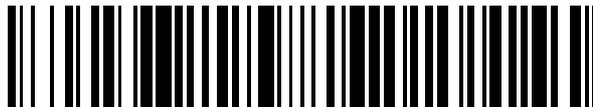


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 786 049**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.11.2013 PCT/EP2013/073648**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.05.2014 WO14072534**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.11.2013 E 13791794 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2020 EP 2917229**

54 Título: **Anticuerpos y fragmentos de los mismos generados contra el dominio α_3 de la proteína HLA-G, métodos y medios para su preparación y usos de los mismos**

30 Prioridad:

12.11.2012 EP 12306398

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

08.10.2020

73 Titular/es:

**INVECTYS (100.0%)
Bâtiment Pasteur BioTop, 28 rue du Docteur
Roux
75015 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**LOUSTAU, MARIA DE LAS NIEVES;
CAUMARTIN, JULIEN y
LANGLADE-DEMOYEN, PIERRE**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 786 049 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos y fragmentos de los mismos generados contra el dominio α_3 de la proteína HLA-G, métodos y medios para su preparación y usos de los mismos

5 La presente divulgación se refiere a anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos dirigidos contra la proteína antígeno leucocitario humano G (HLA-G) y generados contra el dominio α_3 de la proteína HLA-G, especialmente, pero no exclusivamente, cuando dicho dominio α_3 o sus fragmentos se usan para preparar dichos anticuerpos, bajo una forma monomérica y/o dimerica. La divulgación también se refiere al uso de tales anticuerpos o fragmentos como se define en el presente documento para impactar, neutralizar ventajosamente la regulación inmunitaria a la baja debido a las proteínas HLA-G en un cuerpo vivo. Por consiguiente, los anticuerpos o fragmentos de la invención son adecuados para su uso con el fin de remediar una afección diagnosticada en el paciente, cuando dicha afección aprovecha una regulación a la baja del sistema inmunitario del cuerpo vivo debido a la presencia de proteínas HLA-G. Los anticuerpos de la invención también se divulgan para usarse para diagnosticar o controlar una afección en un paciente.

Por lo tanto, la divulgación proporciona medios adecuados para su uso en patologías tales como cáncer o enfermedades cancerígenas, así como enfermedades o afecciones relacionadas o asociadas, cuando estas patologías están asociadas con un mecanismo de escape tumoral que involucra proteínas HLA-G, especialmente en el contexto de los tratamientos de inmunoterapia. De forma más general, la divulgación también proporciona medios adecuados para su uso en patologías que implican la expresión inapropiada de proteínas HLA-G en un hospedador.

La divulgación también proporciona medios adecuados como principios activos para aplicación terapéutica, especialmente medios adecuados para la vacunación inmunoterapéutica de mamíferos, en particular, seres humanos, en el mismo contexto patológico como se describió anteriormente. La divulgación se refiere en particular a medios adecuados para su uso en protocolo(s) de vacunación de ADN, en particular, "vacuna(s) de ADN desnudo".

La divulgación también describe medios adecuados para detectar proteínas HLA-G *in vitro* o monitorear o diagnosticar un estado de salud o una afección patológica, así como medios para monitorear o diagnosticar un estado de salud o afección patológica, en particular, una afección neoplásica, en un cuerpo vivo susceptible de presentar tal estado o afección.

La divulgación también se refiere a métodos para la preparación de los anticuerpos o fragmentos de la invención.

35 Los antígenos de clase I comprenden antígenos clásicos, HLA-A, HLA-B y HLA-C, que exhiben 3 dominios globulares (α_1 , α_2 y α_3) asociados con la β -2-microglobulina (B2M o β 2M), así como con los antígenos no clásicos HLA-E, HLA-F y HLA-G.

40 HLA-G es una molécula no clásica de HLA de clase I que se identificó por primera vez en las células de coriocarcinoma. En contraste con las moléculas clásicas de HLA de clase I, HLA-G se caracteriza por un polimorfismo limitado, presenta una expresión restringida a los tejidos y difiere también por su expresión, estructura y funciones. El gen de los ocho exones abarca 4,4 kb en el cromosoma 6 [1, 2]. Los exones 2, 3 y 4 codifican los dominios extracelulares α_1 , α_2 y α_3 respectivamente. La transcripción primaria de ARN se empalma alternativamente, resultando en la expresión de siete isoformas, cuatro de las cuales están unidas a la membrana (HLA-G1, HLA-G2, HLA-G3 y HLA-G4), y tres son solubles (HLA-G5, HLA-G6 y HLA-G7). HLA-G1 y HLA-G5 son las isoformas más abundantes cuyas estructuras son típicas de la molécula clásica de HLA de clase I: una cadena pesada de tres dominios globulares asociados no covalentemente a β 2M y un péptido, mientras que las otras isoformas son más cortas, careciendo de uno o dos dominios de la cadena pesada, y no se unen a β 2M, como se muestra en la Figura 1.

50 HLA-G se describió inicialmente como se expresa selectivamente en la interfaz materno-fetal en células de citotrofoblasto, representada como un ligando para receptores inhibidores presentes en los linfocitos citolíticos naturales (NK) uterinos, que confiere protección al feto semiallogénico al promover la tolerancia materna [3]. Además de expresarse en tejidos fetales, la expresión constitutiva de HLA-G se encontró más tarde en la médula tímica adulta, córnea, islotes pancreáticos y células precursoras eritroides y endoteliales. Adicionalmente, esta molécula también se puede expresar en condiciones patológicas como el cáncer, enfermedades autoinmunitarias, inflamatorias, infecciones virales o después de un alotrasplante [4].

La actividad inmunoinhibitoria de HLA-G se lleva a cabo a través de la unión específica a tres receptores inhibidores: receptor B1 de tipo inmunoglobulina leucocitaria (LILRB1/ILT2/CD85j), LILRB2 (ILT4/CD85d) y KIR2DL4 (o CD158d).

60 Al vincular estos receptores, y a diferencia de las moléculas clásicas de MHC de clase I, HLA-G actúa como un regulador a la baja de las funciones principales del sistema inmunitario, y hasta la fecha no se han informado ni funciones estimuladoras ni respuestas dirigidas contra HLA-G alogénica. HLA-G se describió originalmente como una molécula tolerogénica que inhibe la función citolítica de los linfocitos NK de la sangre uterina y periférica, pero se sabe que las funciones biológicas de HLA-G también comprenden la inhibición de la función citolítica de los linfocitos NK de la sangre uterina y periférica [5], la función citolítica específica de antígeno de los linfocitos T citotóxicos [6], la

respuesta aloproliferativa de linfocitos T CD4⁺ [7, 8], la proliferación de linfocitos T y linfocitos NK de la sangre periférica [9-11], y la maduración y función de las células dendríticas [12-14]. Adicionalmente, HLA-G es capaz de inducir la generación de células supresoras [12, 15-17].

