medio de una molécula de CPH de clase I. En un modo de realización de la presente divulgación, en menos de 6 horas después de la internalización del inmunoconjugado en la célula diana, el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T se presenta en la superficie de la célula diana por medio de una molécula de CPH de clase I.

En otro modo de realización de la presente divulgación, se usa el inmunoconjugado para mediar en la citotoxicidad de los linfocitos T frente a la célula diana en menos de 6 horas después de la internalización del inmunoconjugado en la célula diana.

Otro aspecto de la invención es un procedimiento para la generación de un inmunoconjugado de acuerdo con la invención, que comprende las etapas de

a) proporcionar el resto de unión a célula diana recombinante,

b) proporcionar el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T, y

c) acoplar al menos uno de dichos péptidos que provocan la respuesta de los linfocitos T a dicho resto de unión a célula diana por medio del enlace escindible.

Un modo de realización de la invención se refiere a un procedimiento para la generación de un inmunoconjugado, en el que un péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T no modificado se acopla al resto de unión a célula diana. En otras palabras, un modo de realización de la invención se refiere a un procedimiento para la generación de un inmunoconjugado en el que se proporciona el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T sin modificaciones de la secuencia de aminoácidos y se acopla al resto de unión a célula diana.

En el presente documento también se divulga un procedimiento para la producción de un inmunoconjugado de acuerdo con la invención para inducir específicamente la inmunidad mediada por células por medio de linfocitos T CD8 frente a célula diana, que comprende las etapas de

a) proporcionar el resto de unión a célula diana recombinante,

b) proporcionar el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T, y

c) acoplar al menos uno de dichos péptidos que provocan la respuesta de los linfocitos T a dicho resto de unión a célula diana por medio del enlace escindible. En un modo de realización de la presente divulgación, un péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T no modificado se acopla al resto de unión a célula diana.

En el presente documento también se divulga el uso de un inmunoconjugado de acuerdo con la invención para la fabricación de una composición farmacéutica. En el presente documento también se divulga un procedimiento para la fabricación de una composición farmacéutica que comprende un inmunoconjugado de acuerdo con la invención, que incluye formular el inmunoconjugado de acuerdo con la invención en combinación con al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto de la invención es el inmunoconjugado de acuerdo con la invención para su uso como un medicamento. Otro aspecto de la invención es el inmunoconjugado de acuerdo con la invención, que comprende un resto de unión a célula cancerosa, para el tratamiento del cáncer.

Otro aspecto de la invención es el inmunoconjugado de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento de enfermedades infecciosas, enfermedades autoinmunitarias, diabetes o alergia.

Otro aspecto de la invención es el inmunoconjugado de acuerdo con la invención para su uso para inducir específicamente la inmunidad mediada por células por medio de linfocitos T CD8 frente a las células diana.

En el presente documento también se divulga la composición farmacéutica de acuerdo con la invención para su uso como un medicamento. En el presente documento también se divulga la composición farmacéutica de acuerdo con la invención, en la que el inmunoconjugado comprendido en la composición farmacéutica comprende un resto de unión a célula cancerosa, para el tratamiento del cáncer. En el presente documento también se divulga la composición farmacéutica de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento de enfermedades infecciosas, enfermedades autoinmunitarias, diabetes o alergia. En el presente documento también se divulga la composición farmacéutica de acuerdo con la invención para su uso para inducir específicamente la inmunidad mediada por células por medio de linfocitos T CD8 frente a las células diana.

En el presente documento también se divulga el uso de un inmunoconjugado de acuerdo con la invención para la fabricación de un medicamento. En el presente documento también se divulga el uso de un inmunoconjugado de acuerdo con la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

En el presente documento también se divulga el uso de un inmunoconjugado de acuerdo con la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades infecciosas, enfermedades autoinmunitarias, diabetes o alergia. En el presente documento también se divulga el uso de un inmunoconjugado de acuerdo con la invención para la fabricación de un medicamento para la inducción específica de la inmunidad mediada por células por medio de linfocitos T CD8 frente a las células diana.

En el presente documento también se divulga un procedimiento de tratamiento de un paciente que padece una enfermedad mediante administración de un inmunoconjugado de acuerdo con la invención al paciente que necesita dicho tratamiento. En el presente documento también se divulga un procedimiento de tratamiento de un paciente que padece cáncer mediante administración de un inmunoconjugado de acuerdo con la invención que comprende un resto de unión a célula cancerosa al paciente que necesita dicho tratamiento. En el presente documento también se divulga un procedimiento de tratamiento de un paciente que padece una enfermedad infecciosa, una enfermedad autoinmunitaria, diabetes o alergia mediante administración de un inmunoconjugado de acuerdo con la invención al paciente que necesita dicho tratamiento.

En el presente documento también se divulga un procedimiento de tratamiento de un paciente que padece una enfermedad mediante administración de una composición farmacéutica de acuerdo con la invención al paciente que necesita dicho tratamiento. En el presente documento también se divulga un procedimiento de tratamiento de un paciente que padece cáncer mediante administración de una composición farmacéutica de acuerdo con la invención al paciente que necesita dicho tratamiento. En el presente documento también se divulga un procedimiento de tratamiento de un paciente que padece una enfermedad infecciosa, una enfermedad autoinmunitaria, diabetes o alergia mediante administración de una composición farmacéutica de acuerdo con la invención al paciente que necesita dicho tratamiento.

3. Modos de realización específicos de la invención

En lo que sigue, se enumeran modos de realización específicos de la invención.

1. Un inmunoconjugado que comprende al menos un péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T natural que es presentable por medio del CPH de clase I acoplado a un anticuerpo de unión a célula diana por medio de un enlace escindible, en el que el enlace escindible se dispone de tal manera que tras la escisión dicho péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T, que es directamente presentable por medio de una molécula de CPH de clase I, se libera del inmunoconjugado, caracterizado por que el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T natural comprende al menos un residuo de cisteína y por que el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T no modificado se acopla covalentemente al resto de unión a célula diana por medio de un enlace disulfuro.

2. El inmunoconjugado de acuerdo con el modo de realización 1, en el que la secuencia de aminoácidos del péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T liberado es idéntica a una secuencia de aminoácidos de un péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T natural.

3. El inmunoconjugado de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización precedentes, en el que el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T comprende un residuo de cisteína N o C terminal.

4. El inmunoconjugado de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización precedentes, en el que el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T comprende un residuo de leucina en la posición 2 (contada desde el sentido N terminal al C terminal).

5. El inmunoconjugado de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización precedentes, que comprende hasta cinco péptidos que provocan la respuesta de los linfocitos T.

6. El inmunoconjugado de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización precedentes, en el que el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T consiste en de 8 a 12 aminoácidos.

7. El inmunoconjugado de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización precedentes, en el que el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T se deriva del virus de Epstein-Barr, virus del herpes humano 5 o gripe A.

8. El inmunoconjugado de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización precedentes, en el que el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T se deriva del virus de Epstein-Barr.

9. El inmunoconjugado de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización precedentes, en el que el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T se deriva del virus del herpes humano 5.

10. El inmunoconjugado de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización precedentes, en el que el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T se deriva de la gripe A.

11. El inmunoconjugado de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización precedentes, en el que el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T se selecciona de la SEQ ID NO: 2 a la SEQ ID NO: 5.

12. El inmunoconjugado de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización precedentes, en el que el enlace escindible es escindible después de la internalización del inmunoconjugado en la célula diana.

13. El inmunoconjugado de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización precedentes, en el que el enlace escindible es escindible en el compartimento endosómico de la célula diana.

14. El inmunoconjugado de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización precedentes, en el que el resto de unión a célula diana se puede internalizar en la célula diana.

15. El inmunoconjugado de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización precedentes, en el que el resto de unión a célula diana se une a un antígeno de superficie celular de la célula diana.

16. El inmunoconjugado de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización precedentes, en el que la célula diana es una célula tumoral.

17. El inmunoconjugado de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización precedentes, en el que el anticuerpo de unión a célula diana se une específicamente a CD19 o CDCP-1.

18. El inmunoconjugado de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización precedentes, en el que el anticuerpo de unión a célula diana se une específicamente a CD19.

19. El inmunoconjugado de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización precedentes, en el que el anticuerpo de unión a célula diana se une específicamente a CDCP-1.

20. El inmunoconjugado de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización precedentes que se puede internalizar en la célula diana.

21. El inmunoconjugado de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización precedentes, en el que el inmunoconjugado no comprende un dominio de translocación.

22. El inmunoconjugado de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización precedentes, en el que en menos de 12 horas después de la internalización del inmunoconjugado en la célula diana, el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T se presenta en la superficie de la célula diana por medio de una molécula de CPH de clase I.

23. Una composición farmacéutica que comprende un inmunoconjugado de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización precedentes en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

24. Uso de un péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T que es presentable por medio del CPH de clase I para la generación de un inmunoconjugado de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 1 a 22.

25. Un procedimiento para la generación de un inmunoconjugado de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 1 a 22, que comprende las etapas de

- o proporcionar el resto de unión a célula diana recombinante,
- o proporcionar el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T,
- o acoplar al menos uno de dichos péptidos que provocan la respuesta de los linfocitos T a dicho resto de unión a célula diana por medio del enlace escindible.

26. El procedimiento de acuerdo con el modo de realización 25, en el que un péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T no modificado se acopla al resto de unión a célula diana.

27. El inmunoconjugado de acuerdo con uno de los modos de realización 1 a 22 para su uso como un medicamento.

28. El inmunoconjugado de acuerdo con uno de los modos de realización 1 a 22, que comprende un resto de unión a célula cancerosa, para el tratamiento del cáncer.

29. El inmunoconjugado de acuerdo con uno de los modos de realización 1 a 22 para el tratamiento de enfermedades infecciosas, enfermedades autoinmunitarias, diabetes o alergia.

DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS

SEQ ID NO:1	Péptido pp65 495-503 del virus del herpes humano 5 (CMV) NLVPMVATV
SEQ ID NO:2	Péptido LMP-2 426-434 del virus de Epstein-Barr (VEB) CLGGLLTMV
SEQ ID NO:3	Péptido de NP 44-52 de la gripe A (GRIPE) CTELKLSDY
SEQ ID NO:4	Péptido BLMF-1 280-288 del virus de Epstein-Barr (VEB) GLCTLVAML
SEQ ID NO:5	Péptido 309-317 del virus del herpes humano 5 (CMV) CRVLCCYVL
SEQ ID NO:6	Péptido pp65 495-503 del virus del herpes humano 5 (CMV) modificado (péptido de cCMV) CNLVPMVATV
SEQ ID NO:7	Péptido pp65 495-503 del virus del herpes humano 5 (CMV) modificado (péptido de CMVc) NLVPMVATVC
SEQ ID NO:8	Péptido pp65 495-503 del virus del herpes humano 5 (CMV) modificado (péptido de rcCMV) CLVPMVATV
SEQ ID NO:9	Péptido pp65 495-503 del virus del herpes humano 5 (CMV) modificado (péptido de CMVrc) NLVPMVATC
SEQ ID NO: 10	Péptido pp65 495-503 del virus del herpes humano 5 (CMV) modificado (péptido de CMVpen) NLVPMVATX, en la que X = penicilamina, un residuo de valina modificado, en la que un grupo SH se une a Cβ

EJEMPLOS

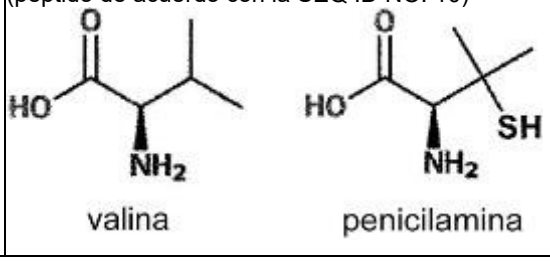
Los siguientes ejemplos se proporcionan para ayudar a la comprensión de la presente invención, exponiéndose su alcance real en las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo 1:

Influencia de la modificación C o N terminal del péptido de CMV sobre la unión al CPH de clase I (HLA-A2) y activación de los linfocitos T específicos para CMV

Para evaluar el impacto de las modificaciones de aminoácidos C o N terminales incluidas en un péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T natural, el péptido de CMV procesado de forma natural de la secuencia de aminoácidos NLVPMVATV (SEQ ID NO. 1) se sometió a las siguientes modificaciones:

cCMV	adición de un residuo de cisteína en el extremo N del péptido (péptido de acuerdo con la SEQ ID NO: 6)
CMVc	adición de un residuo de cisteína en el extremo C del péptido (péptido de acuerdo con la SEQ ID NO: 7)

rcCMV	sustitución del aminoácido N terminal del péptido con un residuo de cisteína (péptido de acuerdo con la SEQ ID NO: 8)
CMVrc	sustitución del aminoácido C terminal del péptido con un residuo de cisteína (péptido de acuerdo con la SEQ ID NO: 9)
CMVpen	sustitución del residuo de valina C terminal con penicilamina (péptido de acuerdo con la SEQ ID NO: 10)  valina penicilamina

Los péptidos se sintetizaron usando una química con Fmoc estándar. Todos los aminoácidos usados fueron isómeros L.

Ejemplo 1A

Generación de linfocitos T específicos para péptidos de CMV a partir de sangre periférica de donantes sanos

Se investigó la frecuencia de los linfocitos T CD8 específicos para péptidos de CMV en PBMC recién aisladas de donantes sanos o en cultivos de linfocitos T en FACS por medio de tinción con pentámero.

En resumen, se lavaron alícuotas de cultivos de 3-5x10E05 linfocitos T o PBMC recién aisladas de donantes sanos compatibles con respecto a HLA-A2 con tampón BD FACS y se incubaron con 100 µl de tampón BD FACS que comprendía 5 µl de TruStain FcX humano (BioLegend, 422302) durante 15 min a temperatura ambiente. Luego se añadieron 90 µl de tampón BD FACS que comprendía 10 µl de CMV-pentámero conjugado con biotina (ProImmune, F008-4, 1:10) y se incubó durante 1 h a 4 °C.

Tras lavar con tampón BD FACS, las células se tiñeron en 100 µl de tampón BD FACS con mAb anti-CD8a marcado con FITC (clon FT8, ProImmune), así como conjugado estreptavidina-CPA a 4 °C durante 20 min. Después del lavado 3x con tampón BD FACS y centrifugación, se resuspendieron las células en 200 µl de tampón BD FACS que contenía 1 µg/ml de DAPI y se analizaron las señales de IFM de las células teñidas mediante el citómetro de flujo BD Biosciences FACSCanto II. Se usaron células de donantes de HLA-A1 para la evaluación de la unión no específica de tetrámeros.

Se usaron PBMC recién aisladas para la estimulación el día del aislamiento con el péptido derivado de CMV NLVPMVATV (SEQ ID NO: 1) como sigue:

Se incubaron 2x10E5 células por 96 pocillos en 200 µl de medio RPMI+ que contenía péptido 1 µM durante tres días en placas de 96 pocillos. El día 3, se centrifugaron las placas a 300 g durante 2 min y se retiraron 160 µl de sobrenadante de los pocillos y se reemplazó por medio RPMI+ recién preparado que contenía péptido 1 µM y 100 U/ml de IL-2. El día 8 y 10, se reemplazó nuevamente el medio como se describe el día 3. Las células cultivadas se separaron el día 14 sin estimulación con péptido. El día 16, se reestimuló el cultivo de células con PBMC autólogas (irradiadas con 11 grays) y se pulsó con péptido de CMV como sigue: 12x10E6 linfocitos T por pocillo en 2000 µl de medio RPMI+ que contenía péptido 1 µM más 8,7x10E6 PBMC irradiadas por pocillo en una placa de 6 pocillos. Los días 19, 21 y 25, se separó nuevamente el cultivo y se estimuló como se describe anteriormente el día 30. Los días 35, 37, 41, se separó el cultivo y el día 44 se reestimuló de acuerdo con el protocolo. El cultivo se sometió a prueba para determinar la frecuencia de las células específicas para péptidos de CMV y se usó el día 51 en el ensayo de citotoxicidad basado en LDH y el día 54 en el ensayo ELISPOT para determinar la especificidad frente a las células cargadas con el péptido de CMV indicado.

Ejemplo 1B

Evaluación de la activación de los linfocitos T específicos para péptidos de CMV después del tratamiento de células tumorales con péptidos de CMV libres mediante IFNγ-ELISPOT

Se evaluó la activación de los linfocitos T específicos para péptidos de CMV restringidos por HLA-A2 mediante IFNγ-ELISPOT en líneas de células tumorales diferentes que expresaban niveles diferentes de moléculas de CPH I pertinentes en la superficie:

- MDA-MB 231: alto contenido de HLA-A2
- HCT-116: bajo contenido de HLA-A2

- T2: una línea de células deficitaria en TAP, que no expresa moléculas de CPH de clase I no cargado en la superficie de las células

En resumen, se trataron respectivamente 10.000 células tumorales con concentraciones diferentes de los péptidos de CMV modificados libres (cCMV, CMVc, rcCMV, CMVrc, CMVpen) o el péptido de CMV no modificado natural (en concentraciones de 13,245 µM o 1,3245 µM) en presencia de 500 linfocitos T CD8 específicos para CMV obtenidos en el ejemplo 1A. Como controles, se incubaron las células tumorales y los linfocitos T en ausencia de péptido libre y, como otro control, los linfocitos T se incubaron solos, en las mismas condiciones.

Los experimentos se llevaron a cabo usando medio RPMI+ que contenía suero o bien medio AIM-V libre de suero.

El IFNγ-ELISPOT se realizó como sigue:

El día 1, se lavaron las placas con PBS estéril. Posteriormente, se añadieron 50 µl de medio RPMI+ por pocillo y las placas se incubaron durante 20-30 min. Posteriormente, a los péptidos se añadieron 50 µl de RPMI+ a los pocillos respectivos. Las células tumorales respectivas se obtuvieron usando Accutase. Se añadieron 10.000 células tumorales por pocillo en 100 µl de RPMI+ en los pocillos respectivos. Después de la incubación durante 20 min, las placas se incubaron en la oscuridad durante aproximadamente 6 horas. Se filtraron los linfocitos T a través de una malla de 40 µm y se lavaron una vez en RPMI+ (centrifugación a 300 g, 2 min). Se añadieron 50 µl de medio RPMI+ que contenía 500 linfocitos T CD8 específicos para péptidos. Las placas se incubaron durante la noche.