5 HLA-G es capaz de inhibir todos los agentes de las respuestas antitumorales, bloqueando así todas las etapas de las respuestas inmunitarias. Se expresa en muchos tipos de tumores primarios, metástasis y derrames malignos [18], resumido en la Figura 3, y también se puede encontrar en las células tumorales y los linfocitos infiltrantes de tumores [19]. Se demostró que la expresión de HLA-G por las líneas celulares tumorales las protege de la destrucción por linfocitos T citotóxicos y linfocitos NK [20, 21]. De esta manera, la expresión de HLA-G por células malignas puede
10 prevenir la eliminación inmunitaria del tumor al inhibir localmente la actividad de NK infiltrante tumoral, linfocitos T citotóxicos (CTL) y células presentadoras de antígenos (APC). La relevancia clínica de la expresión de HLA-G por los tumores como un mecanismo de escape inmunitario prominente fue respaldada por la observación de que la expresión de HLA-G en la leucemia crónica de linfocitos B se correlacionaba con una fuerte inmunodeficiencia y una pobre evolución clínica [22]. Inicialmente, HLA-G se propuso como un biomarcador para el diagnóstico o la predicción de los
15 resultados clínicos en el cáncer. Sin embargo, teniendo en cuenta todos los agentes y etapas de la respuesta antitumoral donde está involucrada HLA-G, es evidente cuán vasta puede ser la aplicación de HLA-G en el campo terapéutico contra el cáncer.

Dado que la expresión de HLA-G es particularmente relevante para los mecanismos de escape de las células tumorales al inhibir las células efectoras, se han desarrollado estrategias para lograr el rechazo de las células tumorales neutralizando la regulación inmunitaria a la baja debido a HLA-G, aunque no son suficientes. De hecho, los anticuerpos anti-HLA-G son raros y solo existe un anticuerpo de bloqueo (87G). Este anticuerpo solo interactúa con el dominio α_1 de la cadena pesada de HLA-G asociada a la β_2M . A pesar de que se ha descrito como capaz de neutralizar HLA-G y, por lo tanto, restaurar el rechazo tumoral *in vitro* [21] e *in vivo* [12, 15-17], su aplicabilidad se ve comprometida
20 ya que HLA-G se expresa con frecuencia como una molécula de longitud completa no asociada a β_2M así como a isoformas truncadas libres de β_2M . Estas isoformas también pueden unirse al receptor inhibitorio de LILRB2, por lo tanto, se deben desarrollar nuevos anticuerpos de mayor rango de acción. Todos los demás intentos de producir otros anticuerpos bloqueadores generados contra el dominio α_3 de HLA-G han fracasado. Adicionalmente, la inmunización con HLA-G ha sido notablemente ineficiente produciendo pocos anticuerpos específicos. La razón de esto ha sido
25 aclarada recientemente. En primer lugar, en pacientes trasplantados de riñón, se demostró una asociación negativa entre sHLA-G y la presencia de anticuerpos alogénicos anti-HLA-G [23], indicando que la presencia de HLA-G es antitética a la producción de anticuerpos. En segundo lugar, los estudios *in vitro* recientes han confirmado que la interacción HLA-G/ILRB1 perjudica la maduración de linfocitos B y la producción de anticuerpos en humanos [24]. Debido a que se sabe que HLA-G ejerce una función tolerogénica a través de PIR-B en ratones, que se expresa en los linfocitos B murinos y es funcionalmente homóloga a LILRB1 y LILRB2 humanos, ahora está claro que la interacción
30 HLA-G/PIR-B conduce a la inhibición de los linfocitos B, evitando así la producción de anticuerpos en ratones.

Por lo tanto, la invención tiene lugar en un contexto en el que la producción real de anticuerpos de bloqueo anti-HLA-G se enfrenta al problema de que la generación de anticuerpos anti-HLA-G es extremadamente difícil porque HLA-G es una molécula inmunoinhibitoria. La interacción de esta molécula con los receptores presentes en los linfocitos B y otras células inmunitarias conduce, en el caso anterior, a la inhibición de la maduración y producción de anticuerpos. En otras palabras, se requiere inmunización con HLA-G para producir anticuerpos bloqueadores anti-HLA-G, que a su vez inhibe la producción de anticuerpos. Por este motivo, se han generado pocos anticuerpos específicos contra HLA-G, de los cuales 87G es el único anticuerpo de bloqueo existente. Por lo tanto, el desarrollo de nuevas estrategias de
35 inmunización para evitar esta inhibición es crucial.

De esta manera, para romper el ciclo vicioso mencionado anteriormente y lograr la producción de anticuerpos anti-HLA-G, los inventores han razonado que el problema más difícil era evitar la inhibición de la maduración de los linfocitos B. Otro problema identificado fue generar anticuerpos específicos no solo para las isoformas HLA-G asociadas a β_2M , sino también para isoformas truncadas y libres de β_2M , que se sabe que son producidas y tolerogénicas en los seres humanos [25-27] y en los ratones [28, 29].

Por lo tanto, es un propósito de la invención producir anticuerpos anti-HLA-G específicos mientras se evita la inhibición de la maduración de linfocitos B.

55 Teniendo en mente superar la inhibición de la producción de anticuerpos mediada por HLA-G, los inventores primero realizaron una serie de investigaciones destinadas a determinar qué dominio de HLA-G era responsable de la función inhibitoria de HLA-G. Los estudios han demostrado que en los ratones, el dominio α_1 (alfa1) provoca la inhibición de los linfocitos B. De hecho, las construcciones de proteínas formadas por los dominios $\alpha_1\alpha_2\alpha_3$ o dominios $\alpha_1\alpha_3$, o el dominio α_1 solo eran tolerogénicas *in vivo* en ratones [28, 29]. Este resultado está en línea con estudios previos que demostraron que el dominio α_1 de HLA-G es funcional. Por consiguiente, el dominio α_1 de HLA-G es el objetivo de la mayoría de los anticuerpos HLA-G.
60

Centrándose más particularmente en los receptores KIR2DL4, ya se sabía que su expresión se limita principalmente a los linfocitos NK deciduales [30]. KIR2DL4 es un receptor específico para HLA-G, para el cual es el único ligando conocido [31]. KIR2DL4 se acopla con el dominio α_1 de HLA-G, y más específicamente, a través de los restos Met76
65

y Gln79 que son característicos de HLA-G [32]. Se demostró además que estos dos restos son cruciales para la función inhibidora de HLA-G y que su mutación evitó la inhibición de la actividad citolítica de los linfocitos NK que expresan KIR2DL4 por HLA-G *in vitro*. A pesar de su especificidad para HLA-G, no es probable que KIR2DL4 desempeñe un papel significativo en la función inhibidora de HLA-G, excepto durante el embarazo, principalmente porque su expresión está restringida a los linfocitos NK deciduales, y porque se demostró *in vitro* e *in vivo*, que los LILRB desempeñaban un papel clave a través de la interacción con un dominio α_3 de HLA-G. Es posible, aunque desconocido, que el dominio α_1 de HLA-G juega un papel directo en la función de HLA-G, a través de KIR2DL4 u otro, como receptor aún desconocido.

Sin embargo, se descubrió (publicación enviada) que los monómeros o incluso los dímeros del dominio α_3 de HLA-G fueron, sorprendentemente, no tolerogénicos *in vivo*, en contraste con la enseñanza errónea divulgada en PCT/IB2010/052917 (Figura 4, WO 2010/150233), en la que los experimentos realizados se realizaron exclusivamente *in vitro*.

El documento WO 2010/150233 de hecho divulga polipéptidos que supuestamente podrían usarse como agentes tolerogénicos, es decir, capaces de imitar la función completa de HLA-G.

Al igual que para otras moléculas HLA de Clase I, el sitio de reconocimiento de los receptores LILRB está localizado dentro del dominio α_3 de HLA-G [33-35]. LILRB1 se expresa en linfocitos B, algunos linfocitos T, algunos linfocitos NK, y todos los monocitos y células dendríticas, mientras que LILRB2 es específico de mieloides y solo se expresa por monocitos y células dendríticas [36]. Se ha demostrado que LILRB1 y LILRB2 se unen a una amplia gama de moléculas clásicas de HLA a través del dominio α_3 cuando se asocia con β_2M . HLA-G es el ligando de mayor afinidad por LILRB2 [37]. Esta capacidad de unión a LILRB más fuerte de HLA-G en comparación con otras moléculas de HLA de Clase I se ilustra particularmente bien por el hecho de que HLA-G en la superficie de las células tumorales, pero no las moléculas clásicas de HLA de clase I, es capaz de comprometer los receptores LILRB1 y/o LILRB2 de efectores citolíticos con la fuerza suficiente para bloquear la función de estos efectores y así proteger las células tumorales de la destrucción inmunitaria [38]. LILRB1 y LILRB2 no se unen a las mismas estructuras HLA-G [39]. Además, se ha demostrado que presentan una mayor afinidad por los multímeros de HLA-G que las estructuras monoméricas [37]. Es importante resaltar la diferencia entre la forma en que LILRB1 y LILRB2 se unen a sus ligandos: LILRB1 reconoce solo estructuras de HLA-G asociadas a β_2M , mientras que LILRB2 reconoce tanto las cadenas pesadas de longitud completa de HLA-G asociadas a β_2M como las libres de β_2M [40, 41] así como las isoformas de los dominios α_1 - α_3 truncados (HLA-G2 / G6) [29, 39]. De hecho, LILRB2 muestra un reconocimiento de unión a HLA notablemente distinto al unirse preferentemente al dominio α_3 que β_2M , involucrando los aminoácidos aromáticos Phe195 y Tyr197, como se muestra en la Figura 2. Esto explica la unión de HLA-G independiente de β_2M del último receptor y su alta afinidad por las isoformas libres de β_2M .

Por lo tanto, la evidencia disponible hasta la fecha puede sugerir una función tolerogénica de HLA-G que está mediada principalmente por la interacción de su dominio α_3 con moléculas LILRB1 y LILRB2.

Sin embargo, también se demostró que el dominio α_3 no es inhibidor con respecto a la respuesta inmunitaria mientras contiene el sitio de reconocimiento para los receptores LILRB1 y LILRB2. De hecho, se encontró sorprendentemente, y después se evaluó, que la única presencia de un dominio α_3 de HLA-G no es suficiente para iniciar la función tolerogénica de HLA-G.

También se concluyó que la unión de los dímeros de HLA-G a las moléculas LILRB1 y LILRB2 depende en gran medida del dominio de α_3 de HLA-G único, aunque se requiere β_2M para la unión de HLA-G/LILRB1. Estos hallazgos revelaron que el dominio α_3 de HLA-G, que parece no ser tolerogénico en sí mismo, es probable que sea un objetivo de elección para trabajar en la función tolerogénica de la proteína HLA-G.

Por "no tolerogénico", se entiende en el presente documento que los monómeros mencionados anteriormente o incluso los dímeros del dominio α_3 de HLA-G no son capaces de imitar la función de HLA-G en la regulación a la baja de la respuesta inmunitaria cuando se administra a un organismo vivo, en particular, un mamífero. De acuerdo con un aspecto particular, la tolerancia o la ausencia de tolerancia se aprecia teniendo en cuenta la actividad de al menos uno entre un amplio espectro de agentes generalmente involucrados en las respuestas inmunitarias, tales como los linfocitos B, linfocitos T, linfocitos NK y monocitos o células dendríticas, citados solo como ejemplos.

Para los fines de la presente divulgación, la tolerancia se determina en particular a través de la capacidad de la molécula analizada (por ejemplo, el dominio α_3 de HLA-G) para inhibir la maduración de los linfocitos B *in vivo* y, como resultado, la producción efectiva de anticuerpos anti-HLAG.

También se conoce, en particular de DESAI S. et al. en "Structural relatedness of distinct determinants recognized by monoclonal antibody TP25.99 on beta 2-microglobulin-associated and beta 2-microglobulin-free HLA class I heavy chains" (Journal of Immunology 15 de septiembre de 2000, vol. 165, n.º 6, páginas 3275-3283) el llamado anticuerpo monoclonal TP25.99, que se une a un determinante expresado en el dominio α_3 de todas las proteínas HLA-A, -B y -C. Sin embargo, como se indica en PAUL PASCALE et al. en "HLA-G, -E, -F preworkshop: Tools and protocols for analysis of non-classical class I genes transcription and protein expression" (HUMAN IMMUNOLOGY, vol. 61, n.º 11,

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45

Noviembre de 2000, páginas 1177-1195), el anticuerpo TP25.99 puede usarse para discriminar entre HLA-G y otros antígenos de clase I, ya que el anticuerpo TP25.99 reconoce los antígenos HLA-A, HLA -B, HLA-C, y HLA -E, pero no HLA-G. Se puede ver de lo anterior que, aunque puede existir un anticuerpo que se une a un determinante expresado en el dominio α_3 de algunos antígenos HLA de clase I, se ha confirmado por fallo que la obtención de un anticuerpo que se une a un determinante expresado en el dominio α_3 de HLA-G no es trivial.