El día 2, se vaciaron y lavaron las placas con PBS. El anticuerpo monoclonal anti-IFN-γ humano (Mabtech 7-B6-ALP) se diluyó a 1:200 en PBS filtrado/FCS al 0,5 %. Se añadieron 100 µl de anticuerpo diluido por pocillo y se incubaron durante 2 horas. Posteriormente, se lavaron las placas con PBS. Se filtró la solución de sustrato (BCIP/NBT-plus) a través de un filtro de 0,45 µm. Se añadieron 100 µl de solución de sustrato por pocillo y se permitió su desarrolló hasta que aparecieron distintos puntos. Después de detener su desarrollo lavando con agua corriente, se secaron las placas en la oscuridad.

Se analizaron las placas en un lector para ELISPOT (Cellular Technology Ltd.) usando el programa informático “ImmunoSpot 5.0 professional DC”.

La composición del medio RPMI+ fue como sigue:

500 ml	Medio RPMI 1640 (Life Technologies)
8 %	Suero humano (termoinactivado y filtrado)
1 %	L-glutamina
1 %	NEAA
1 %	Piruvato de sodio
0,2 %	PenStrep
0,1 %	β-mercaptoetanol

Los resultados se indican en la fig. 1.

Se observó que la modificación N terminal del péptido de CMV da lugar a una pérdida de activación de los linfocitos T. La modificación C terminal disminuyó la activación de los linfocitos T. Además, la modificación de una cadena lateral de un aminoácido presente de forma natural en la secuencia de aminoácidos del péptido de CMV da lugar a una pérdida de activación de los linfocitos T. De ahí que se pueda llegar a la conclusión de que las modificaciones en un péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T natural pueda tener un impacto (es decir, disminuir) sobre la carga en las moléculas de CPH de clase I y, en consecuencia, la activación de los linfocitos T.

Sin embargo, cuando se usan péptidos que provocan la respuesta de los linfocitos T naturales, se pueden asegurar la unión al y la carga en el CPH de clase I óptimas.

Ejemplo 2:

Modo de acción propuesto de los inmunoconjugados de acuerdo con la invención

La fig. 2 muestra un modo de acción propuesto de un inmunoconjugado de acuerdo con la invención. De forma ejemplar, un anticuerpo se muestra como resto de unión a célula diana, sin embargo, otros restos son igualmente adecuados.

En estado estacionario, la superficie de la célula diana (por ejemplo, la superficie de una célula tumoral) está dotada del antígeno diana al que se une específicamente el resto de unión a célula diana. Además, las moléculas de CPH de clase I que presentan péptidos propios se expresan en la superficie de la célula.

Sin quedar vinculada a esta teoría, la unión del inmunoconjugado al antígeno diana **(A)** da lugar a la internalización del complejo antígeno-inmunoconjugado diana **(B)** y la posterior liberación del péptido que provoca la respuesta de los

linfocitos T del inmunoconjugado en el compartimento endosómico temprano **(C)**. Es importante destacar que el péptido liberado consiste en una secuencia de aminoácidos idéntica a su péptido natural correspondiente y no comprende ninguna modificación de aminoácidos, específicamente ninguna modificación de aminoácidos C o N terminal.

Los péptidos propios presentes en las moléculas de CPH de clase I se intercambian de forma pasiva por el péptido no propio (es decir, el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T escindido del inmunoconjugado) en el compartimento endosómico **(D).** Las moléculas de CPH de clase I cargado con péptidos se envían a la superficie de la célula por medio del tráfico endosómico **(E)**, lo que da lugar a la presentación del péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T en la superficie de la célula diana en el contexto del CPH de clase I.

Los linfocitos T CD8 específicos para péptidos reconocen y se unen a las moléculas de CPH de clase I cargado con péptidos en la célula diana **(F)**, lo que da lugar a la inducción específica de la citotoxicidad de los linfocitos T frente a la célula diana.

Ejemplo 3:

Conjugación de un anticuerpo anti-CDCP1 monoclonal con al menos un péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T que es presentable por medio del CPH de clase I

Para generar un inmunoconjugado de acuerdo con la invención, se acopló un anticuerpo monoclonal (mAb) que se une específicamente a la proteína 1 que contiene el dominio CUB (CDCP1, también designada CD318, divulgada en el documento EP 1 396 501 A1) a uno cualquiera de los siguientes péptidos derivados de patógeno:

- péptido 426-434 del virus de Epstein-Barr (VEB) (SEQ ID NO: 2, CLGGLLTMV) o
- péptido 44-52 de NP de la gripe A (GRIPE) (SEQ ID NO: 3, CTELKLSDY).

Los péptidos se sintetizaron usando una química con Fmoc estándar. Todos los aminoácidos usados fueron isómeros L.

Ejemplo 3A:

Producción de inmunoconjugados que comprenden anticuerpo anti-CDCP1 monoclonal y péptido de VEB y/o de la GRIPE, en los que los péptidos se acoplan al anticuerpo por medio de un enlace S-S escindible

Para la producción de ejemplos de inmunoconjugados de acuerdo con la invención, en donde el inmunoconjugado comprende un enlace disulfuro para liberar el péptido tras la internalización en la célula diana, los péptidos se conjugaron con el anticuerpo como sigue:

El mAb para αCDCP1 se derivatizó en primer lugar en tampón fosfato de potasio 0,1 M a pH 7,2 en presencia de 10 eq. de 3-(2-piridilditio)-propionato de N-succinimidilo (SPDP, Pierce). Después de 2 horas de tiempo de reacción, se purificó el anticuerpo derivatizado mediante filtración en gel en tampón fosfato de potasio 0,1 M que contenía EDTA 10 mM a pH 7,0.

Para producir inmunoconjugados que comprendieran el péptido de VEB o bien de la GRIPE, se añadieron 10 eq. del péptido respectivo al anticuerpo derivatizado y se hizo reaccionar durante la noche. Los inmunoconjugados de acuerdo con la invención se purificaron mediante filtración en gel.

Para producir inmunoconjugados que comprendieran el péptido de VEB y de la GRIPE, se hizo reaccionar el anticuerpo derivatizado con 5 eq. de cada uno, péptido de VEB y de la GRIPE, durante la noche. Los inmunoconjugados de acuerdo con la invención se purificaron mediante filtración en gel.

Los inmunoconjugados producidos de acuerdo con la invención se denominan en el presente documento como sigue:

- <CDCP1-SS-pVEB> inmunoconjugado que comprende MAb anti-CDCP1 acoplado al péptido 426-434 de VEB mediante un enlace disulfuro

- <CDCP1-SS-pGRIPE> inmunoconjugado que comprende MAb anti-CDCP1 acoplado al péptido 44-52 de la GRIPE mediante un enlace disulfuro

- <CDCP1-SS-pVEB/GRIPE> inmunoconjugado que comprende MAb anti-CDCP1 acoplado al péptido 426-434 de VEB y al péptido 44-52 de la GRIPE mediante enlaces disulfuro respectivos

Ejemplo 3B (comparación):

Producción de inmunoconjugados que comprenden anticuerpo anti-CDCP1 monoclonal y péptido de VEB o de la GRIPE, en los que los péptidos se acoplan al anticuerpo por medio de un enlace tioéter no escindible

Para los análisis comparativos, los péptidos se conjugaron con el anticuerpo de una manera no escindible por medio de un enlace tioéter:

El mAb para αCDCP1 se derivatizó en primer lugar en tampón fosfato de potasio 0,1 M a pH 7,2 en presencia de 10 eq. de éster de N-épsilon-malemidocaproil-oxisuccinimida (EMCS, Pierce). Después de 2 horas de tiempo de reacción, se purificó el anticuerpo derivatizado mediante filtración en gel en tampón fosfato de potasio 0,1 M que contenía EDTA 10 mM a pH 7,0.

Luego se añadieron 10 eq. del péptido respectivo al anticuerpo derivatizado y se hizo reaccionar durante la noche. Los inmunoconjugados se purificaron mediante filtración en gel.

Los inmunoconjugados producidos usados para la comparación se denominan en el presente documento como sigue:

- <CDCP1-S-pVEB> inmunoconjugado que comprende MAb anti-CDCP1 acoplado al péptido 425-433 de VEB mediante un enlace tioéter

- <CDCP1-S-pGRIPE> inmunoconjugado que comprende MAb anti-CDCP1 acoplado al péptido 44-52 de la GRIPE mediante un enlace tioéter

Ejemplo 3C:

Análisis de datos de EM y evaluación de la estabilidad de inmunoconjugados que comprenden anticuerpo anti-CDCP1 monoclonal acoplado al péptido de VEB y/o de la GRIPE

Se analizó la velocidad de marcaje de los inmunoconjugados formados en el ejemplo 3A y 3B mediante CL-ESI-espectrometría de masas.

Preparación de las muestras: Se desglucosiló la IgG o IgG marcada con N-glucosidasa F antes de la medición. Se redujo de forma alternativa la IgG o IgG marcada con TCEP después de su desglucosilación para medir la cadena ligera y la cadena pesada por separado.

Se realizaron los **análisis de datos** usando un sistema de HPLC CL-ESI-EM (Waters) con una columna de fase inversa con un gradiente de agua:acetonitrilo y medición y detección mediante ESI-TOF-EM. Se realizó el análisis de datos de EM usando el programa informático MassLynx (Waters).

Los análisis mostraron que en promedio se acoplaron 0,8 péptidos a cada molécula de anticuerpo (datos no mostrados).

Para comprobar la estabilidad de los inmunoconjugados, se evaluó la estabilidad en la solución madre y en el medio de cultivo de células. Las soluciones madre de inmunoconjugados se filtraron mediante columnas de centrifugación (valor de corte de Pm de 50 kDa) y se analizaron mediante CL-EM. No se detectó ningún péptido libre. Se analizó el medio de cultivo de células que se enriqueció con inmunoconjugados mediante CL-EM. No se detectó ningún péptido libre. Como control positivo, el medio de cultivo de células se enriqueció con péptido libre.

Ejemplo 3D:

Estudios de unión celular de inmunoconjugados que comprenden anticuerpo anti-CDCP1 monoclonal acoplado al péptido de VEB y/o de la GRIPE a células MDA-MB 231 que expresan CDCP1

Para evaluar la unión de los inmunoconjugados a su antígeno respectivo, se evaluó la unión de los inmunoconjugados de los ejemplos 3A y 3B a células MDA-MB 231 que expresan CDCP1 en un ensayo de unión basado en FACS.

En resumen, se desprendieron células MDA-MB 231 por medio de tratamiento con Accutase, se separaron de los medios de desprendimiento mediante centrifugación y se suspendieron en medio de células MDA-MB 231 a una concentración de 4 x 10E06 células/ml. Se incubaron alícuotas de células de 50 µl con diluciones en serie (20 µg/ml - 0,02 µg/ml de inmunoconjugado en tampón BD FACS) de inmunoconjugado o anticuerpos anti-CDCP1 (anticuerpos anti-CDCP1 originales) no conjugados durante 30 min a 4 °C. Tras el lavado con tampón BD FACS, las células se tiñeron con anti-IgG H+L humana marcada con FITC (Invitrogen A11013; 10 µg/ml en tampón BD FACS) durante 30 min a 4 °C. Después del lavado y centrifugación, se analizaron las señales de IFM de las células teñidas mediante el citómetro de flujo BD Biosciences FACSCanto (figura 3).

Los resultados de los estudios de unión celular basados en FACS mostrados en la figura 3 demuestran que todos los inmunoconjugados se unen a células tumorales MDA-MB 231 que expresan CDCP1 de una manera comparable.

Ejemplo 3E:

Estudios de unión de inmunoconjugados que comprenden anticuerpo anti-CDCP1 monoclonal acoplado al péptido de VEB y/o de la GRIPE al dominio extracelular (DEC) de CDCP1 mediante resonancia de plasmón superficial

Se investigó la unión bioquímica de los inmunoconjugados de los ejemplos 3A y 3B al DEC de CDCP1 humano mediante resonancia de plasmón superficial usando un instrumento BIACORE T100 (GE Healthcare).

Se acoplaron alrededor de 2000 unidades de resonancia (UR) del sistema de captura (10 µg/ml de fragmento Fc de anti-IgG humana de cabra específico; Jackson Immuno Research) en una micromatriz CM4 (GE Healthcare, BR-1005-34) a pH 5,0 usando un kit de acoplamiento de amina suministrado por GE Healthcare. El tampón de migración para la inmovilización fue HBS-N, pH 7,4 (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, GE Healthcare, BR-1006-70). Para el ensayo cinético siguiente, el tampón de migración y dilución fue HBS-P, pH 7,4 (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, Surfactant P20 al 0,05 %, pH 7,4, GE Healthcare, BR-1006-71).

La cubeta de lectura se fijó a 25 °C y el bloque de muestra se fijó a 12 °C y se purgó dos veces con tampón de migración. Los inmunoconjugados y, para la comparación, el anticuerpo mAb anti-CDCP1 original (RO5464169-000-0004), se capturaron inyectando una solución de 1 µg/ml durante 60 s a un caudal de 10 µl/min.

Se midió la asociación mediante inyección de DEC de CDCP1 humano en diversas concentraciones en solución durante 180 s a un caudal de 30 µl/min, comenzando con 1350 nM, seguido de una dilución 1:1,5 y adicionalmente en diluciones 1:3. Se supervisó la fase de disociación durante hasta 300 s y se desencadenó cambiando de la solución de muestra al tampón de migración. Se regeneró la superficie lavando con dos inyecciones consecutivas de una solución de glicina a pH 1,7 durante 60 s a una caudal de 10 µl/min. Se corrigieron las diferencias en el índice de refracción aparente restando la respuesta obtenida de una superficie de Fc de anti-IgG humana de cabra. También se restan las inyecciones del blanco (= doble referencia). Para el cálculo de KD y otros parámetros cinéticos se usó el modelo 1:1 de Langmuir.

Los resultados se muestran en la tabla 1:

Tabla 1: Unión de inmunoconjugados a CDCP1 como se evalúa mediante Biacore®

inmunoconjugado	**k_D [s^{-1}]**
mAb para αCDCP1 original	5,6E-03
<CDCP1-SS-pVEB>	4,6E-03
<CDCP1-SS-pGRIPE>	5,5E-03
<CDCP1-SS-pVEB/GRIPE>	5,2E-03
<CDCP1-S-pVEB>	5,0E-03
<CDCP1-S-pGRIPE>	5,1E-03

Los resultados de los estudios mediante Biacore mostrados en la tabla 1 demuestran que todos los inmunoconjugados se unen a DEC de CDCP1 de una manera comparable en comparación con el anticuerpo de referencia anti-CDCP1 original.

Ejemplo 3F:

Estudios de internalización de inmunoconjugados que comprenden anticuerpo anti-CDCP1 monoclonal acoplado al péptido de VEB y/o de la GRIPE en células tumorales humanas (MDA-MB 231) que expresan CDCP1

Para la evaluación de la capacidad de internalización de los inmunoconjugados generados en comparación con el mAb anti-CDCP1 original, se realizó un ensayo de internalización basado en FACS con la línea de células tumorales humanas MDA-MB 231 que expresan CDCP1.

En resumen, se desprendieron células MDA-MB 231 por medio de tratamiento con Accutase, se separaron de los medios de desprendimiento mediante centrifugación y se suspendieron en medio de cultivo de células MDA-MB 231 (RPMI/glutamina 2 mM/FCS al 10 %) a una concentración de 3 x 10E06 células/ml. Se incubaron alícuotas de células de 50 µl con inmunoconjugados o anticuerpos originales (5 µg/ml en medio de cultivo de células MDA-MB 231) durante 30 min a 4 °C. Tras el lavado 2x con medio de cultivo de células MDA-MB 231 frío (RPMI/glutamina 2 mM/FCS al 10 %), se incubaron las células en 100 µl de medio a 4 °C o 37 °C durante 30, 60, 120, 240 min y durante la noche [23 h].

Después de los puntos de tiempo mencionados, las células se lavaron, centrifugaron y tiñeron con anti-IgG H+L humana marcada con Alexa488 (Invitrogen A11013; 10 µg/ml en tampón BD FACS) durante 30 min a 4 °C. Después del lavado 2x y centrifugación, se mantuvieron las células en 100 µl de tampón BD Cell-Fix y se analizaron las señales de IFM de las células teñidas mediante el citómetro de flujo BD Biosciences FACSCanto.

No se detectó ninguna internalización tras la incubación a 4 °C. Los resultados de los estudios de internalización a 37 °C se muestran en la tabla 2.

Tabla 2: Internalización de inmunoconjugados que comprenden anticuerpo anti-CDCP1 monoclonal acoplado al péptido de VEB y/o de la GRIPE en células tumorales humanas (MDA-MB 231) que expresan CDCP1 a 37 °C

	[%] de internalización a 37 °C después de				
	30 min	**60 min**	**120 min**	**240 min**	**23 h**
MAb anti-CDCP1 (control positivo)	30	39	55	68	87
<CDCP1-SS-pVEB>	27	35	50	63	87
<CDCP1-SS-pVEB/GRIPE>	27	35	54	65	87
<CDCP1-S-pVEB>	26	36	52	66	88
anti-IgG humana (control negativo)	0	0	0	0	0

Los resultados de los estudios de internalización basados en FACS muestran que todos los inmunoconjugados sometidos a prueba se internalizan en células tumorales MDA-MB 231 que expresan CDCP1 en comparación con el anticuerpo de referencia anti-CDCP1 original (RO5464169-000-0004).

Ejemplo 4:

Conjugación de un anticuerpo anti-CD19 monoclonal con al menos un péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T que es presentable por medio del CPH de clase I

Ejemplo 4A:

Producción de inmunoconjugados que comprenden anticuerpo anti-CD19 monoclonal y péptido de VEB y/o de la GRIPE, en los que los péptidos se acoplan al anticuerpo por medio de un enlace S-S escindible

Se acopló un mAb que se unía específicamente a CD19 (preparación propia purificada a partir de sobrenadante de hibridoma) a uno cualquiera de los péptidos usados en el ejemplo 3A.

Para la producción de ejemplos de inmunoconjugados de acuerdo con la invención, en los que el inmunoconjugado comprende un enlace disulfuro para liberar el péptido tras la internalización en la célula diana, los péptidos se conjugaron con el anticuerpo por medio de un enlace disulfuro como se describe en el ejemplo 3A.

Los inmunoconjugados producidos de acuerdo con la invención se denominan en el presente documento como sigue:

- <CD19-SS-pVEB> inmunoconjugado que comprende MAb anti-CD19 acoplado al péptido 426-434 de VEB mediante un enlace disulfuro

- <CD19-SS-pGRIPE> inmunoconjugado que comprende MAb anti-CD19 acoplado al péptido 44-52 de la GRIPE mediante un enlace disulfuro

- <CD19-SS-pVEB/GRIPE> inmunoconjugado que comprende MAb anti-CD19 acoplado al péptido 426-434 de VEB y al péptido 44-52 de la GRIPE mediante un enlace disulfuro

Ejemplo 4B:

Estudios de unión celular de inmunoconjugados que comprenden anticuerpo anti-CD19 monoclonal acoplado al péptido de VEB y/o de la GRIPE a células de linfoma no hodgkiniano, RL, que expresan CD19

Para evaluar la unión de los inmunoconjugados a su antígeno respectivo, se evaluó la unión de los inmunoconjugados del ejemplo 4A a células RL que expresan CD19 en un ensayo de unión basado en FACS.