Por consiguiente, la divulgación se refiere a un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que se ha planteado contra el dominio α_3 de la proteína HLA-G, cuando el dominio α_3 se utiliza como inmunógeno o, más eficientemente cuando la molécula de ADN que codifica el dominio α_3 de la proteína HLA-G se utiliza para la inmunización. La divulgación también se refiere a métodos para obtener dicho anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo, en particular, un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo que tiene una conformación tridimensional particular (también denominado "reconocimiento de un epítipo conformacional en el dominio α_3 de la proteína HLA-G" en el presente documento).

Como resultado, la presente invención se refiere a un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente al dominio α_3 de la proteína HLA-G y que reconoce un epítipo conformacional contenido en una secuencia de aminoácidos que tiene la SEQ ID No.1 y que bloquea la unión de una proteína HLA-G que exhibe un dominio alfa 3 a al menos uno de los receptores LILRB1 o LILRB2, en particular, que bloquea la unión de dicha proteína HLA-G a los receptores LILRB1 y LILRB2.

En una realización particular, un "*dominio α_3 de la proteína HLA-G*" se define como un dominio que tiene una secuencia de polipéptidos como se divulga en la SEQ ID NO: 1.

Opcionalmente, en una realización particular, un "*dominio α_3 de la proteína HLA-G*" se define como un dominio que tiene una secuencia de polipéptidos como se divulga en la SEQ ID NO: 1 y que además tiene los dos restos de aminoácidos RA en la extremidad del extremo N de la SEQ ID NO: 1, y/o los dos restos de aminoácidos KQ en la extremidad del extremo C de la SEQ ID NO: 1.

En un aspecto específico, un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo se une específicamente al dominio α_3 de la proteína HLA-G que tiene una conformación como se encuentra naturalmente en las células que expresan HLA-G. En otras palabras, dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo reconoce un epítipo conformacional específico del dominio α_3 de HLA-G como se encuentra naturalmente en las células que expresan HLA-G.

La proteína HLA-G se puede encontrar bajo varias formas estructurales (o tridimensionales), que comúnmente se llaman isoformas. En la Figura 1 se dan ejemplos de isoformas de la proteína HLA-G. HLA-G1 y HLA-G5 son proteínas HLA-G secretadas o unidas a la membrana que se encuentran asociadas típicamente con la proteína β_2 -microglobulina. Por el contrario, HLA-G2, HLA-G3 y HLA-G4 son isoformas de la proteína HLA-G unidas a la membrana que no exhiben concomitantemente todos los dominios α_2 y α_3 . HLA-G6 y HLA-G7 son isoformas de la proteína HLA-G secretadas que tampoco exhiben concomitantemente todos los dominios α_2 y α_3 .

En el contexto de la presente invención, "*unión a la proteína HLA-G*" por anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno significa que los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de la invención reconocen isoformas de la proteína HLA-G que exhiben un dominio α_3 o se encuentran asociadas con un dominio α_3 , mientras se encuentra además asociado o no asociado con la proteína β_2 -microglobulina o fragmento de la misma.

Por "*asociado*", se entiende una interacción cercana entre los dominios o dominios y proteínas considerados. Tal interacción puede lograrse mediante la formación de enlaces de hidrógeno, o interacciones de van der Waals, o enlaces iónicos.

Por "*reconocer*", se entiende que se produce un reconocimiento específico que permite la unión.

La proteína β_2 -microglobulina que, en algunos casos, se puede encontrar asociada a la proteína HLA-G, sin embargo, no está sistemáticamente presente en todas las isoformas de la proteína HLA-G. Como se ha detallado anteriormente, la presencia de una proteína β_2 -microglobulina asociada tampoco es necesaria para permitir la unión de una proteína HLA-G al receptor inhibidor LILRB2.

En el contexto de la invención, "*proteína HLA-G libre de β_2 -microglobulina*" por lo tanto, se relaciona con la proteína HLA-G que no está asociada con la proteína β_2 -microglobulina. Por "*isoforma de proteína HLA-G truncada libre de β_2 -microglobulina*" o "*isoforma de proteína HLA-G truncada libre de β_2 -microglobulina que exhibe un dominio α_3* ", se hace referencia a una proteína HLA-G que no muestra todos los dominios que se pueden encontrar en una proteína HLA-G y que no está asociada con la proteína β_2 -microglobulina.

En un aspecto particular, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos se unen específicamente al dominio α_3 cuando están presentes en HLA-G, en particular, en β_2 -microglobulina libre de HLA-G, es decir, el HLA-G sin β_2 -microglobulina que muestra un dominio α_3 o el HLA-G truncado sin β_2 -microglobulina que muestra un dominio

α3.

Por "*unir*" o "*unión*" como se usa en el presente documento, se hace referencia a una interacción de tipo antígeno-anticuerpo. Por propiedades de "*unión específica*" de los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos se entiende que los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos se unen directamente al dominio α3 de la proteína HLA-G con exclusión de otros dominios de la proteína HLA-G o con exclusión de unirse a otras proteínas humanas, en particular, a la exclusión de la unión a otras proteínas HLA. La capacidad de unión puede medirse mediante la determinación de la afinidad de unión por el dominio α3 de la proteína HLA-G, según pruebas convencionales conocidas en la técnica de la invención, en particular, la afinidad de unión se puede analizar mediante análisis de ELISA o de transferencia Western. Según una realización específica, "*unión específica*" significa que la interacción entre los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de la invención y el dominio α3 de la proteína HLA-G a través de dicha unión específica es más estable que la interacción entre los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de la invención y otras proteínas humanas, u otros dominios de HLA-G u otras proteínas HLA. La estabilidad se puede apreciar comparando la persistencia en el tiempo o en condiciones de competencia, del complejo antígeno-anticuerpo y, en particular, midiendo la constante de disociación de los anticuerpos que reconocen el dominio α3 de la proteína HLA-G.

Es un propósito de la invención producir anticuerpos anti-HLA-G específicos para las isoformas de HLA-G que abarcan un dominio α3, o que reconocen las isoformas de HLA-G asociadas con un dominio α3.

Por consiguiente, cuando se refiere a la unión a una proteína HLA-G, la invención se refiere especialmente a la unión a una isoforma de HLA-G que exhibe un dominio α3.

De acuerdo con un aspecto particular, el dominio α3 de la proteína HLA-G al que se hace referencia en el presente documento es como se encuentra en las células humanas no patológicas. Tal dominio α3 de la proteína HLA-G se divulga en la bibliografía y las bases de datos disponibles para un experto en la técnica de la invención. El dominio α3 de la proteína HLA-G se anota en particular en la entrada NM_002127 (número de acceso NCBI versión NM_002127.5). Sin perjuicio de lo anterior y de acuerdo con una realización particular, dicho dominio se define como el dominio que tiene una secuencia de polipéptidos como se divulga en la SEQ ID NO: 1.

Por "*fragmento de unión al antígeno*" de un anticuerpo de la invención, se entiende una parte de un anticuerpo, es decir, una molécula correspondiente a una parte de la estructura del anticuerpo de la invención que exhibe capacidad de unión al antígeno para el dominio α3 de la proteína HLA-G. Dicho fragmento exhibe sustancialmente la misma capacidad de unión al antígeno para dicho dominio que la capacidad de unión al antígeno del anticuerpo que tiene una estructura de anticuerpo completa. La capacidad de unión al antígeno se puede determinar midiendo la afinidad del anticuerpo y del fragmento de unión al antígeno considerado con el antígeno diana.

Los fragmentos de anticuerpos que se unen a antígenos abarcan fragmentos que comprenden los dominios hipervariables designados CDR (Regiones de Determinación de Complementariedad) o parte(s) de los mismos que abarcan el sitio de reconocimiento para el antígeno, es decir, el dominio α3 de la proteína HLA-G, definiendo así la especificidad de reconocimiento del antígeno. Cada cadena ligera y pesada (respectivamente VL y VH) de una inmunoglobulina de cuatro cadenas tiene tres CDR, designadas VL-CDR1, VL-CDR2, VL-CDR3 y VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, respectivamente. De este modo, los fragmentos de anticuerpos de la invención (fragmentos de unión al antígeno), comprenden o consisten en todas o una selección de CDR entre VL-CDR1, VL-CDR2, VL-CDR3 y VH-CDR1, VH-CDR2 y VH-CDR3 o porciones funcionales de los mismos, es decir, porciones que exhiben la capacidad de unión deseada, preferentemente con una alta afinidad, para el dominio α3 de la proteína HLA-G.

Los fragmentos que comprenden o consisten en VH-CDR3 y/o VL-CDR3 o porciones funcionales de los mismos son especialmente preferidos cuando las regiones CDR3 parecen ser determinantes en la especificidad de reconocimiento del antígeno. Los fragmentos de unión al antígeno particulares comprenden dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de un VH y/o un VL de un anticuerpo.

Para un propósito ilustrativo, los fragmentos de unión al antígeno de un anticuerpo que contienen los dominios variables que comprenden las CDR de dicho anticuerpo abarcan Fv, dsFv, scFv, Fab, Fab', F(ab')₂, que están bien definidos con referencia a Kabat y también a Roitt I. et al (Fundamental and Applied Immunology MEDSI/McGraw-Hill). Los fragmentos Fv consisten en los dominios VL y VH de un anticuerpo asociados entre sí por interacciones hidrófobas; en fragmentos dsFv, el heterodímero VH:VL se estabiliza mediante un enlace disulfuro; en fragmentos scFv, los dominios VL y VH están conectados entre sí a través de un conector peptídico flexible, formando así una proteína de cadena única. Los fragmentos Fab son fragmentos monoméricos obtenibles por digestión con papaína de un anticuerpo; comprenden toda la cadena L y un fragmento VH-CH1 de la cadena H, unidos entre sí a través de un enlace disulfuro. El fragmento F(ab')₂ puede producirse por digestión con pepsina de un anticuerpo debajo del disulfuro de la región bisagra; comprende dos fragmentos Fab', y adicionalmente una porción de la región bisagra de la molécula de inmunoglobulina. Los fragmentos Fab' se pueden obtener a partir de fragmentos F(ab')₂ cortando un enlace disulfuro en la región bisagra. Los fragmentos F(ab')₂ son divalentes, es decir, comprenden dos sitios de unión al antígeno, como la molécula de inmunoglobulina nativa; por otro lado, los fragmentos Fv (un dímero VH-VL que constituye la parte variable de Fab), dsFv, scFv, Fab y Fab' son monovalentes, es decir, comprenden un único sitio de

unión al antígeno.

Estos fragmentos básicos de unión al antígeno pueden combinarse para obtener fragmentos de unión al antígeno multivalentes, tales como diacuerpos, tricuerpos o tetracuerpos. Estos fragmentos de unión al antígeno multivalentes también son parte de la presente divulgación.

Para los propósitos ilustrativos, los anticuerpos o fragmentos de los mismos pueden obtenerse mediante inmunización de un mamífero, en particular, un roedor, especialmente, ratones o ratas, con un dominio $\alpha 3$ monomérico o dimérico de la proteína HLA-G. Como se ejemplifica adicionalmente en el presente documento, los inventores han demostrado que la inmunización de ratones Balb/c y C57Bl permitió la producción de anticuerpos de acuerdo con las reivindicaciones. Se puede concluir que varios genotipos de mamíferos son adecuados para implementar la presente invención a través de la inmunización de un mamífero.

Los anticuerpos o fragmentos de los mismos pueden obtenerse después de la inmunización de un animal elegido entre un mamífero adecuado para la preparación de anticuerpos que se deben recuperar, en particular, un roedor, especialmente, ratones o ratas, con un dominio monomérico $\alpha 3$ de la proteína HLA-G. El protocolo de inmunización puede abarcar las etapas de cebado y refuerzo.

Los métodos de inmunización son numerosos y convencionales en la técnica de la invención y dependen del propósito final de los anticuerpos inducidos, ya sea recuperados o actuando como principio activo *in vivo*.

Según los resultados particulares logrados con las técnicas actualmente disponibles de generación de anticuerpos, sin embargo, algunos métodos de inmunización pueden no ser apropiados para la producción eficiente y confiable de anticuerpos de la invención, es decir, pueden descartarse con respecto a otros métodos para recuperar adicionalmente los anticuerpos de la invención como se ilustra en los ejemplos y por la imposibilidad de obtener anticuerpos en la técnica anterior.