En resumen, se cultivaron *in vitro* células RL en medio RPMI/glutamina 2 mM/FCS al 10 % (bajo contenido de IgG). Se incubaron alícuotas de 50 µl de suspensión de células RL (4 x 10E06 células/ml) con inmunoconjugados (2 µg/ml en tampón BD FACS) durante 30 min a 4 °C. Tras el lavado con tampón BD FACS, las células se tiñeron con anti-IgG H+L de ratón marcada con Alexa488 (Invitrogen 65E1-1; 10 µg/ml en tampón BD FACS) durante 30 min a 4 °C. Después del lavado y centrifugación, se analizaron las señales de IFM de las células teñidas mediante el citómetro de flujo BD Biosciences FACSCanto. Los resultados se muestran en la figura 4.

Los resultados de los estudios de unión celular basados en FACS mostrados en la figura 4 demuestran que todos los inmunoconjugados se unen a células RL que expresan CD19 de una manera comparable.

Ejemplo 4C:

Estudios de internalización de inmunoconjugados que comprenden anticuerpo anti-CD19 monoclonal acoplado al péptido de VEB y/o de la GRIPE en células de linfoma no hodgkiniano humanas (células RL) que expresan CD19 y línea de células de linfoma de Burkitt (células Ramos) humanas

Para la evaluación de la capacidad de internalización de los inmunoconjugados generados en comparación con el mAb anti-CD19 original, se realizó un ensayo de internalización basado en FACS con las líneas de células RL y Ramos que expresan CD19.

En resumen, se cultivaron *in vitro* células RL y Ramos en medio RPMI/glutamina 2 mM/FCS al 10 % (bajo contenido de IgG). Se incubaron alícuotas de 50 µl de suspensión de células RL y Ramos (4 x 10E06 células/ml) con inmunoconjugados o mAb anti-CD19 originales (5 µg/ml en medio de cultivo de células RL) durante 30 min a 4 °C. Tras el lavado 2x con medio de células RL frío, se incubaron las células en 100 µl de medio a 4 °C o 37 °C durante 30, 60, 120, 240 y 360 min y durante la noche [23 h].

Después de los puntos de tiempo mencionados, las células se lavaron, centrifugaron y tiñeron con anti-IgG H+L humana marcada con Alexa488 (JacksonImmuno 715-116-150, lote 90812; 2,5 µg/ml en tampón BD FACS) durante 30 min a 4 °C. Después del lavado 2x y centrifugación, se mantuvieron las células en 100 µl de tampón BD Cell-Fix y se analizaron las señales de IFM de las células teñidas mediante el citómetro de flujo BD Biosciences FACSCanto.

No se detectó ninguna internalización tras la incubación a 4 °C. Los resultados de los estudios de internalización a 37 °C se muestran en la tabla 3.

Tabla 3: Internalización de inmunoconjugados que comprenden anticuerpo anti-CD19 monoclonal acoplado al péptido de VEB y/o de la GRIPE en células tumorales humanas (RL) que expresan CD19 a 37 °C

	[%] de internalización en RL a 37 °C después de				
	30 min	**60 min**	**240 min**	**360 min**	**23 h**
MAb anti-CD19 (control positivo)	43	57	80	84	90
<CD19-SS-pVEB>	46	65	81	85	92
<CD19-SS-pVEB/GRIPE>	43	63	82	92	n.d.
anti-IgG humana (control negativo)	0	0	0	n.d.	0

Los resultados de los estudios de internalización basados en FACS muestran que los inmunoconjugados sometidos a prueba se internalizan en células RL que expresan CD19 en comparación con el anticuerpo de referencia anti-CD19 original.

Ejemplo 5:

Activación de los linfocitos T CD8 después del tratamiento de células tumorales con inmunoconjugados que comprenden anticuerpo anti-CDCP1 monoclonal y péptidos de VEB e inmunoconjugados que comprenden anticuerpo anti-CD19 monoclonal y péptidos de VEB

Ejemplo 5A:

Generación de linfocitos T específicos para péptidos de VEB a partir de sangre periférica de donantes sanos

Se investigó la frecuencia de los linfocitos T CD8 específicos para péptidos de VEB en PBMC recién aisladas de donantes sanos o en cultivos de linfocitos T en FACS por medio de tinción con pentámero.

En resumen, se lavaron alícuotas de cultivos de 4-5x10E05 linfocitos T o PBMC recién aisladas de donantes sanos compatibles con respecto a HLA-A2 con tampón BD FACS y se incubaron con 100 µl de tampón BD FACS que comprendía 5 µl de TruStain FcX humano (BioLegend, 422302) durante 15 min a temperatura ambiente. Luego se añadieron 90 µl de tampón BD FACS que comprendía 10 µl de VEB-pentámero conjugado con biotina (ProImmune, F042-84A-E) y se incubó durante 1 h a 4 °C.

Tras lavar con tampón BD FACS, las células se tiñeron en 100 µl de tampón BD FACS con mAb anti-CD8a marcado con FITC (clon LT8, ProImmune), así como conjugado estreptavidina-CPA a 4 °C durante 20 min. Después del lavado 3x con tampón BD FACS y centrifugación, se resuspendieron las células en 200 µl de tampón BD FACS y se analizaron las

señales de IFM de las células teñidas mediante el citómetro de flujo BD Biosciences FACSCanto II. Se usaron células de donantes de HLA-A1 para la evaluación de la unión no específica de tetrámeros.

Se generaron linfocitos T específicos para péptidos de VEB de acuerdo con el protocolo descrito en el ejemplo 1 para el péptido derivado de CMV, con la diferencia de que en este experimento se usó el péptido de VEB de acuerdo con la SEQ ID NO: 2 para la estimulación.

Ejemplo 5B:

Evaluación de la activación de los linfocitos T específicos para péptidos de VEB después del tratamiento de células tumorales HCT-116 con inmunoconjugados que comprenden anticuerpo anti-CDCP1 monoclonal y péptidos de VEB e inmunoconjugados que comprenden anticuerpo anti-CD19 monoclonal y péptidos de VEB mediante IFNγ-ELISPOT

Se evaluó la activación de los linfocitos T específicos para péptidos de VEB mediante IFNγ-ELISPOT usando células tumorales HCT-116 tratadas con los inmunoconjugados (IC) de los ejemplos 3A, 3B (IC que comprende anti-CDCP1 y péptidos de VEB) y 4A (IC que comprende anti-CD19 y péptidos de VEB) en presencia de los linfocitos T CD8 obtenidos en el ejemplo 5A. Para los análisis comparativos, los experimentos se llevaron a cabo simultáneamente con péptido libre (pVEB, control positivo) y con un inmunoconjugado de control formado por un anticuerpo anti-Dig acoplado al péptido de VEB como se describe en el ejemplo 3A (denominado <DIG-SS-pVEB>, control negativo).

El IFNγ-ELISPOT se realizó de acuerdo con el protocolo general descrito en el ejemplo 1B.

Los resultados se muestran en la fig. 5A.

Los resultados del IFNγ-ELISPOT demuestran que de los inmunoconjugados sometidos a prueba solo los que comprenden anticuerpo anti-CDCP1 monoclonal y péptidos de VEB acoplados por medio de un enlace escindible (<CDCP1-SS-VEB>) activan lo suficiente a los linfocitos T CD8 tras la internalización en las células tumorales, mientras que los inmunoconjugados que comprenden anticuerpo anti-CDCP1 monoclonal y péptidos de VEB acoplados por medio de un enlace no escindible (<CDCP1-S-VEB>) no pudieron activar a los linfocitos T CD8 específicos para péptidos. Los inmunoconjugados que comprenden anticuerpos que no se unen a las células diana (<DIG-SS-VEB> y <CD19-SS-VEB>) no activan a los linfocitos T. Además, los inmunoconjugados de acuerdo con la invención pueden activar los linfocitos T CD8 en cantidades bajas de incluso menos de 1 nmol/l.

Ejemplo 5C:

Evaluación de la activación de los linfocitos T específicos para péptidos de VEB después del tratamiento de células RL y Ramos con inmunoconjugados que comprenden anticuerpo anti-CD19 monoclonal y péptidos de VEB mediante IFNγ-ELISPOT

Para demostrar que la destrucción de las células tumorales se restringe a las células diana que expresan el subtipo de HLA que puede presentar el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T respectivo, se evaluó la activación de los linfocitos T específicos para péptidos de VEB mediante IFNγ-ELISPOT usando células RL, que expresan HLA-A2, y células Ramos, que no expresan HLA-A2, tratadas con los inmunoconjugados (IC) del ejemplo 4A (IC que comprende anti-CD19 y péptido de VEB restringido por HLA-A2) en presencia de los linfocitos T CD8 obtenidos en el ejemplo 5A. Para los análisis comparativos, los experimentos se llevaron a cabo simultáneamente con péptido libre (pVEB, control positivo).

El IFNγ-ELISPOT se realizó de acuerdo con el protocolo general descrito en el ejemplo 1B.

Los resultados se muestran en la fig. 5B, que indican que solo se observó la destrucción de las células tumorales en células RL, pero no en células Ramos.

Ejemplo 6:

Provisión de un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo anti-CDCP1 monoclonal acoplado a un péptido de VEB por medio de un enlace disulfuro escindible, en el que el péptido de VEB comprende de forma natural un residuo de cisteína no terminal y evaluación de la activación de los linfocitos T CD8 mediante IFNγ-ELISPOT

Mientras que en los ejemplos 3 y 4 se proporcionaron inmunoconjugados en los que se enlazaron *de forma terminal* los péptidos que provocan la respuesta de los linfocitos T a los anticuerpos respectivos para formar el inmunoconjugado, en este ejemplo, se formó el enlace disulfuro escindible entre el residuo de cisteína *no terminal* del péptido y el anticuerpo. Para esto, se proporcionó un péptido de VEB de la secuencia de aminoácidos GLCTLVAML (SEQ ID NO: 4) y se acopló al anticuerpo anti-CDCP1 como se describe en el ejemplo 3A.

Se evaluó la activación de los linfocitos T específicos para péptidos mediante IFNγ-ELISPOT en líneas de células tumorales diferentes que expresaban niveles diferentes de CPH I:

- MDA-MB 231, alto contenido de HLA-A2, y
- A375, bajo contenido de HLA-A2.

En resumen, se trataron respectivamente 10.000 células tumorales con concentraciones diferentes del inmunoconjugado en presencia de 500 linfocitos T CD8 específicos para péptidos obtenidos como se describe en el ejemplo 5B, sin embargo, usando, en cambio, el péptido de VEB GLCTLVAML. Como controles, se incubaron las células tumorales y los linfocitos T en ausencia de inmunoconjugado y, como otro control, los linfocitos T se incubaron solos, en las mismas condiciones.

Los inmunoconjugados producidos de acuerdo con la invención se denominan en el presente documento como sigue:

- <CDCP1-SS-pVEB(GLC)> inmunoconjugado que comprende MAb anti-CDCP1 acoplado al péptido de VEB GLCTLVAML mediante un enlace disulfuro

Los resultados del IFNγ-ELISPOT se muestran en la fig. 5C. Se observó la activación de los linfocitos T específicos para péptidos para ambas líneas de células tumorales sometidas a prueba para el inmunoconjugado de acuerdo con la invención de una manera dependiente de la dosis.

Ejemplo 7:

Mediación de la muerte celular inducida por linfocitos T CD8 en células tumorales MDA-MB231 tratadas con inmunoconjugados de acuerdo con la invención que comprenden anticuerpo anti-CDCP1 monoclonal y péptidos de VEB evaluada mediante el ensayo de liberación de LDH y xCELLigence

Se evaluó la activación de los linfocitos T específicos para péptidos de VEB y la destrucción de las células tumorales mediante un ensayo de liberación de LDH y mediante un ensayo xCELLigence usando células tumorales MDA-MB231 tratadas con concentraciones diferentes de inmunoconjugados (IC) de los ejemplos 3A, 3B (IC que comprende anti-CDCP1 y péptidos de VEB) en presencia de los linfocitos T CD8 obtenidos en el ejemplo 5A a una proporción de células efectoras con respecto a células diana de 3:1. Para los análisis comparativos, los experimentos se llevaron a cabo simultáneamente con péptido libre (pVEB, control positivo).

Se realizó la evaluación de la destrucción de las células tumorales cargadas con péptido vírico como resultado del tratamiento con inmunoconjugados por medio de supervisión dinámica de la proliferación y viabilidad de las células en el sistema xCELLigence usando el siguiente procedimiento general: se añadieron 50 µl de medio de células tumorales por pocillo y se realizó una medición de referencia inicial (etapa 1) en el instrumento RTCA (Roche Applied Sciences). Se añadieron las sustancias suspendidas en 50 µl de medio de células tumorales a la placa E. Las células tumorales se obtuvieron usando Accutase y se suspendieron las cantidades de células respectivas en 50 µl de medio de células tumorales y se añadió medio a la placa E.

Se usaron las siguientes cantidades de células para las líneas de células tumorales diferentes: A-375: 10.000 células; HCT-116: 20.000 células; PC-3: 10.000 células; MDA-MB231: 10.000 células.

Después de 10 min a temperatura ambiente, se dispusieron las placas en un instrumento RTCA y se realizó la etapa 2 (intervalo de 10 min, 200 intervalos). Posteriormente, las placas se incubaron durante aproximadamente 24 horas.

El día siguiente, los linfocitos T se lavaron en medio AIM-V y se suspendieron en medio AIM-V. Se añadieron linfocitos T a las placas hasta un volumen total de 200 µl. Se dispusieron las placas en el instrumento RTCA para realizar la etapa 3 (intervalo de 5 min, 300 intervalos). Las placas se incubaron durante la noche.

Se usaron las muestras para el análisis de liberación de LDH posterior.

Para la evaluación de la liberación de LDH, se lisaron las células añadiendo Triton X-100 al 1 %. Se transfirió el sobrenadante a una placa de 96 pocillos de fondo en V y se retiraron los restos celulares mediante centrifugación y se realizó otra transferencia del sobrenadante libre de restos celulares a una placa de 96 pocillos de fondo plano. Se analizó la liberación de LDH usando el ensayo de citotoxicidad basado en LDH (Roche, n.º 11644793001) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, se mezclaron el catalizador y la solución de tinte y se añadieron 100 µl de la mezcla de reacción resultante en cada pocillo y se incubó a temperatura ambiente en la oscuridad. Se midió la absorbancia a 492 nm (referencia: 620 nm) usando un lector Tecan para ELISA a t=15-45 min (normalmente 30 min).

Los resultados se muestran en la fig. 6A e indican que, usando los inmunoconjugados de acuerdo con la invención, se puede observar una potente destrucción de las células tumorales a concentraciones picomolares.

Ejemplo 8:

Mediación de la muerte celular inducida por linfocitos T CD8 en células tumorales MDA-MB231 y A-375 tratadas con inmunoconjugados de acuerdo con la invención que comprenden anticuerpo anti-CDCP1 monoclonal y un péptido de VEB, que comprende de forma natural un residuo de cisteína no terminal, evaluada mediante el ensayo de liberación de LDH y xCELLigence

Se evaluó la activación de los linfocitos T específicos para péptidos de VEB y la destrucción de las células tumorales mediante un ensayo de liberación de LDH y mediante un ensayo xCELLigence y evaluación de la liberación de LDH usando células tumorales MDA-MB231 y A-375 tratadas con concentraciones diferentes del inmunoconjugado (IC) del ejemplo 6 (IC que comprende anti-CDCP1 y un péptido de VEB, que comprende de forma natural un residuo de cisteína no terminal) en presencia de linfocitos T CD8 específicos para péptidos obtenidos de acuerdo con el ejemplo 5A, sin embargo, usando, en cambio, el péptido de VEB GLCTLVAML para la estimulación, a una proporción de células efectoras con respecto a células diana de 3:1. Para los análisis comparativos, los experimentos se llevaron a cabo simultáneamente con péptido libre (pVEB) en dos concentraciones de péptidos diferentes.

El ensayo xCELLigence y la evaluación de la liberación de LDH se realizaron como se describe en el ejemplo 7.

Los resultados se muestran en la fig. 6B (para células A-375) y 6C (para células MDA-MB231) con los datos del ensayo xCELLigence medidos después de 13,5 horas.

Los resultados indican que solo el inmunoconjugado de acuerdo con la invención pudo mediar en la destrucción específica de las células tumorales sometidas a prueba por medio de los linfocitos T específicos para péptidos. Por el contrario, no se observó ninguna destrucción de las células tumorales específica usando la concentración equimolar del péptido de VEB libre.

Ejemplo 9:

Mediación de la muerte celular inducida por linfocitos T CD8 en células tumorales tratadas con inmunoconjugados de acuerdo con la invención que comprenden anticuerpo anti-CDCP1 monoclonal y péptidos de la GRIPE evaluada mediante el ensayo de liberación de LDH y xCELLigence

Se evaluó la destrucción de las células tumorales de inmunoconjugados de acuerdo con la invención usando inmunoconjugados que contenían péptidos de la GRIPE restringidos por HLA-A1 (CDCP1-SS-pGRIPE, como se obtiene en el ejemplo 3A) para el tratamiento de líneas de células tumorales diferentes (A-375, PC-3, HCT-116) en presencia de linfocitos T CD8 específicos para la GRIPE. Se evaluó la activación de los linfocitos T específicos para péptidos y la destrucción de las células tumorales mediante un ensayo de liberación de LDH y mediante un ensayo xCELLigence como se describe en el ejemplo 7.

Las líneas de células sometidas a prueba proporcionan las siguientes características con respecto al subtipo de HLA y la expresión y la expresión de la diana (CDCP-1):

Línea de células	Tipo de tumor	Subtipo de HLA-A	CDCP-1 (IFM)	HLA-A1, A11, A26 / A1, A36 (IFM)
PC-3	Próstata	HLA-A1	43488	24452 / 1336
HCT-116	Intestino	HLA-A1, A2	47678	24679 / 1747
A-375	Piel	HLA-A1, A2	1736	21758 / 710

Los resultados de los análisis por xCELLigence se muestran en la figura 7A-C. Los resultados del ensayo de liberación de LDH se muestran en la figura 7D-F.