Los genotipos particulares de mamíferos, que son adecuados para implementar la presente invención a través de la inmunización de un mamífero se pueden elegir para permitir la producción de anticuerpos o fragmentos de los mismos de la invención a escala industrial, en particular, como se ejemplifica en el presente documento.

Según un aspecto particular, los anticuerpos o fragmentos de los mismos se obtienen siguiendo un protocolo de inmunización con ADN, en particular, un protocolo de inmunización que implica la inmunización de un animal elegido entre un mamífero no humano adecuado para la preparación de anticuerpos para ser recuperados, como se ha discutido anteriormente, en particular, un roedor, especialmente, ratones o ratas, con un vector apropiado o sin vector, para el suministro de ADN, por ejemplo, usando una etapa de electroporación de ADN como se detalla adicionalmente a continuación. Aunque el protocolo de inmunización con ADN que puede usarse puede abarcar el recurso a adyuvante(s), la divulgación también describe un método de inmunización que implica la administración de "ADN desnudo" sin adyuvante.

En otro aspecto, un ADN se usa en un protocolo de inmunización para provocar *in vivo* anticuerpos en un mamífero, especialmente un ser humano, para propósitos terapéuticos. En tal caso, la invención se refiere al ADN que codifica el dominio $\alpha 3$ de la proteína HLA-G para su uso como fármaco para la obtención de anticuerpos contra el dominio $\alpha 3$ de la proteína HLA-G *in vivo* por el hospedador inmunizado, para tratar al hospedador, especialmente el hospedador humano sometido al protocolo de inmunización con ADN, de acuerdo con las definiciones proporcionadas en el presente documento. En este contexto, también se divulga un método de inmunización que implica la administración de "ADN desnudo", para dicho propósito terapéutico.

En un aspecto particular, los anticuerpos o los fragmentos de unión al antígeno se unen al dominio $\alpha 3$ de la proteína HLA-G cuando este dominio está bajo una forma monomérica o dimérica. Por "forma dimérica" se entiende un conjunto de dos dominios $\alpha 3$ de la HLA-G humana o fragmentos de los mismos. Sin embargo, la unión del dominio $\alpha 3$ de la proteína HLA-G también abarca cuando este dominio se encuentra bajo una forma multimérica o participa en un ensamblaje multimérico, es decir, implicando otros dominios que no sean $\alpha 3$ o más de dos dominios $\alpha 3$ o fragmentos de los mismos.

Como se ha indicado anteriormente, la proteína HLA-G puede encontrarse asociada con la proteína $\beta 2$ -microglobulina.

Por consiguiente, en un aspecto, un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo se une al dominio $\alpha 3$ cuando está presente en una proteína HLA-G, en particular, se une a la proteína HLA-G libre de $\beta 2$ -microglobulina que exhibe un dominio $\alpha 3$ o una isoforma de proteína HLA-G truncada libre de $\beta 2$ -microglobulina que exhibe un dominio $\alpha 3$.

De acuerdo con un aspecto particular, un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo se une al dominio $\alpha 3$ de una proteína HLA-G cuando dicho dominio está bajo una forma monomérica y/o dimérica, y se une al dominio $\alpha 3$ cuando está presente en una proteína HLA-G, en particular, se une a la proteína HLA-G libre de $\beta 2$ -microglobulina que exhibe un dominio $\alpha 3$ o una $\beta 2$ -microglobulina.

En un aspecto, un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo se une al menos a una o varias de las isoformas de la proteína HLA-G seleccionadas entre: HLA-G1, HLA-G2, HLA-G5 y HLA-G6.

5 En un aspecto, un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo se une a HLA-G1.

En un aspecto, un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo se une a HLA-G5.

10 De acuerdo con la divulgación, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno son anticuerpos bloqueantes o fragmentos de unión al antígeno bloqueantes de los mismos.

15 Por "*bloqueante*", se entiende que la unión entre las proteínas HLA-G que exhiben un dominio $\alpha 3$, o asociadas con un dominio $\alpha 3$, como se define aquí, y sus receptores reconocidos por el dominio $\alpha 3$, se previene o disminuye fuertemente en presencia de anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de la invención. Por lo tanto, por "*bloqueante*", se entiende que la función biológica posterior a la unión entre las proteínas HLA-G a través de un dominio $\alpha 3$ y sus receptores se anula o disminuye fuertemente en presencia de anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno.

20 La función biológica a la que se hace referencia en este contexto es la actividad inmunoinhibitoria de las proteínas HLA-G que exhiben un dominio $\alpha 3$, como se divulga en el presente documento y se evalúa en la bibliografía. Por consiguiente, se puede decir que los anticuerpos o los fragmentos de unión al antígeno son agentes antagonistas de la proteína HLA-G, o agentes antagonistas del(de los) efecto(s) de la proteína HLA-G que tiene un dominio $\alpha 3$, porque interfieren con la actividad de dicha proteína HLA-G y/o se oponen a su actividad al menos en parte o completamente, directa o indirectamente.

25 Según un aspecto, se evita la unión entre al menos una o varias de las siguientes isoformas de la proteína HLA-G: HLA-G1, HLA-G2, HLA-G5 o HLA-G6 y sus receptores reconocidos por el dominio $\alpha 3$.

30 De acuerdo con la divulgación, un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención bloquea la unión de una proteína HLA-G que exhibe un dominio $\alpha 3$ a al menos uno de los receptores LILRB1 o LILRB2, en particular, bloquea la unión de dicha proteína HLA-G a los receptores LILRB1 y LILRB2.

De acuerdo con la divulgación, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de la invención reconocen un epítipo conformacional contenido en una secuencia de aminoácidos que tiene la SEQ ID NO: 1.

35 Tal epítipo también puede estar contenido en una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de polinucleótidos que comprende o que consiste en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 6, o una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de polinucleótidos que tiene al menos del 80 al 85 %, preferentemente al menos un 90 %, más preferentemente al menos un 95 %, y lo más preferentemente al menos un 98 % o 99 % de identidad en toda su longitud con uno de los polinucleótidos que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 6.

40 El término "*epítipo*" se usa en el presente documento como sinónimo de "determinante antigénico", como se encuentra en un antígeno, con el fin de definir el sitio al que se unen los anticuerpos o fragmentos de la invención a través de su paratopo. En el contexto de la invención, un epítipo contiene al menos 5 restos de aminoácidos, en particular, al menos 8 restos de aminoácidos.

"*Epítipo lineal (o secuencial, continuo)*" se refiere a un epítipo que consiste en restos de aminoácidos que forman una secuencia juntos en la secuencia primaria del antígeno proteico, es decir, el dominio $\alpha 3$ de la proteína HLA-G.