Se observó la destrucción de las células tumorales eficaz tras el tratamiento de células tumorales con el inmunoconjugado para todas las líneas de células tumorales sometidas a prueba. Cuando se compara con el uso del péptido libre, el inmunoconjugado media en la activación de los linfocitos T más eficientemente que el péptido libre a una concentración 100 veces más alta.

Se puede observar la destrucción de las células tumorales mediada por el inmunoconjugado tan solo 6 horas después del tratamiento con el inmunoconjugado, lo que indica que el péptido no requiere su transporte a la maquinaria de procesamiento de antígenos en el citosol para su presentación por medio del CPH de clase I. Además, se observó un incremento de la destrucción de las células tumorales a lo largo del tiempo, mientras que, por el contrario, la destrucción de las células tumorales mediada por el péptido libre disminuyó normalmente en los tiempos de incubación más altos. Se observaron efectos similares en líneas de células tumorales diferentes, lo que indica que el efecto es independiente del nivel de expresión del CPH de clase I en la célula diana. Los resultados de los análisis por xCELLigence se confirmaron mediante los resultados del ensayo de liberación de LDH.

Ejemplo 10: Prueba de concepto I *in vivo*

Actividad antitumoral de inmunoconjugados de acuerdo con la invención que comprenden anticuerpo anti-CDCP1 monoclonal y péptido de VEB en el modelo s.c. de MDA-MB231 con transferencia i.v. de huPBMC (que comprenden linfocitos T CD8 específicos para VEB)

Se xenoinjertaron ratones NOG con células tumorales humanas ($5x10^6$ Mio MDA-MB231) por medio de inyección subcutánea el día 0. Se aplicó dos veces estimulación con PBMC humana (~10 % de linfocitos T CD8 específicos para péptido CLG de VEB) el día 0 y el día 20 por medio de transferencia i.v. $10x10^6$ (véase el detalle en la figura 8A). La pauta de tratamiento de anticuerpos/inmunoconjugados fue como sigue:

<CDCP1>-IgG4-SS-péptido CLG (generación como se describe en el ejemplo 3, con una cadena constante de IgG4):

5 mg/kg (el día: 0, 3, 6, 9, 13, 16, 20, 23, 27, 30)

Control AB: <CDCP1>-IgG4 (cadena constante de IgG4):

5 mg/kg (el día: 0, 3, 6, 9, 13, 16, 20, 23, 27, 30)

El esquema de pruebas y los resultados se muestran en la figura 8A y B. Los resultados demuestran la eficacia *in vivo* de los inmunoconjugados de acuerdo con la invención que comprenden anticuerpo anti-CDCP1 monoclonal en el modelo de xenoinjerto s.c. de MDA-MB231 con transferencia adoptiva de huPBMC específicas para CLG.

Ejemplo 11: Prueba de concepto II *in vivo*

Actividad antitumoral de inmunoconjugados de acuerdo con la invención que comprenden anticuerpo anti-CDCP1 monoclonal y péptido de VEB en combinación con tratamiento anti-PD1 en el modelo s.c. de MDA-MB231 establecido con transferencia i.v. de huPBMC (que comprenden linfocitos T CD8 específicos para VEB)

Se xenoinjertaron ratones NOG con células tumorales humanas ($5x10^6$ Mio MDA-MB231) por medio de inyección subcutánea el día 0. Se aplicó dos veces estimulación con PBMC humana (~10 % de linfocitos T CD8 específicos para péptido CLG de VEB) el día 20 y el día 32 por medio de transferencia i.v. $10x10^6$ (véase el detalle en la figura 8A). La pauta de tratamiento del grupo de prueba con el conjugado de prueba <CDCP1>-IgG1-PGLala-SS-péptido CLG (generación como se describe en el ejemplo 3, con una cadena constante de IgG1 con las mutaciones L234A, L235A y P329G (índice EU de Kabat) en la parte Fc) y del grupo de control con el anticuerpo de control <CDCP1>-IgG1 PGLALA más la adición del anticuerpo anti-PD1 para ambos grupos fue como sigue:

	1.º	***2.º***	***3.º***	***4.º***	***5.º***	***6.º***	***7.º***	***8.º***	***9.º***
Tratamiento 1 (<CDCP1>-IgG1 PG LALA-SS-péptido CLG o anticuerpo de control <CDCP1>-IgG1 PG LALA, mg/kg)	***2,5***	***2,5***	***5***	***5***	***10***	***10***	***15***	***15***	***20***
Tratamiento 2 (PD1, mg/kg)		***5***			***5***			***5***	

El esquema de pruebas y los resultados se muestran en la figura 9A y B. Los resultados demuestran el efecto de combinación de los inmunoconjugados de acuerdo con la invención que comprenden el tratamiento con anticuerpo anti-CDCP1 monoclonal más anti-PD-1 en el modelo de xenoinjerto de MDA-MB231 con huPBMC específicas para CLG de VEB transferidas de forma adoptiva. Se mostró un fuerte incremento de los linfocitos T específicos para CLG en tumores después del tratamiento con ATPP en combinación con anticuerpo anti-PD-1.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> INMUNOCONJUGADOS PARA LA INDUCCIÓN ESPECÍFICA DE LA CITOTOXICIDAD DE LOS LINFOCITOS T FRENTE A UNA CÉLULA DIANA

<130> P32622-WO

<150> EP15155598
<151> 18-02-2015

<150> EP15199306
<151> 10-12-2015

<160> 10

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus del herpes humano 5

<220>
<221> misc_feature
<223> Péptido pp65 495-503 del virus del herpes humano 5 (CMV)

<400> 1

Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val
1 5

<210> 2
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus de Epstein-Barr

<220>
<221> misc_feature
<223> Péptido LMP-2 426-434 del virus de Epstein-Barr (VEB)

<400> 2

Cys Leu Gly Gly Leu Leu Thr Met Val
1 5

<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus de la gripe A

<220>
<221> misc_feature
<223> Péptido de NP 44-52 de la gripe A (GRIPE)

<400> 3

Cys Thr Glu Leu Lys Leu Ser Asp Tyr
1 5

<210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus de Epstein-Barr

<220>
<221> misc_feature
<223> Péptido BLMF-1 280-288 del virus de Epstein-Barr (VEB)

<400> 4

Gly Leu Cys Thr Leu Val Ala Met Leu
1 5

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus del herpes humano 5

<220>
<221> misc_feature
<223> Péptido 309-317 del virus del herpes humano 5 (CMV)

<400> 5

Cys Arg Val Leu Cys Cys Tyr Val Leu
1 5

<210> 6
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido pp65 495-503 del virus del herpes humano 5 (CMV) modificado (péptido de cCMV)

<400> 6

Cys Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val
1 5 10

<210> 7
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido pp65 495-503 del virus del herpes humano 5 (CMV) modificado (péptido de CMVc)

<400> 7

Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val Cys
1 5 10

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

<220>
<223> Péptido pp65 495-503 del virus del herpes humano 5 (CMV) modificado (péptido de rcCMV)

<400> 8

Cys Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val
1 5

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

<220>
<223> Péptido pp65 495-503 del virus del herpes humano 5 (CMV) modificado (péptido de CMVrc)

<400> 9

Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Cys
1 5

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

<220>
<223> Péptido pp65 495-503 del virus del herpes humano 5 (CMV) modificado (péptido de CMVpen)

<220>
<221> misc_feature
<223> Xaa es penicilamina

<220>
<221> misc_feature
<222> (9) . . (9)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 10

Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Xaa
1 5

REIVINDICACIONES

1. Un inmunoconjugado que comprende al menos un péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T natural que es presentable por medio del CPH de clase I acoplado a un anticuerpo de unión a célula diana por medio de un enlace escindible, en el que el enlace escindible se dispone de tal manera que tras la escisión dicho péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T, que es directamente presentable por medio de una molécula de CPH de clase I, se libera del inmunoconjugado, caracterizado por que el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T natural comprende al menos un residuo de cisteína y por que el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T no modificado se acopla covalentemente al anticuerpo de unión a célula diana por medio de un enlace disulfuro.

2. El inmunoconjugado de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la célula diana es una célula tumoral.

3. El inmunoconjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que se puede internalizar en la célula diana.

4. El inmunoconjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el inmunoconjugado no comprende un dominio de translocación.

5. El inmunoconjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que en menos de 12 horas después de la internalización del inmunoconjugado en la célula diana, el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T se presenta en la superficie de la célula diana por medio de una molécula de CPH de clase I.

6. Una composición farmacéutica que comprende un inmunoconjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

7. Uso de un péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T que es presentable por medio del CPH de clase I para la generación de un inmunoconjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

8. Un procedimiento para la generación de un inmunoconjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende las etapas de

a) proporcionar el anticuerpo de unión a célula diana recombinante,

b) proporcionar el péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T,

c) acoplar al menos uno de dichos péptidos que provocan la respuesta de los linfocitos T a dicho anticuerpo de unión a célula diana por medio del enlace escindible.

9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que un péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T no modificado se acopla al anticuerpo de unión a célula diana.

10. El inmunoconjugado de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso como un medicamento.

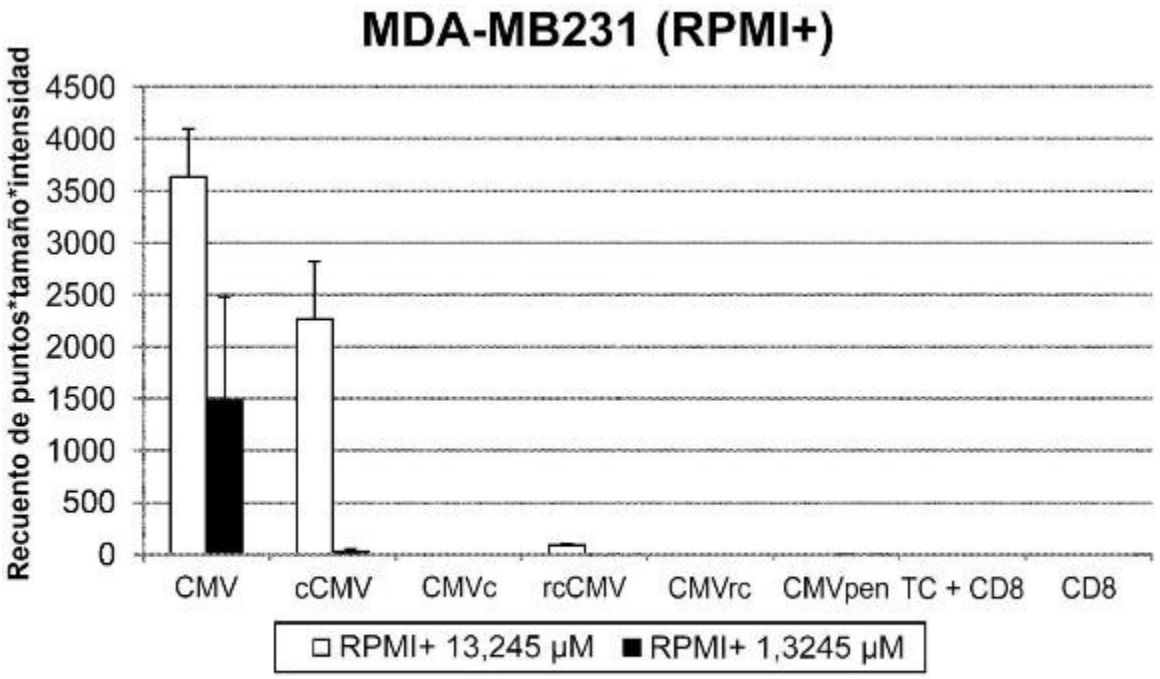

MDA-MB231 (RPMI+)
Recuento de puntos*tamaño*intensidad
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
CMV
cCMV
CMVc
rcCMV
CMVrc
CMVpen
TC + CD8
CD8
RPMI+ 13,245 µM
RPMI+ 1,3245 µM

Fig. 1A

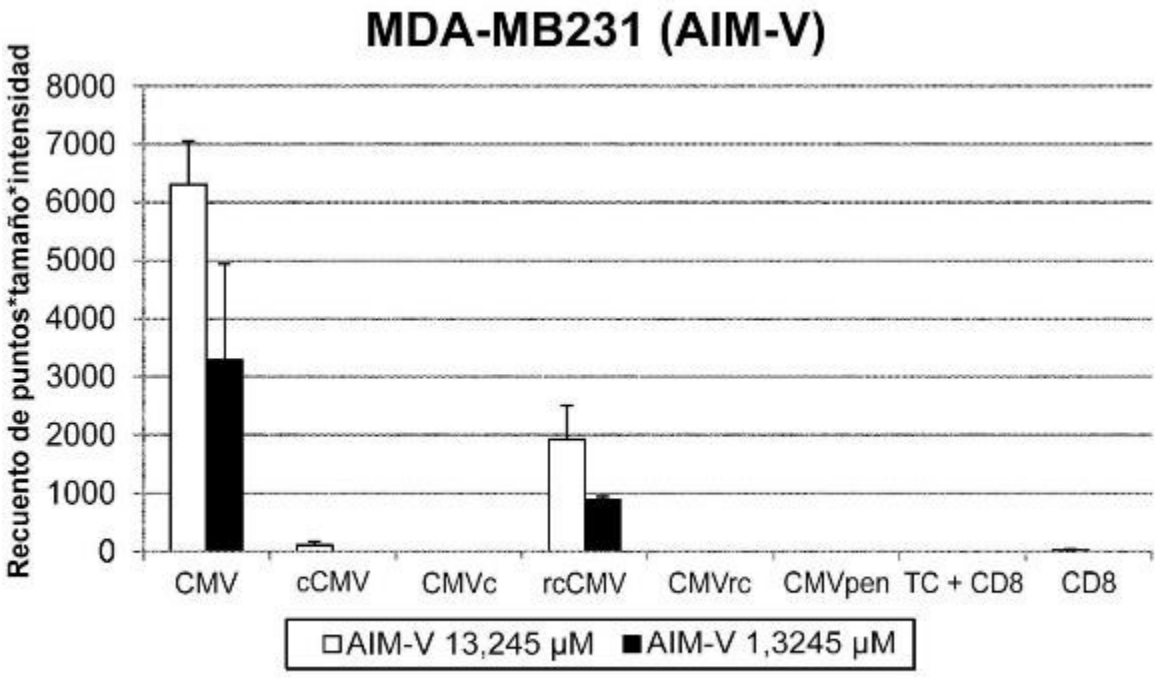

MDA-MB231 (AIM-V)
Recuento de puntos*tamaño*intensidad
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
CMV
cCMV
CMVc
rcCMV
CMVrc
CMVpen
TC + CD8
CD8
AIM-V 13,245 µM
AIM-V 1,3245 µM

Fig. 1B

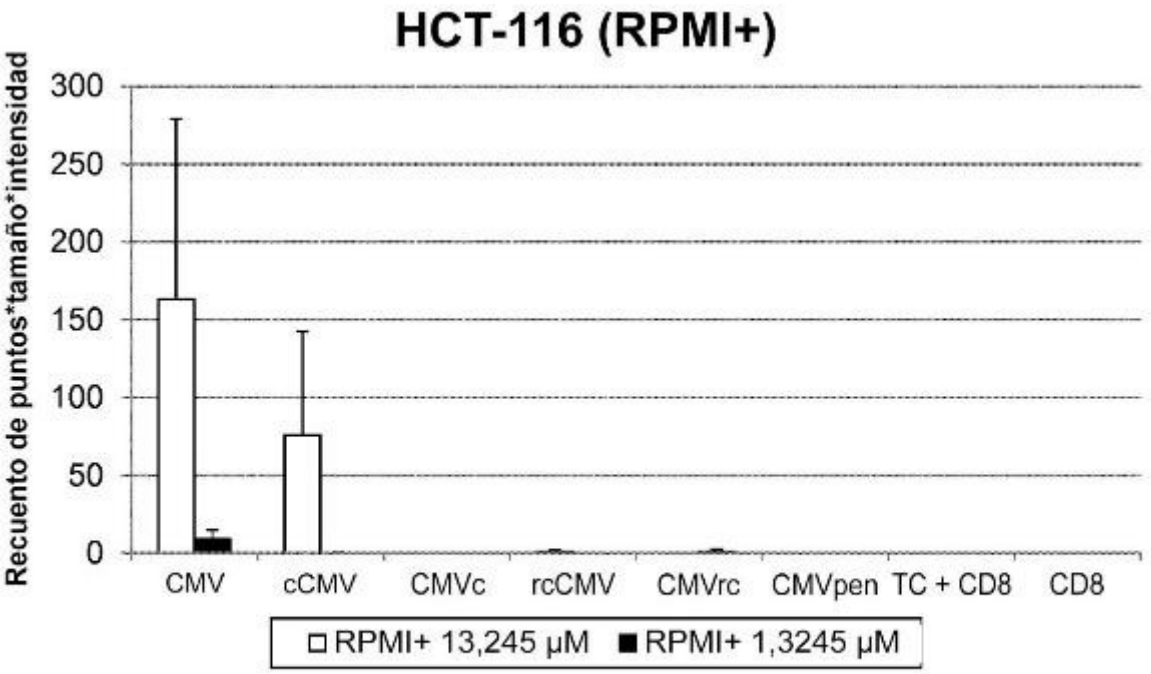

HCT-116 (RPMI+)
Recuento de puntos*tamaño*intensidad
300
250
200
150
100
50
0
CMV
cCMV
CMVc
rcCMV
CMVrc
CMVpen
TC + CD8
CD8
RPMI+ 13,245 µM
RPMI+ 1,3245 µM

Fig. 1C

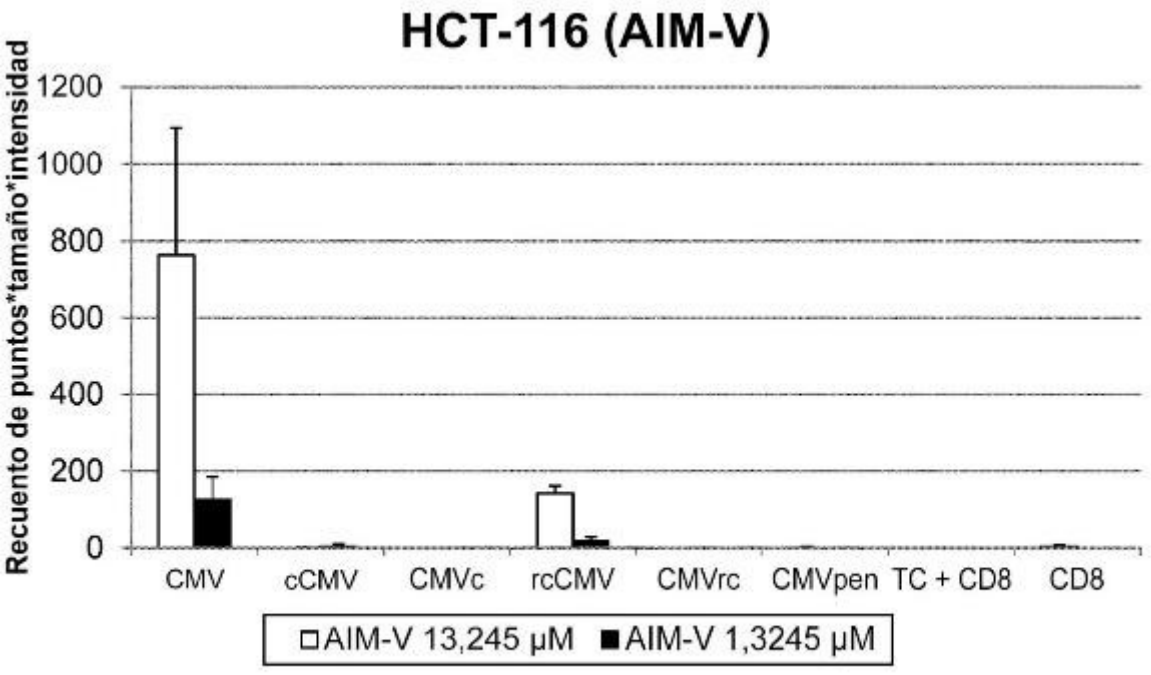

HCT-116 (AIM-V)
Recuento de puntos*tamaño*intensidad
1200
1000
800
600
400
200
0
CMV
cCMV
CMVc
rcCMV
CMVrc
CMVpen
TC + CD8
CD8
AIM-V 13,245 µM
AIM-V 1,3245 µM

Fig. 1D

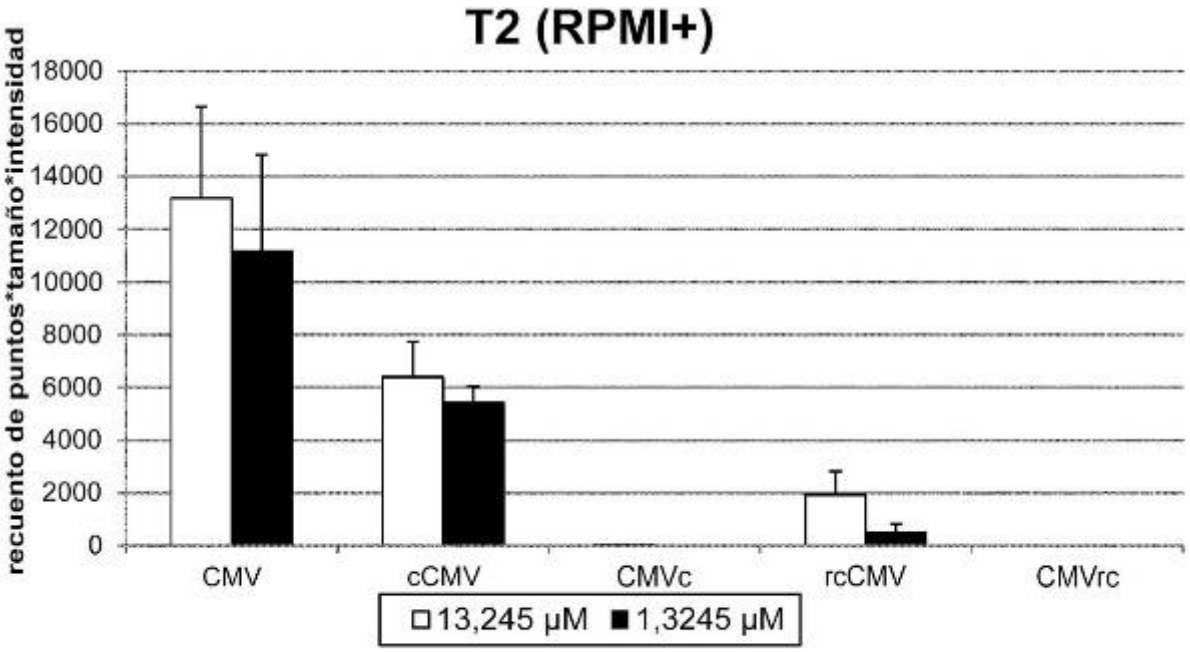

T2 (RPMI+)
recuento de puntos*tamaño*intensidad
18000
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
CMV
cCMV
CMVc
rcCMV
CMVrc
13,245 µM
1,3245 µM

Fig. 1E

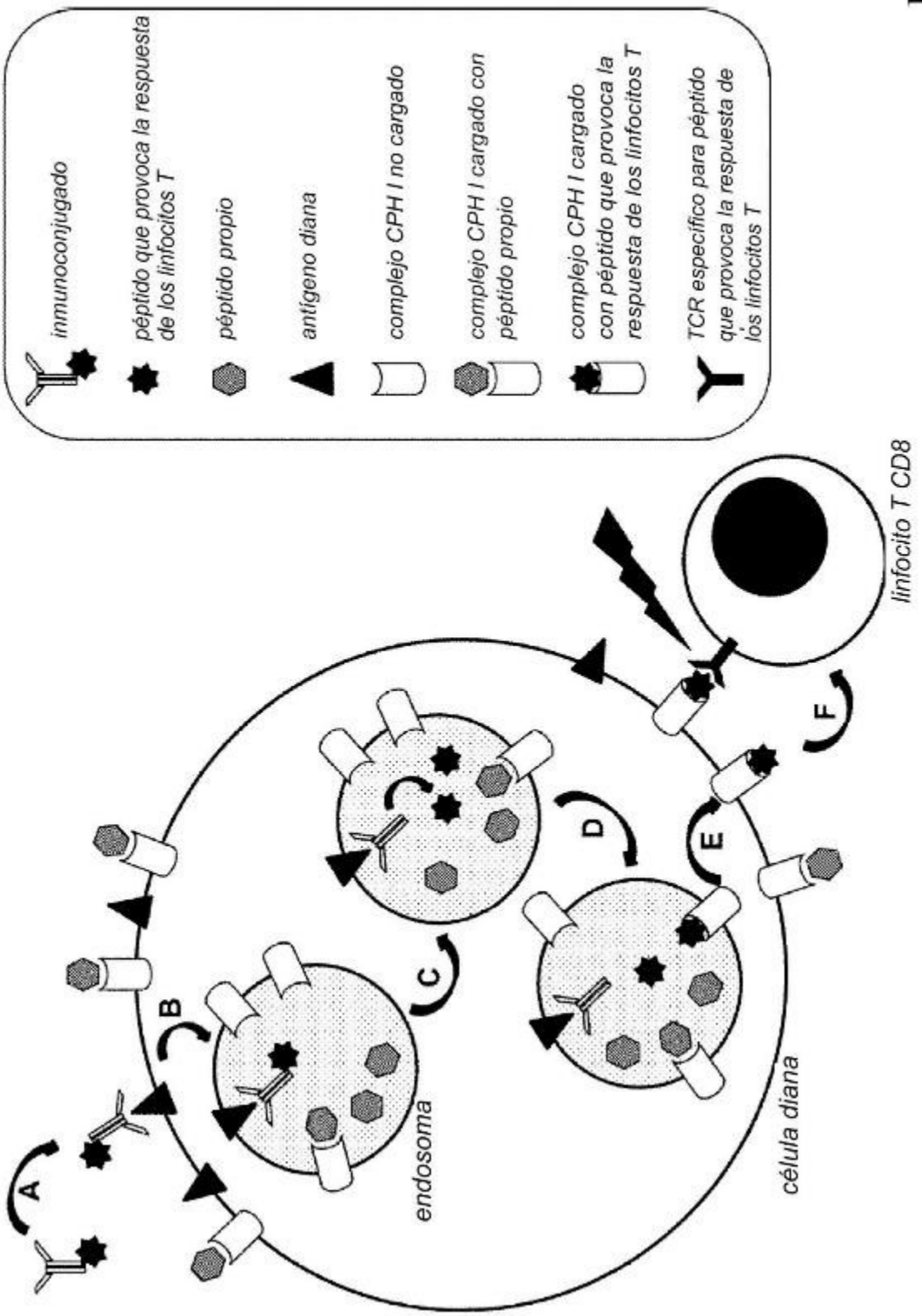

inmunoconjugado
péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T
péptido propio
antígeno diana
complejo CPH I no cargado
complejo CPH I cargado con péptido propio
complejo CPH I cargado con péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T
TCR específico para péptido que provoca la respuesta de los linfocitos T
A
B
C
D
E
F
endosoma
célula diana
linfocito T CD8

Fig. 2

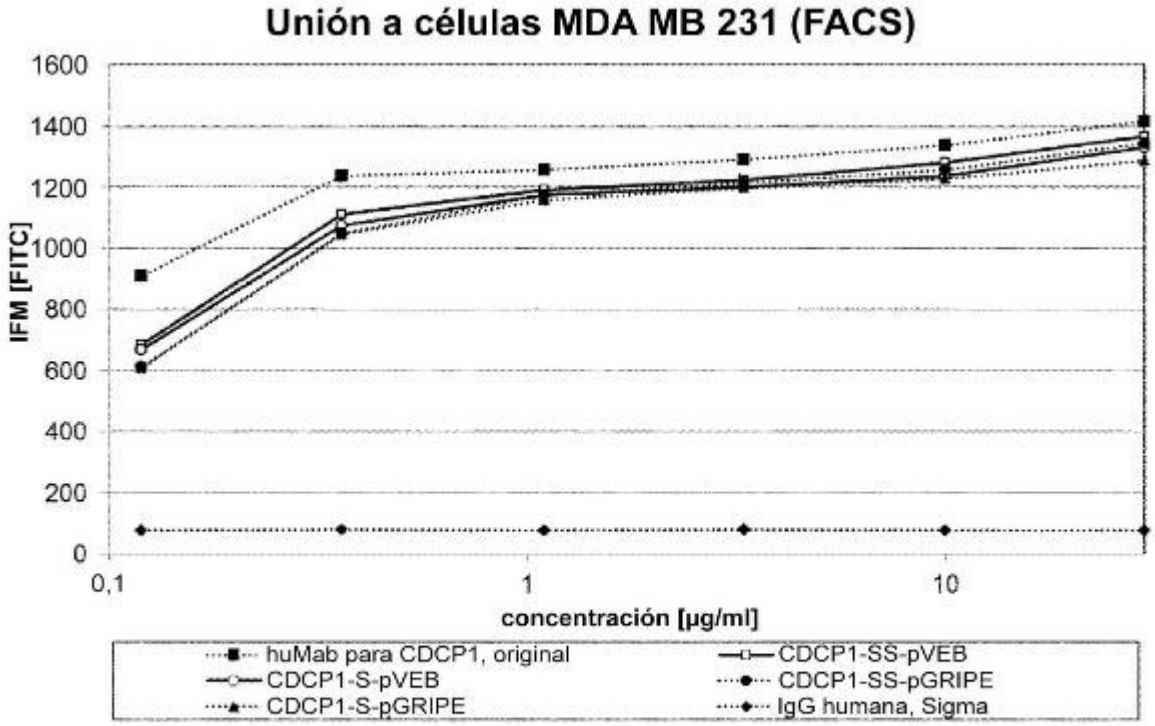

Unión a células MDA MB 231 (FACS)
IFM [FITC]
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0,1
1
10
concentración [µg/ml]
huMab para CDCP1, original
CDCP1-S-pVEB
CDCP1-S-pGRIPE
CDCP1-SS-pVEB
CDCP1-SS-pGRIPE
IgG humana, Sigma

Fig. 3

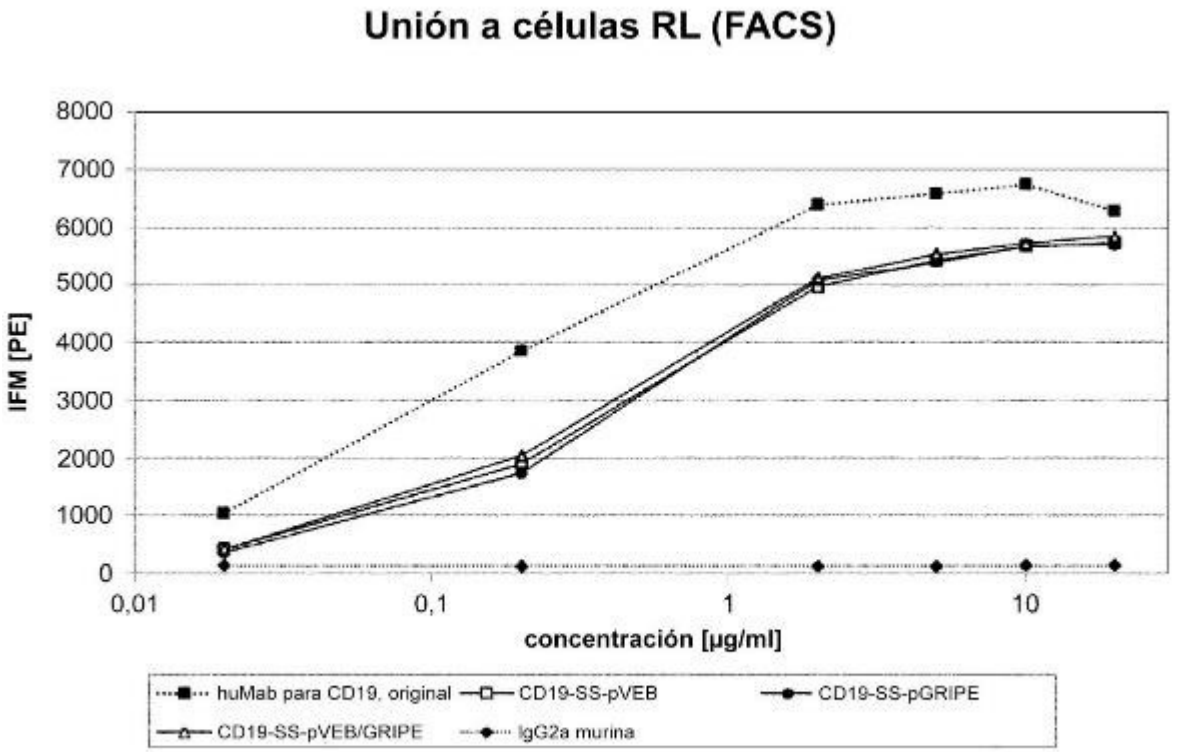

Unión a células RL (FACS)
IFM [PE]
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
0,01
0,1
1
10
concentración [µg/ml]
huMab para CD19, original
CD19-SS-pVEB
CD19-SS-pGRIPE
CD19-SS-pVEB/GRIPE
IgG2a murina

Fig. 4

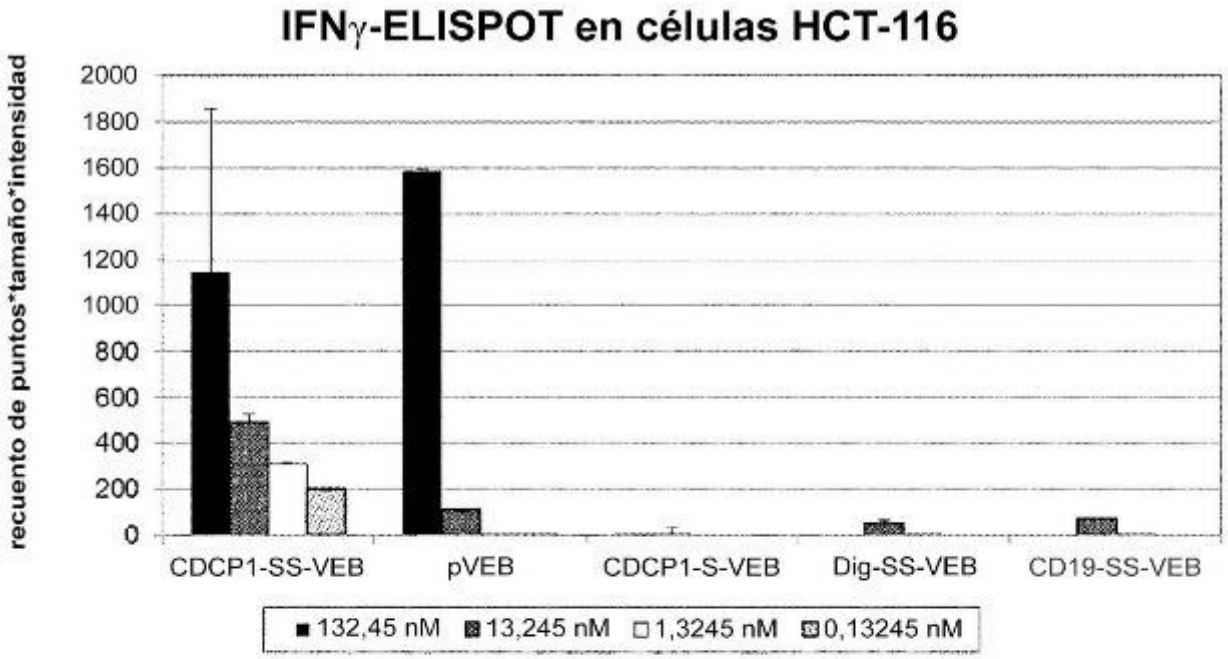

IFNγ-ELISPOT en células HCT-116
recuento de puntos*tamaño*intensidad
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
CDCP1-SS-VEB
pVEB
CDCP1-S-VEB
Dig-SS-VEB
CD19-SS-VEB
132,45 nM
13,245 nM
1,3245 nM
0,13245 nM