50 "*Epítipo conformacional (o ensamblado, discontinuo)*" se refiere a un epítipo que consiste en restos de aminoácidos, al menos algunos de los cuales están separados de los demás en la secuencia primaria del antígeno proteico, es decir, el dominio $\alpha 3$ de la proteína HLA-G, y que se unen en una estructura 3D reconocida por un anticuerpo.

55 En una realización particular de la invención, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos se proporcionan como un suero policlonal o se purifican a partir de un suero policlonal, por ejemplo, como se describe en la sección Resultados de la presente divulgación.

La invención también se refiere a un suero policlonal que comprende anticuerpos según la reivindicación 1.

60 "*Suero policlonal*" se refiere a un suero que comprende una población heterogénea de muchos anticuerpos diferentes o fragmentos de los mismos generados contra un antígeno específico, que, por lo tanto, son específicos para una serie de determinantes antigénicos distintos encontrados en dicho antígeno específico.

65 En un aspecto particular de la divulgación, los anticuerpos de la invención son anticuerpos monoclonales o son anticuerpos monoclonales quiméricos.

Por lo tanto, la divulgación también describe anticuerpos monoclonales, lo que significa que una composición de estos anticuerpos comprende anticuerpos que son idénticos, en términos de especificidad de unión al antígeno y, por consiguiente, en términos de composición de región variable. Por lo tanto, los anticuerpos pueden calificar como monoclonales incluso si se obtienen mediante técnicas alternativas a la técnica del hibridoma, como se conoce en la técnica de la invención.

En otra realización, la divulgación también describe una molécula quimérica que comprende un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las definiciones proporcionadas en este documento o un fragmento de unión al antígeno del mismo, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo está asociado con una molécula funcionalmente diferente.

Una molécula quimérica puede ser una proteína quimérica de fusión o un conjugado resultante de cualquier forma adecuada de unión, incluida la unión covalente, injerto, enlace químico con un grupo químico o biológico o una molécula, tal como un grupo protector o una molécula adecuada para la protección contra la escisión de proteasas *in vivo*, para mejorar la estabilidad y/o la vida media del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, con una molécula biológicamente activa, especialmente un principio activo terapéutico, un vector (que incluye especialmente un vector de proteína) adecuado para dirigir el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno a células o tejidos específicos del cuerpo humano, o con una etiqueta o con un enlazador, especialmente cuando se usan fragmentos del anticuerpo.

La divulgación también describe una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención, como se divulga en el presente documento.

La divulgación también describe una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de dominio $\alpha 3$ de HLA-G humana, que se selecciona entre el grupo que consiste en:

- a. un polinucleótido derivado de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 9 y que tiene de 250 a 305 nucleótidos de longitud, o;
- b. un polinucleótido que comprende o que consiste en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 6 y que tiene de 250 a 550 nucleótidos de longitud, o;
- c. un polinucleótido que tiene al menos un 80 %, preferentemente al menos un 85 %, más preferentemente al menos un 90 % o un 95 %, y lo más preferentemente al menos un 98 % o un 99 % de identidad en toda su longitud con uno de los polinucleótidos que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 6 y que tiene de 250 a 550 nucleótidos de longitud, en particular, un polinucleótido que codifica el polipéptido $\alpha 3$ que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 1, o;
- d. un polinucleótido que es un fragmento del polinucleótido de a. o b. o c. y que tiene de 30 a 150 nucleótidos de longitud;

o describe una molécula de ácido nucleico que comprende o que consiste en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 9.

Por "*derivado*", se entiende en particular que una molécula de ácido nucleico es una secuencia optimizada con respecto a la secuencia polinucleotídica de HLA-G natural, en particular, como se divulga en las bases de datos. La invención no abarca una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia polinucleotídica de HLA-G natural, como se divulga particularmente en la SEQ ID NO: 9 como tal.

Por consiguiente, los polinucleótidos pueden ser secuencias optimizadas, cuyos codones han sido en parte sustituidos por codones más frecuentes determinados con respecto a las células utilizadas para la expresión del polinucleótido. Las células utilizadas para la expresión del polinucleótido pueden ser células de mamífero, en particular, células humanas, o células eucariotas tales como células de insectos o plantas, o células procariotas. El polinucleótido de la SEQ ID NO: 6 ilustra una molécula optimizada de este tipo. Las técnicas de optimización en este campo son convencionales.

A causa de la degeneración del código genético, son posibles sustituciones silenciosas, especialmente al nivel de la tercera posición de un codón, que se sabe que es una posición particularmente lábil. Por lo tanto, una secuencia optimizada puede presentar un 25 % o un 30 % y hasta un 40 % o 45 % de nucleótidos modificados en comparación con los nucleótidos presentes en una posición dada en la secuencia polinucleotídica de HLA-G natural. En otras palabras, una secuencia optimizada puede tener una similitud de un 75 % o un 70 % a 60 % o 55 % respectivamente en comparación con la secuencia polinucleotídica de HLA-G natural, en particular, como se divulga en las bases de datos.

Puede verse en el presente documento que los experimentos de inmunización con ADN se realizaron usando un plásmido que comprende la SEQ ID NO: 6, que es una secuencia de ácido nucleico optimizada que codifica el dominio $\alpha 3$ de HLA-G como se divulga en la SEQ ID NO: 1: el conjunto de reglas de optimización utilizado condujo a una secuencia nucleica optimizada (divulgada en la SEQ ID NO: 10) que codifica el dominio $\alpha 3$ de HLA-G que tiene aproximadamente un 83,4 % de identidad con la secuencia de ácido nucleico natural correspondiente (divulgada en la SEQ ID NO: 9 en el presente documento). Por lo tanto, la presente divulgación abarca polinucleótidos que tienen al

menos un 80 %, en particular un 81, 82, 83 u 84 %, preferentemente al menos un 85 %, más preferentemente al menos un 90 % o un 95 %, y lo más preferentemente al menos 98 % o 99 % de identidad en toda su longitud con uno de los polinucleótidos que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 6.

5 De acuerdo con un aspecto particular, una secuencia de ácido nucleico optimizada como se define en el presente documento codifica un polipéptido que consiste en un polipéptido $\alpha 3$ o que tiene una porción $\alpha 3$, en particular, un polipéptido que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 1.

10 Con el fin de recuperar los anticuerpos de la invención a partir de células productoras, el polinucleótido puede comprender, aguas arriba de la secuencia de nucleótidos que codifica las cadenas de anticuerpos, una secuencia que codifica un péptido señal para la secreción del anticuerpo expresado. También puede comprender, aguas abajo de la secuencia de nucleótidos que codifica las cadenas de anticuerpos, una secuencia que codifica un ancla transmembrana.