Fig. 5A

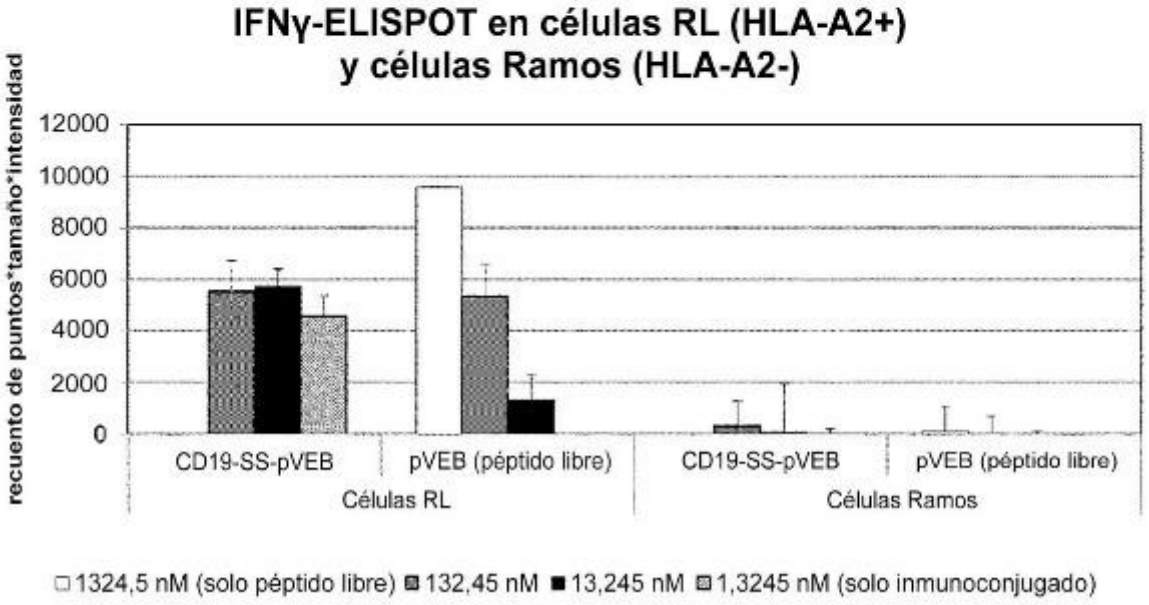

IFNγ-ELISPOT en células RL (HLA-A2+)
y células Ramos (HLA-A2-)
recuento de puntos*tamaño*intensidad
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
CD19-SS-pVEB
pVEB (péptido libre)
CD19-SS-pVEB
pVEB (péptido libre)
Células RL
Células Ramos
1324,5 nM (solo péptido libre)
132,45 nM
13,245 nM
1,3245 nM (solo inmunoconjugado)

Fig. 5B

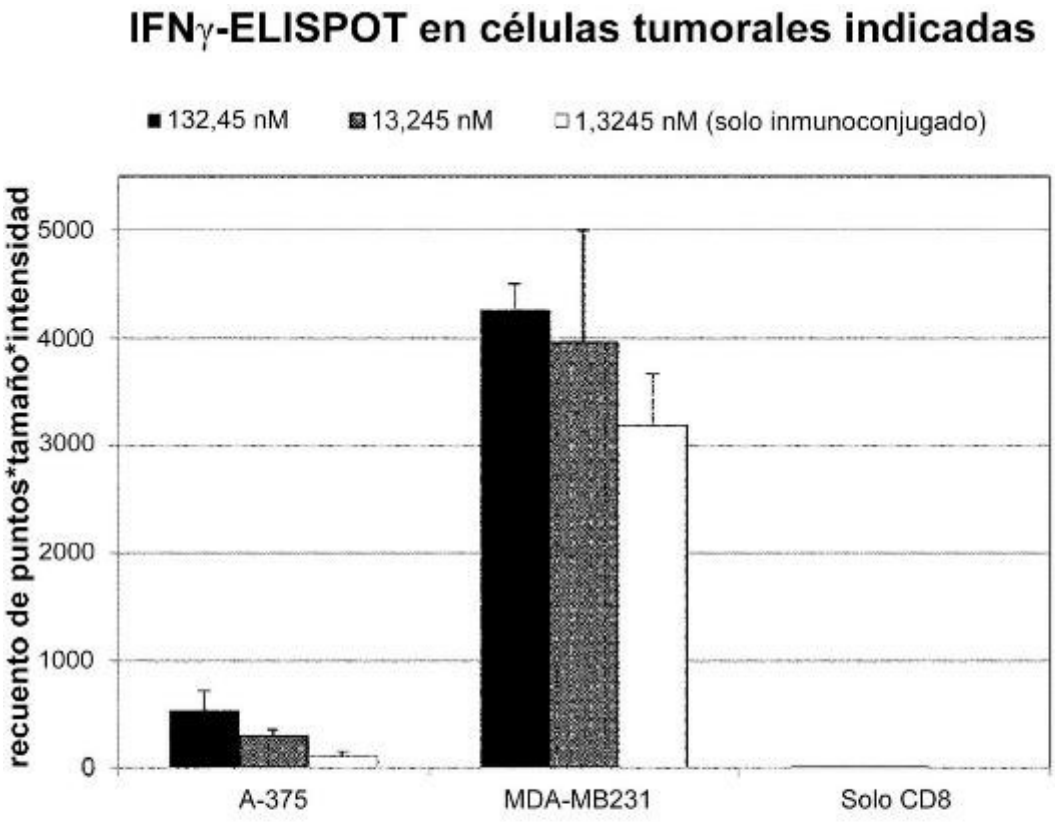

IFNγ-ELISPOT en células tumorales indicadas
132,45 nM
13,245 nM
1,3245 nM (solo inmunoconjugado)
recuento de puntos*tamaño*intensidad
5000
4000
3000
2000
1000
0
A-375
MDA-MB231
Solo CD8

Fig. 5C

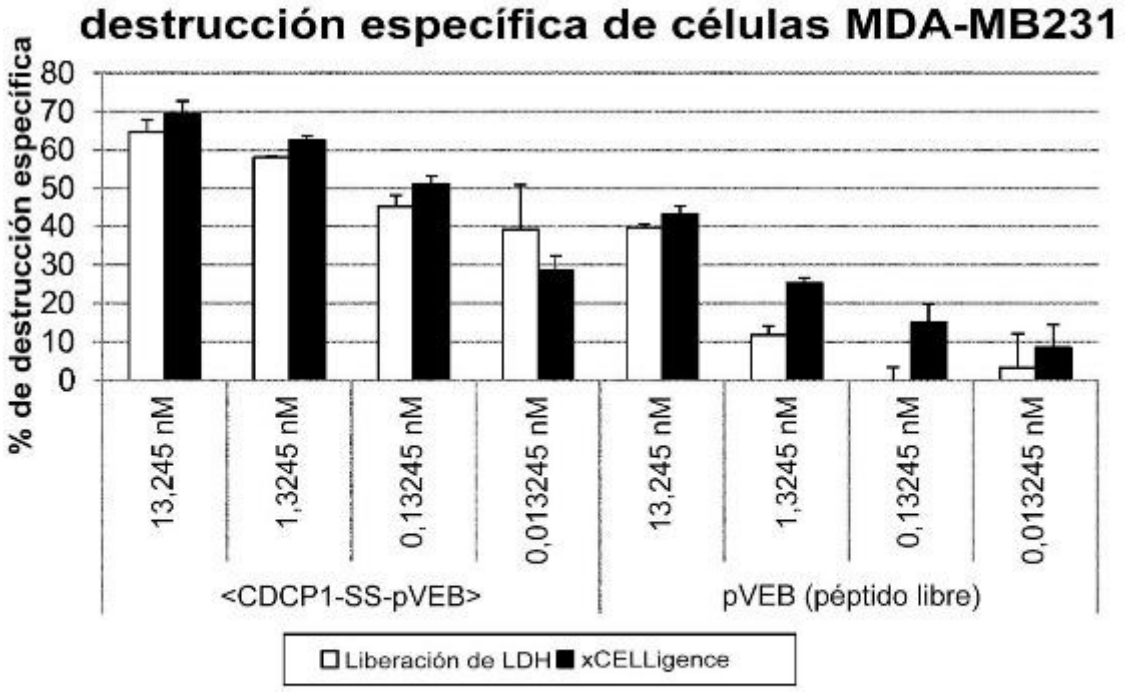
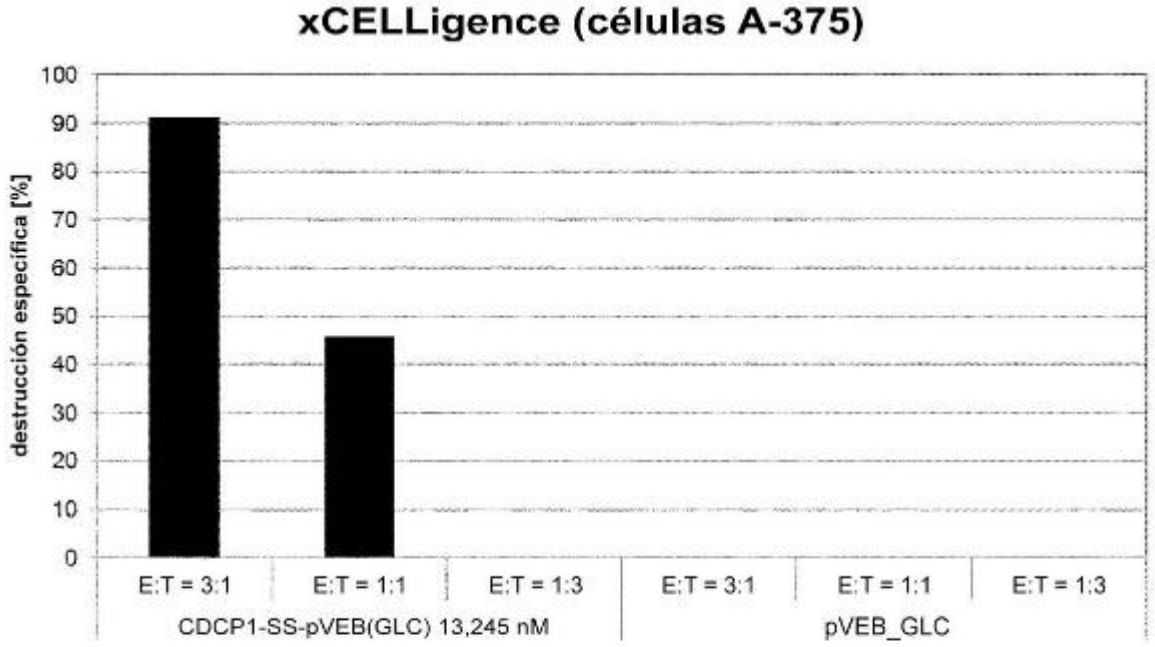

destrucción específica de células MDA-MB231
% de destrucción específica
80
70
60
50
40
30
20
10
0
13,245 nM
1,3245 nM
0,13245 nM
0,013245 nM
13,245 nM
1,3245 nM
0,13245 nM
0,013245 nM
<CDCP1-SS-pVEB>
pVEB (péptido libre)
Liberación de LDH
xCELLigence

Fig. 6A


xCELLigence (células A-375)
destrucción especifica [%]
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
E:T = 3:1
E:T = 1:1
E:T = 1:3
E:T = 3:1
E:T = 1:1
E:T = 1:3
CDCP1-SS-pVEB(GLC) 13,245 nM
pVEB_GLC

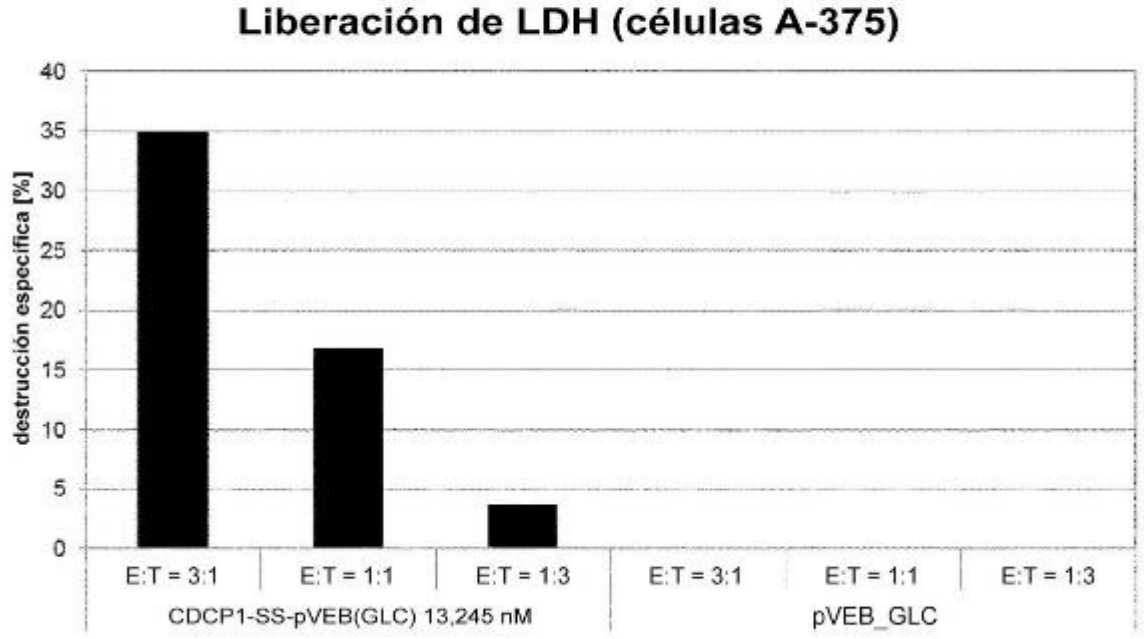

Liberación de LDH (células A-375)
destrucción especifica [%]
40
35
30
25
20
15
10
5
0
E:T = 3:1
E:T = 1:1
E:T = 1:3
E:T = 3:1
E:T = 1:1
E:T = 1:3
CDCP1-SS-pVEB(GLC) 13,245 nM
pVEB_GLC

Fig. 6B

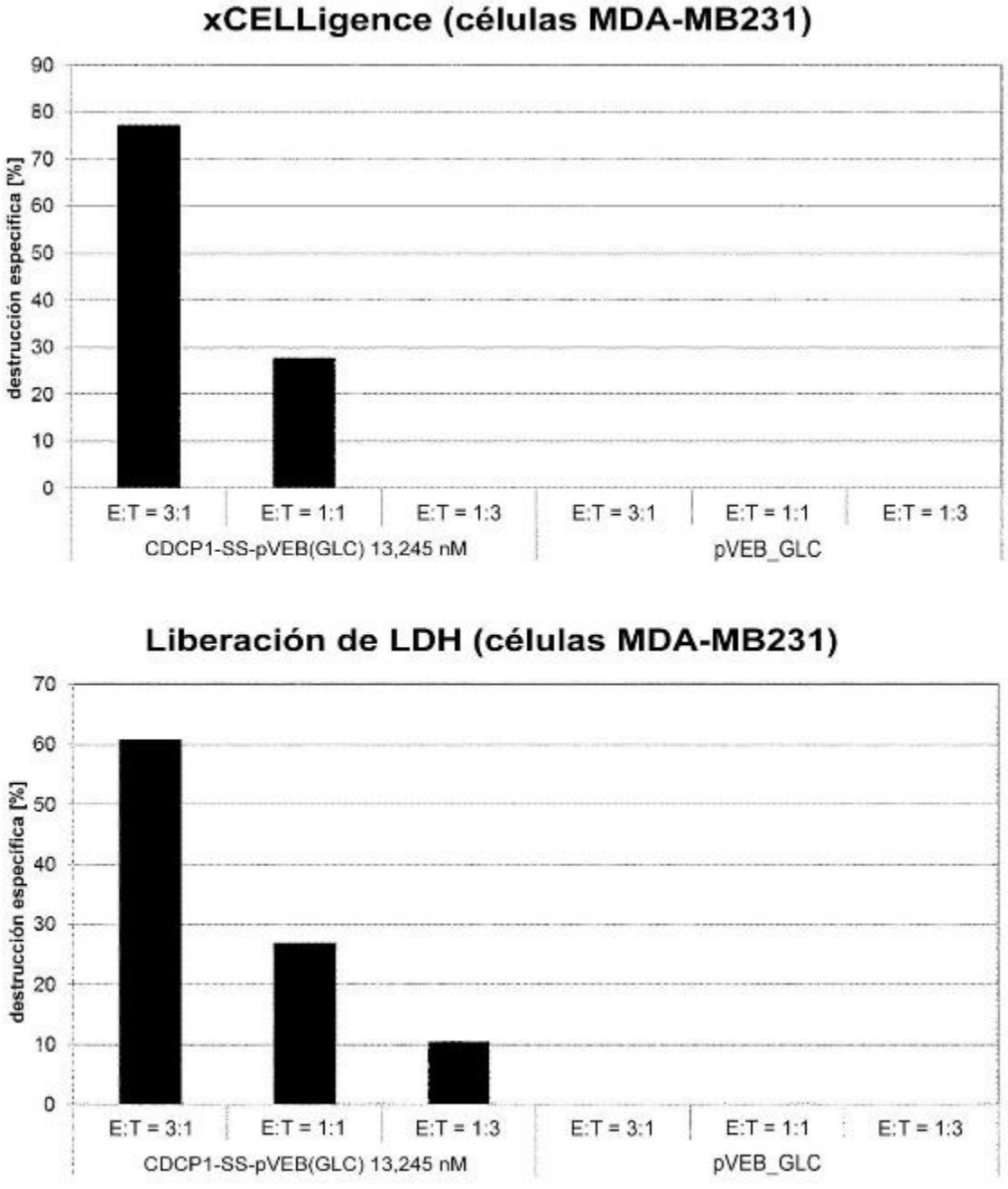

xCELLigence (células MDA-MB231)
destrucción específica [%]
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
E:T = 3:1
E:T = 1:1
E:T = 1:3
E:T = 3:1
E:T = 1:1
E:T = 1:3
CDCP1-SS-pVEB(GLC) 13,245 nM
pVEB_GLC
Liberación de LDH (células MDA-MB231)
destrucción específica [%]
70
60
50
40
30
20
10
0
E:T = 3:1
E:T = 1:1
E:T = 1:3
E:T = 3:1
E:T = 1:1
E:T = 1:3
CDCP1-SS-pVEB(GLC) 13,245 nM
pVEB_GLC

Fig. 6C

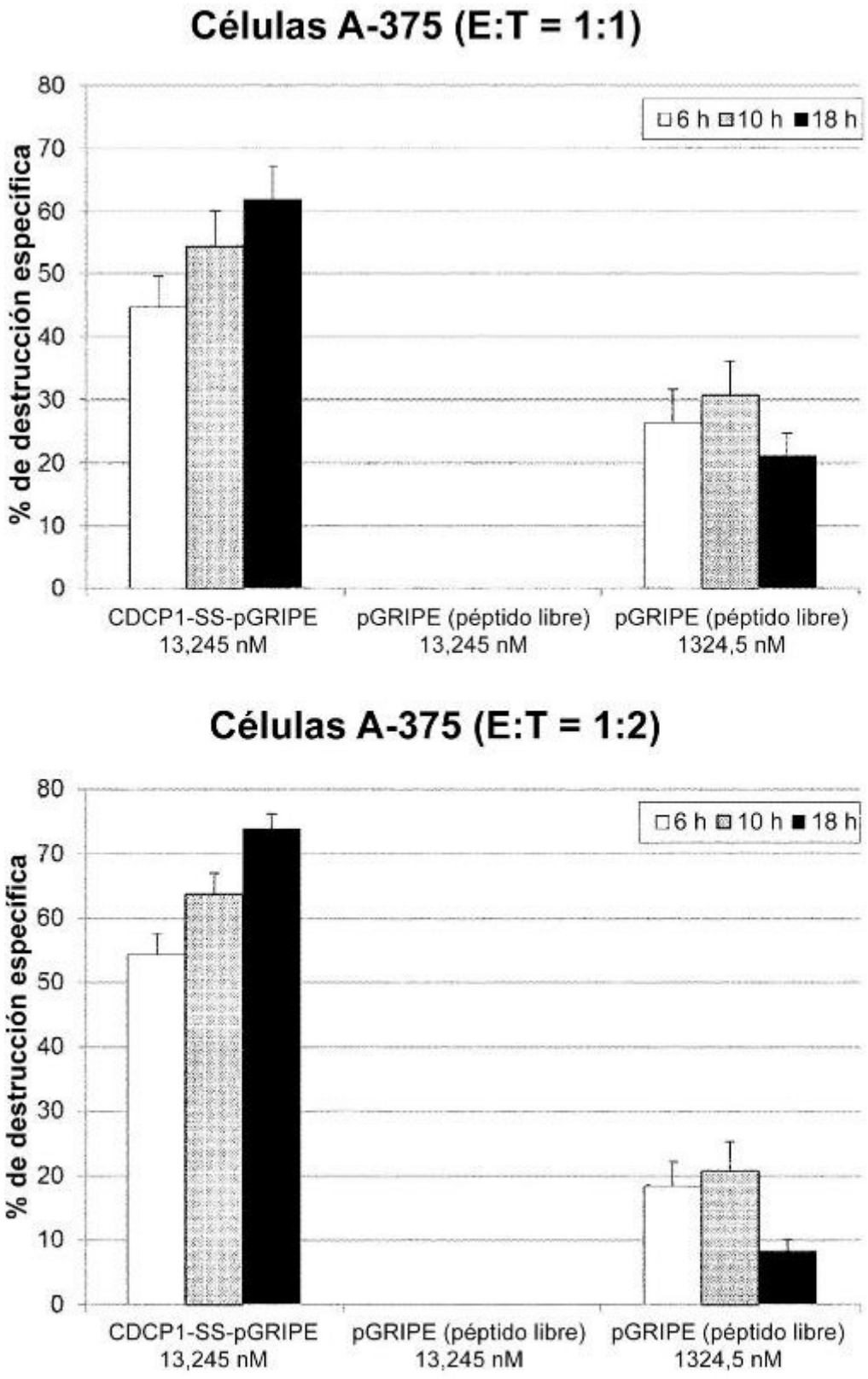

Células A-375 (E:T = 1:1)
% de destrucción específica
0
10
20
30
40
50
60
70
80
6 h
10 h
18 h
CDCP1-SS-pGRIPE 13,245 nM
pGRIPE (péptido libre) 13,245 nM
pGRIPE (péptido libre) 1324,5 nM
Células A-375 (E:T = 1:2)
% de destrucción específica
0
10
20
30
40
50
60
70
80
6 h
10 h
18 h
CDCP1-SS-pGRIPE 13,245 nM
pGRIPE (péptido libre) 13,245 nM
pGRIPE (péptido libre) 1324,5 nM

Fig. 7A

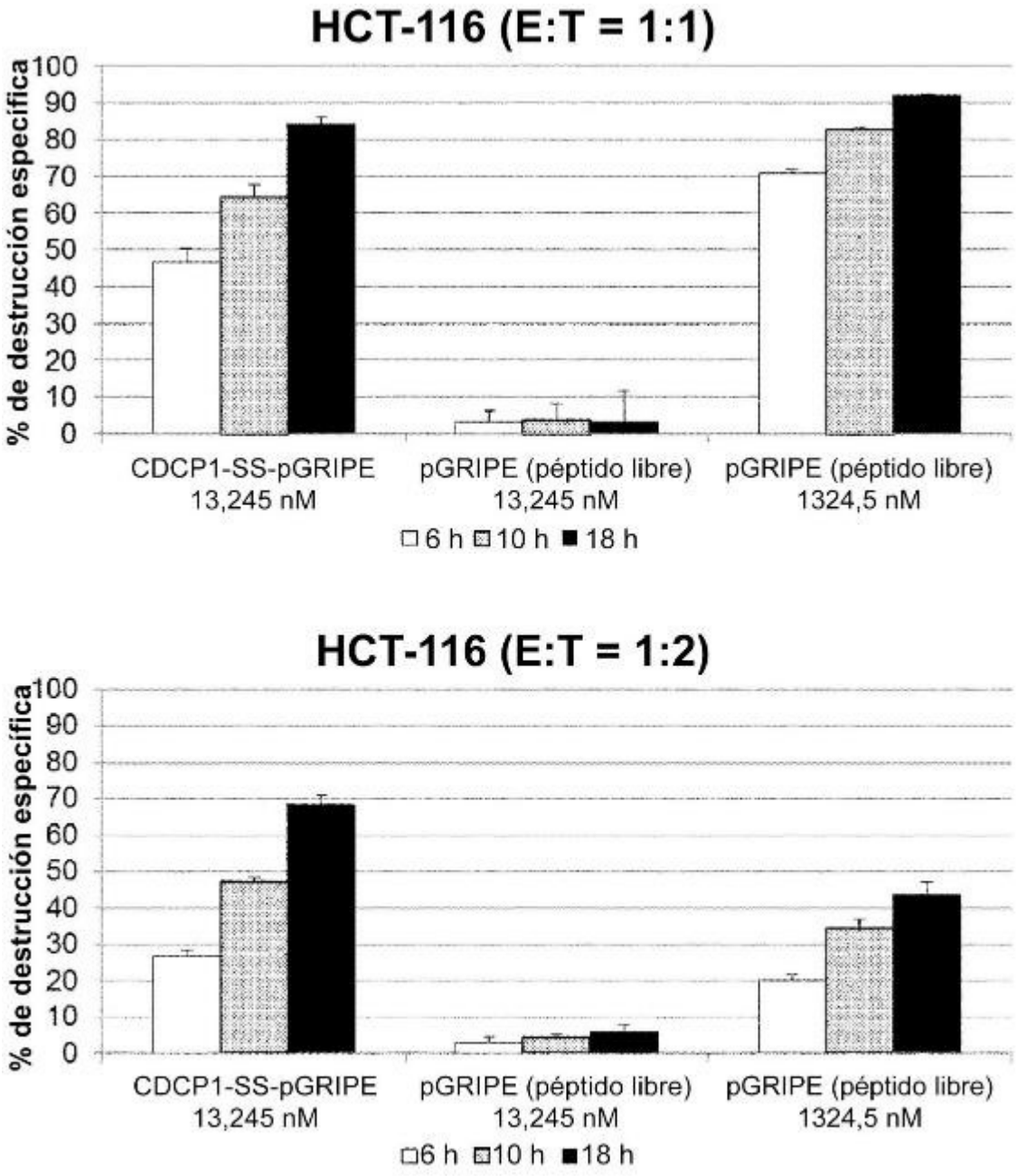

HCT-116 (E:T = 1:1)
% de destrucción específica
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
CDCP1-SS-pGRIPE 13,245 nM
pGRIPE (péptido libre) 13,245 nM
pGRIPE (péptido libre) 1324,5 nM
6 h 10 h 18 h
HCT-116 (E:T = 1:2)
% de destrucción específica
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
CDCP1-SS-pGRIPE 13,245 nM
pGRIPE (péptido libre) 13,245 nM
pGRIPE (péptido libre) 1324,5 nM
6 h 10 h 18 h

Fig. 7B

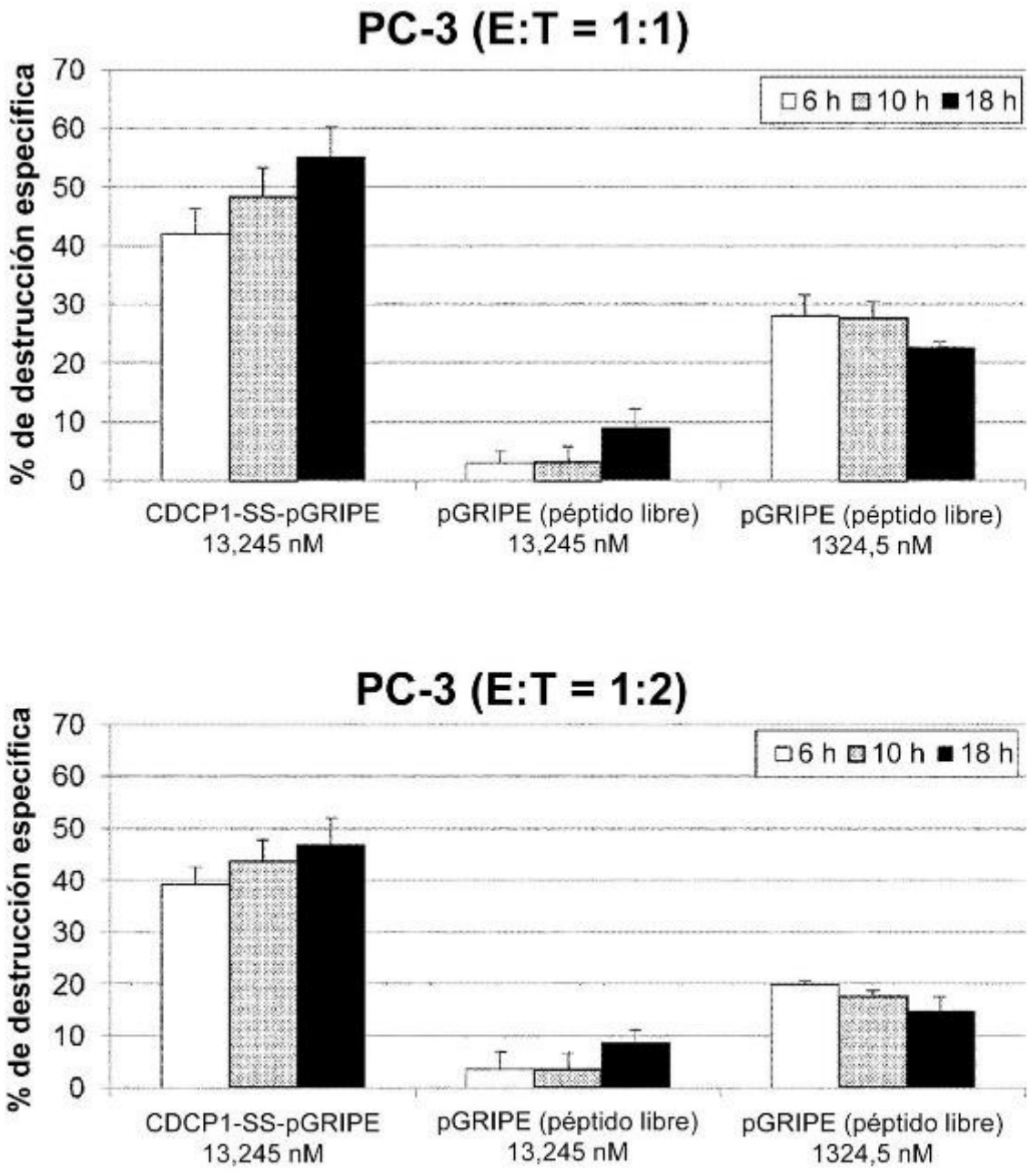
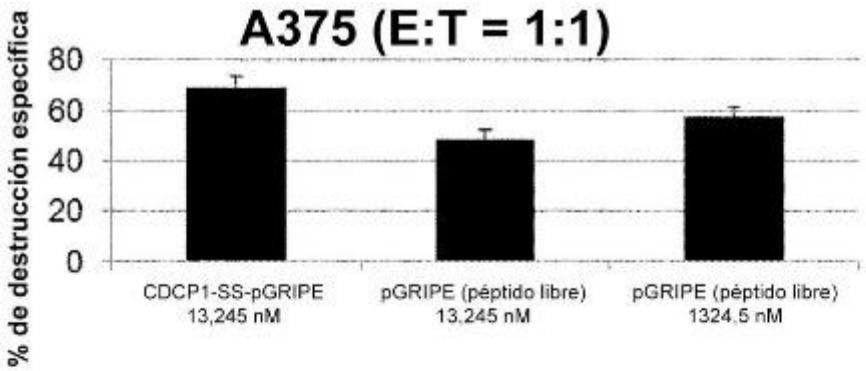

PC-3 (E:T = 1:1)
% de destrucción específica
70
60
50
40
30
20
10
0
6 h
10 h
18 h
CDCP1-SS-pGRIPE
13,245 nM
pGRIPE (péptido libre)
13,245 nM
pGRIPE (péptido libre)
1324,5 nM
PC-3 (E:T = 1:2)
% de destrucción específica
70
60
50
40
30
20
10
0
6 h
10 h
18 h
CDCP1-SS-pGRIPE
13,245 nM
pGRIPE (péptido libre)
13,245 nM
pGRIPE (péptido libre)
1324,5 nM

Fig. 7C


A375 (E:T = 1:1)
% de destrucción específica
80
60
40
20
0
CDCP1-SS-pGRIPE
13,245 nM
pGRIPE (péptido libre)
13,245 nM
pGRIPE (péptido libre)
1324,5 nM

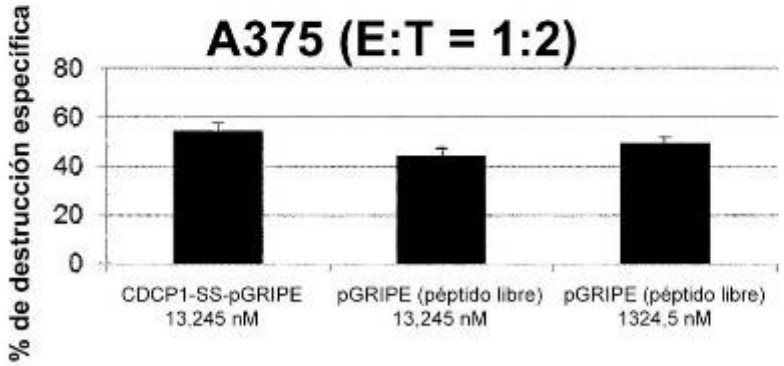
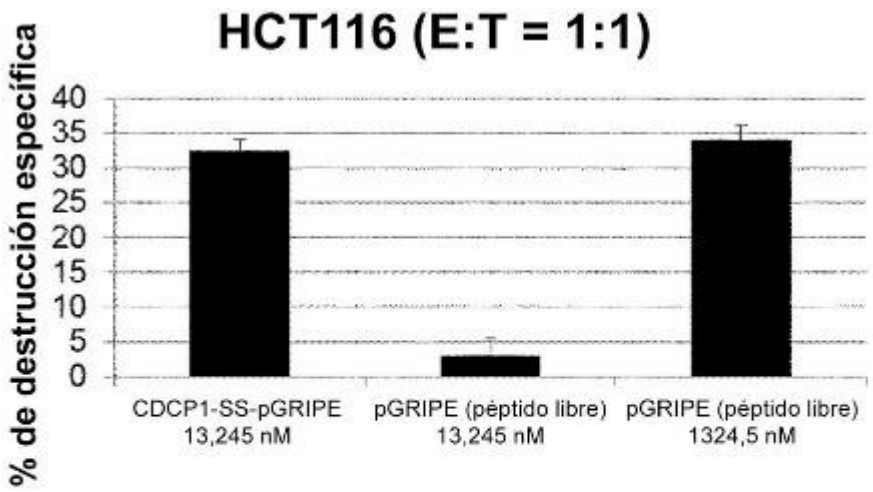

A375 (E:T = 1:2)
% de destrucción específica
80
60
40
20
0
CDCP1-SS-pGRIPE
13,245 nM
pGRIPE (péptido libre)
13,245 nM
pGRIPE (péptido libre)
1324,5 nM

Fig. 7D


HCT116 (E:T = 1:1)
% de destrucción específica
40
35
30
25
20
15
10
5
0
CDCP1-SS-pGRIPE 13,245 nM
pGRIPE (péptido libre) 13,245 nM
pGRIPE (péptido libre) 1324,5 nM

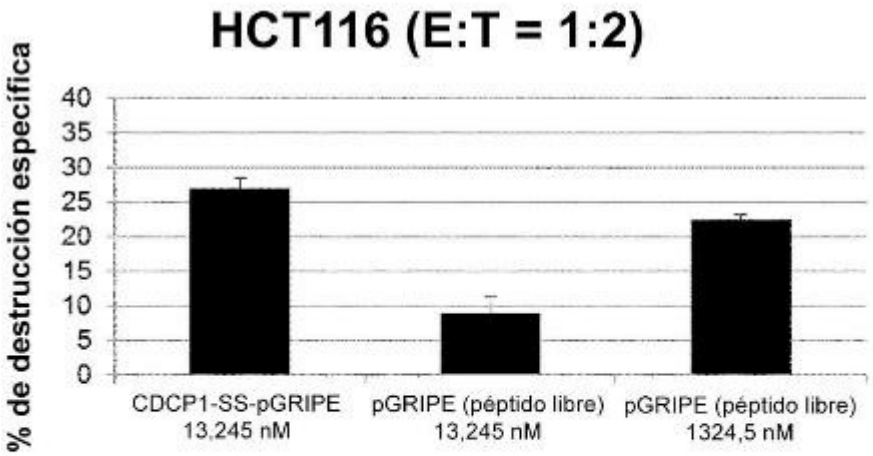

HCT116 (E:T = 1:2)
% de destrucción específica
40
35
30
25
20
15
10
5
0
CDCP1-SS-pGRIPE 13,245 nM
pGRIPE (péptido libre) 13,245 nM
pGRIPE (péptido libre) 1324,5 nM

Fig. 7E

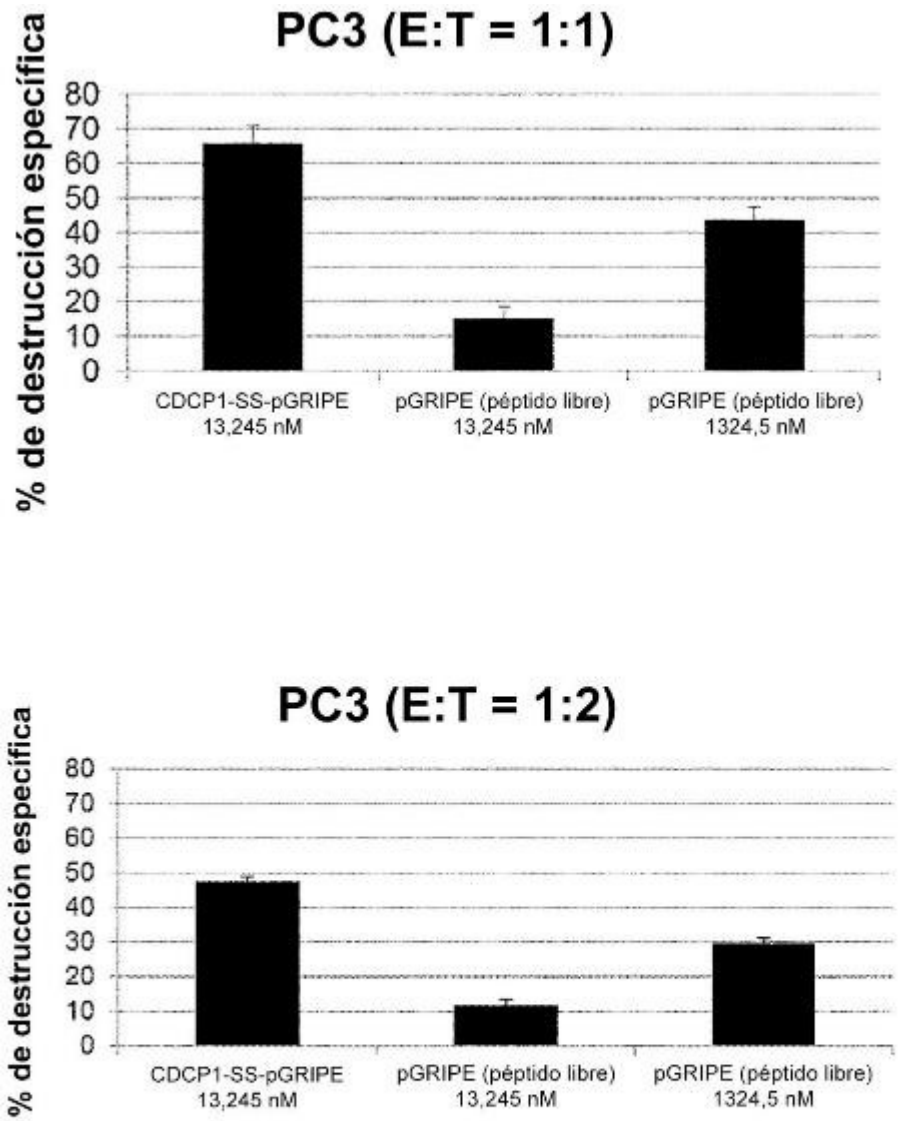

PC3 (E:T = 1:1)
% de destrucción específica
80
70
60
50
40
30
20
10
0
CDCP1-SS-pGRIPE 13,245 nM
pGRIPE (péptido libre) 13,245 nM
pGRIPE (péptido libre) 1324,5 nM
PC3 (E:T = 1:2)
% de destrucción específica
80
70
60
50
40
30
20
10
0
CDCP1-SS-pGRIPE 13,245 nM
pGRIPE (péptido libre) 13,245 nM
pGRIPE (péptido libre) 1324,5 nM

Fig. 7F

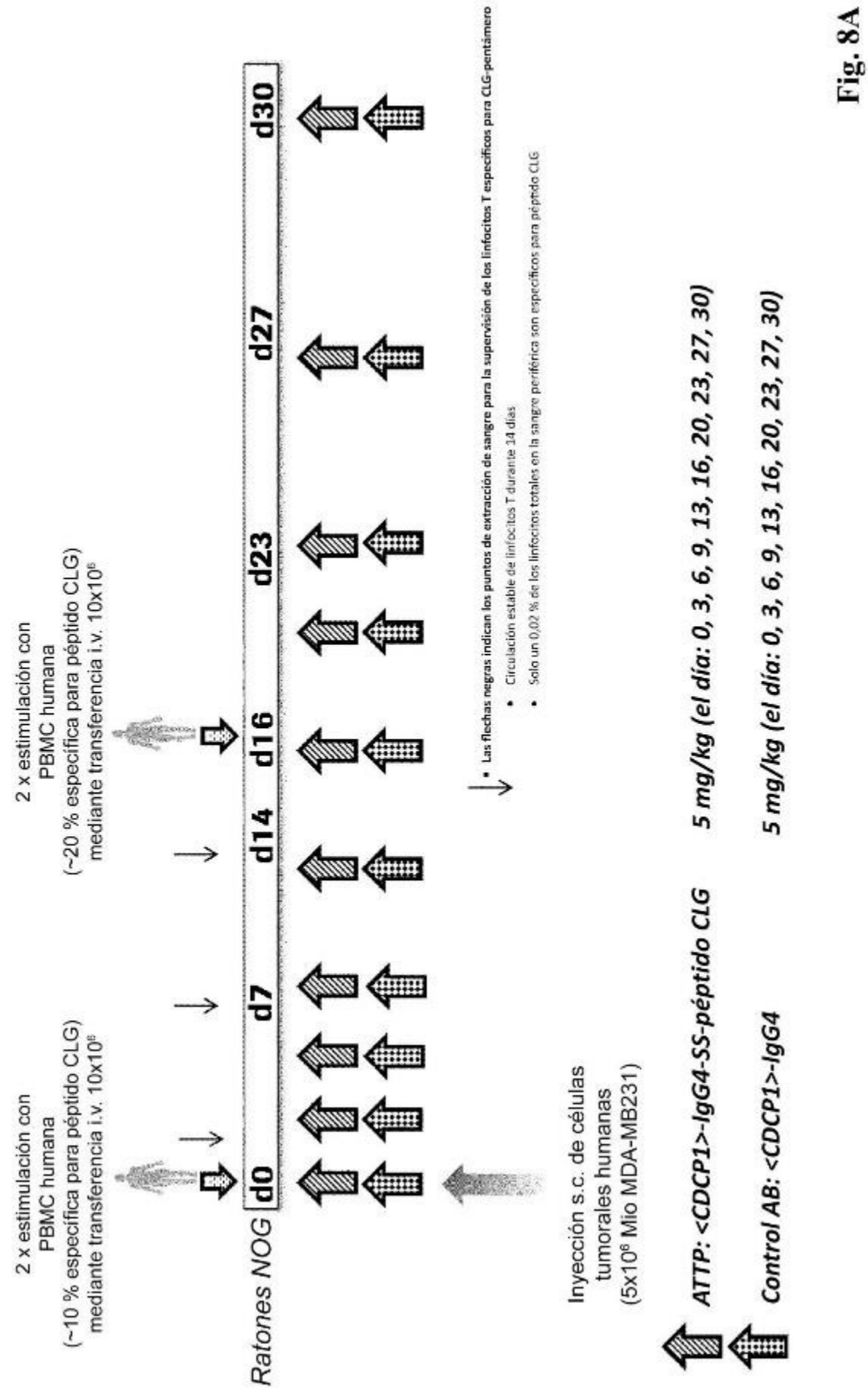

2 x estimulación con PBMC humana (~10 % específica para péptido CLG) mediante transferencia i.v. 10x10⁶
2 x estimulación con PBMC humana (~20 % específica para péptido CLG) mediante transferencia i.v. 10x10⁶
Ratones NOG
d0
d7
d14
d16
d23
d27
d30
Las flechas negras indican los puntos de extracción de sangre para la supervisión de los linfocitos T específicos para CLG-pentámero
Circulación estable de linfocitos T durante 14 días
Solo un 0,02 % de los linfocitos totales en la sangre periférica son específicos para péptido CLG
Inyección s.c. de células tumorales humanas (5x10⁶ Mio MDA-MB231)
ATTP: <CDCP1>-IgG4-SS-péptido CLG 5 mg/kg (el día: 0, 3, 6, 9, 13, 16, 20, 23, 27, 30)
Control AB: <CDCP1>-IgG4 5 mg/kg (el día: 0, 3, 6, 9, 13, 16, 20, 23, 27, 30)

Fig. 8A

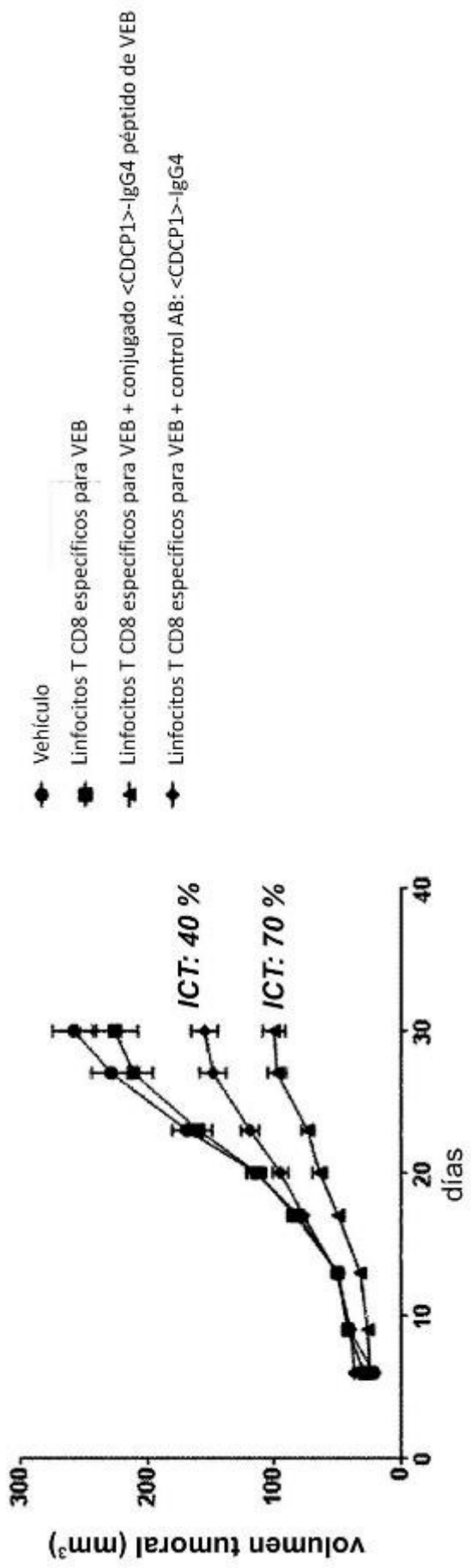
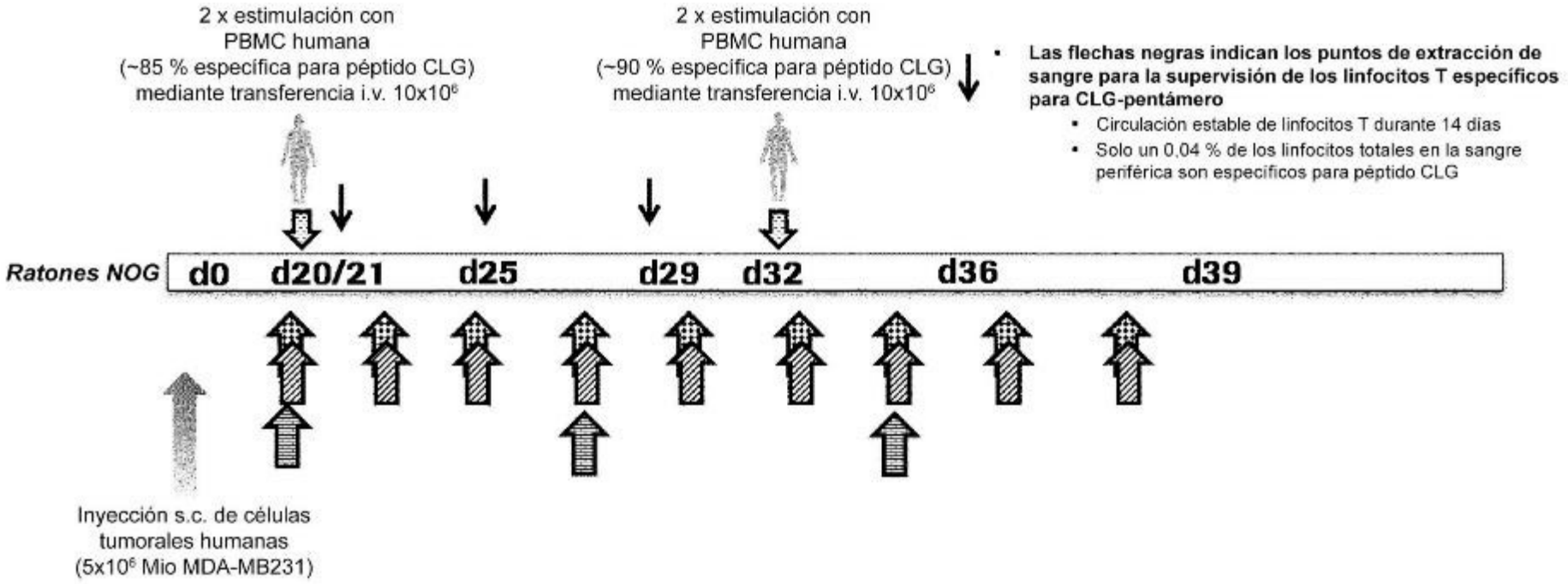

Vehículo
Linfocitos T CD8 específicos para VEB
Linfocitos T CD8 específicos para VEB + conjugado <CDCP1>-IgG4 péptido de VEB
Linfocitos T CD8 específicos para VEB + control AB: <CDCP1>-IgG4
ICT: 40 %
ICT: 70 %
volumen tumoral (mm³)
300
200
100
0
0
10
20
30
40
días

Fig. 8B



Grupos de tratamiento:

ATTP: <CDCP1>-IgG1_PG LALA-SS-péptido CLG

Control AB: <CDCP1>-IgG1_PG LALA

<PD1>-IgG1_PG LALA

	1.º	2.º	3.º	4.º	5.º	6.º	7.º	8.º	9.º
Tratamiento 1 (ATPP/AB, mg/kg)	2,5	2,5	5	5	10	10	15	15	20
Tratamiento 2 (PD1, mg/kg)		5			5			5	

Fig. 9A

ES 2 727 552 T3

		Linfocitos T CD8+ específicos para VEB				
Inhibición del crecimiento tumoral	Solo linfocitos T CD8+	**Conjugado ATTP** i.p.	**Conjugado ATTP + <PD1>** i.p.	Anticuerpo de control i.p.	Anticuerpo de control + <PD1> i.p.	**Conjugado ATTP** p.t.
ICT en %, día 29	3	41	**60**	2	4	59
ICT en %, día 32	9	47	**63**	18	8	52
ICT en %, día 36	-6	22	**58**	4	4	38
ICT en %, día 39	-5	16	**56**	4	0	41

Fig. 9B

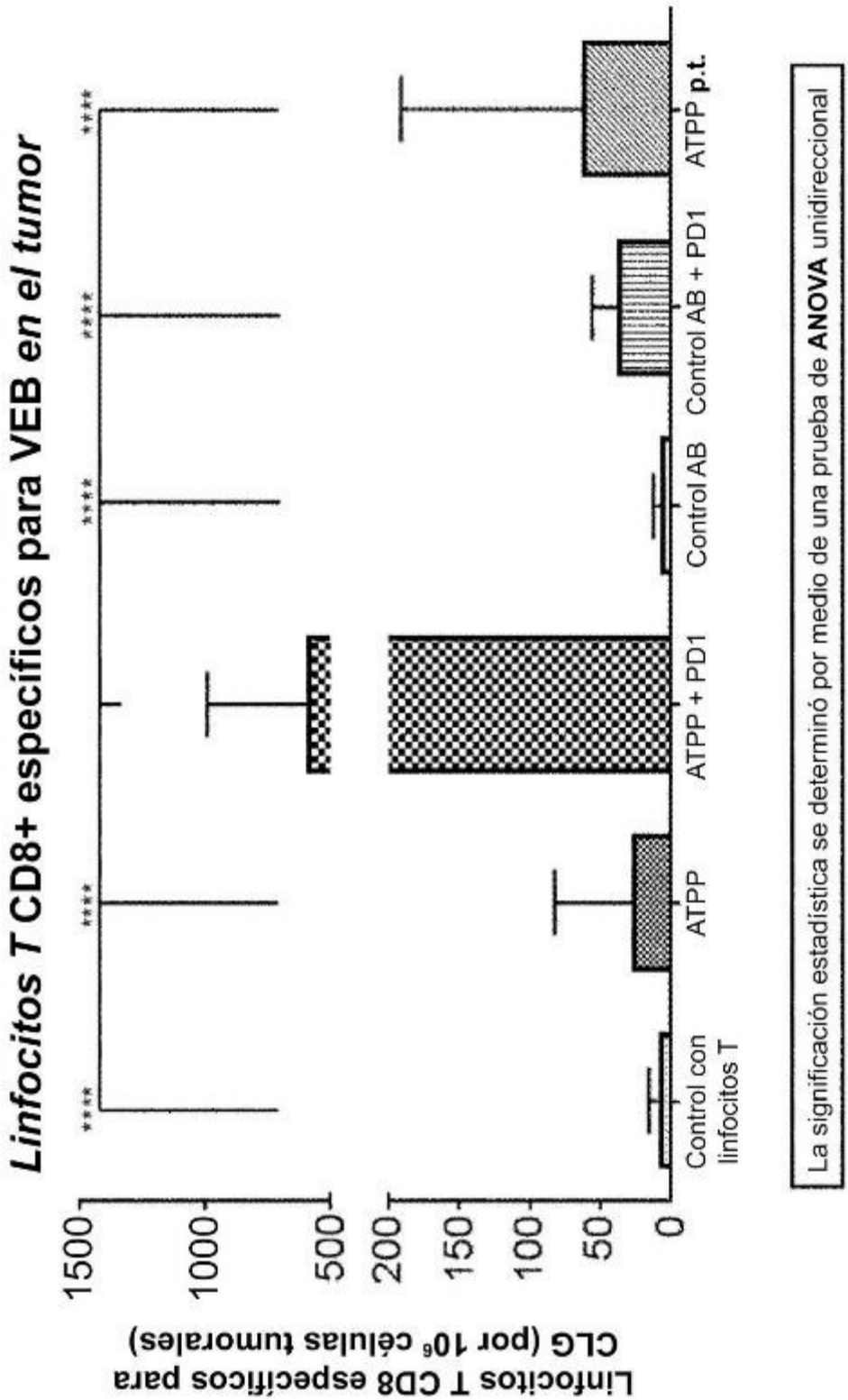

Linfocitos T CD8+ específicos para VEB en el tumor
Linfocitos T CD8 específicos para CLG (por 10⁶ células tumorales)
1500
1000
500
200
150
100
50
0
****
****
****
****
****
Control con linfocitos T
ATPP
ATPP + PD1
Control AB
Control AB + PD1
ATPP p.t.
La significación estadística se determinó por medio de una prueba de ANOVA unidireccional

Fig. 9C