15 Por consiguiente, la SEQ ID NO: 10 divulga la secuencia de nucleótidos optimizada de HLA-G humana restringida a la secuencia que codifica el dominio $\alpha 3$ de HLA-G humana como se usa en el plásmido descrito en la sección de Resultados en el presente documento, adecuado para su uso para la preparación de anticuerpos de la invención.

20 La SEQ ID NO: 9 también divulga una secuencia nucleotídica derivada de HLA-G humana y restringida a la secuencia que codifica el dominio $\alpha 3$ de HLA-G humana, adecuado para su uso para la preparación de anticuerpos como se divulga en el exón 4 de la proteína HLA-G encontrada con el número de acceso NCBI NM_002127.5, entre las posiciones 797 y 1072.

25 La SEQ ID NO: 6 divulga la secuencia de nucleótidos utilizada para el experimento de inmunización con ADN descrito en la sección de Resultados en el presente documento, es decir, una secuencia nucleotídica optimizada que codifica un péptido señal HLAG, el dominio $\alpha 3$ de HLA-G humana, una secuencia que abarca la transmembrana HLA-G fusionada con la secuencia de la etiqueta de la proteína V5 del virus 5 de simio, con una secuencia de inicio Kozak 5' y un par de codones de terminación 3', y sitios de restricción HindIII y XhoI.

30 Los fragmentos de polinucleótidos como se mencionó anteriormente tienen ventajosamente una secuencia de al menos 30 nucleótidos y son más cortos que su secuencia de origen.

35 De acuerdo con un aspecto particular, los polinucleótidos también pueden comprender una o más secuencias que codifican uno o más péptido(s) marcador(es) para detectar y/o facilitar la purificación de dicha proteína.

40 La divulgación también describe un vector para la clonación y/o para la expresión de un polinucleótido divulgado en el presente documento, especialmente un plásmido adecuado para clonar y/o expresar en células de mamífero, especialmente una célula murina o una línea celular. De acuerdo con un aspecto particular de la divulgación, se pueden agregar secuencias de regulación para la transcripción y expresión. Según un aspecto particular la divulgación describe, un vector adecuado para la inmunización con ADN, tal como se detalla a continuación.

La divulgación describe además células o líneas celulares recombinadas con un polinucleótido, especialmente una célula de mamífero, especialmente una célula murina o una línea celular.

45 De acuerdo con un aspecto particular, los polinucleótidos y vectores que se divulgan en el presente documento son adecuados para la implementación de un protocolo de inmunización con ADN (también denominado vacuna de ADN en el presente documento) en un mamífero, en particular, un ser humano o un roedor. Tal protocolo se puede usar con el propósito de producir anticuerpos (especialmente cuando el hospedador no es humano), o con fines terapéuticos, como se detalla adicionalmente a continuación.

50 Por "*inmunización con ADN*" o "*vacuna de ADN*", se hace referencia a la técnica de administración directa en las células de un hospedador vivo de una molécula de ácido nucleico genéticamente modificada que codifica al menos una porción de antígeno (también denominada vacuna de ácido nucleico o vacuna de ADN en el presente documento) para producir una respuesta inmunológica en dichas células. Las vacunas de ADN se conocen como vacunas de tercera generación y tienen la particularidad de utilizar la maquinaria celular del hospedador para expresar el(los) péptido(s) correspondiente(s) a la molécula de ácido nucleico administrada y/o lograr el efecto esperado, en particular, expresión de antígeno a nivel celular, y además efecto(s) inmunoterapéutico(s) a nivel celular o dentro del organismo hospedador.

60 Con este fin, la(s) molécula(s) de ácido nucleico administrada(s) generalmente se administran a través de medios adecuados para la expresión de dicha(s) molécula(s) de ácido nucleico por la(s) célula(s) transfectada(s) del hospedador, y generalmente son transportadas por plásmidos bacterianos (u otros vectores cuando sea apropiado) de modo que el ácido nucleico codificante es capaz de entrar en el núcleo de la(s) célula(s) transfectada(s) del hospedador para ver la(s) porción(es) de antígeno de la(s) molécula(s) administrada(s) de ácido nucleico expresada(s) para producir, a nivel celular, péptido(s) correspondiente(s) a dicha(s) porción(es) de antígeno. Las vacunas de ADN generalmente tienen la potencia para inducir una gama más amplia de tipos de respuesta inmunitaria dentro del(de)

los) organismo(s) a los que se administran, y se sabe que afectan a la conformación del péptido correspondiente a la(s) porción(es) de antígeno de la vacuna de ADN administrada.

Los vectores (en particular, los plásmidos) para las vacunas de ADN contienen al menos un ácido nucleico que codifica una porción de antígeno, especialmente, el dominio $\alpha 3$ de la proteína HLA-G según la presente invención. La construcción de plásmidos bacterianos para la(s) vacuna(s) de ADN es comúnmente conocida y realizada mediante técnicas de ADN recombinante. Los vectores (y en particular los plásmidos) para las vacunas de ADN pueden requerir la presencia de cualquiera de las siguientes características, tales como: (1) un promotor para la expresión óptima en células de mamífero, (2) un marcador de selección, (3) secuencias de poliadenilación (poliA), (4) inclusión de secuencia(s) de intrones. El vector utilizado también se puede optimizar para la transcripción en la(s) célula(s) hospedador(as). La construcción de vectores para vacunas de ADN se conoce en la técnica. Se hace referencia, por ejemplo, a Petrovsky et al. (Expert Rev Vaccines, febrero de 2012; 11(2): 189-209), para más detalles.

Varios métodos de suministro para vacunas de ADN están comúnmente disponibles, tales como:

- inyección intramuscular (IM) o intradérmica (ID) (con aguja) de la vacuna de ADN en solución salina, que suministra el ADN a los espacios extracelulares. Este método puede ser asistido por "electroporación", que utiliza la estimulación eléctrica de tejidos biológicos para permeabilizar transitoriamente la(s) membrana(s) de la(s) célula(s);
- "suministro de pistola génica", que implica bombardear la piel con partículas de oro recubiertas de plásmido mediante el uso de dispositivos balísticos, que permite el suministro de ADN directamente al citoplasma de la(s) célula(s);
- suministro a través de "sistemas de suministro sin aguja", que permite rociar el ADN plasmídico a través de la piel, por ejemplo, a través de un dispositivo como el dispositivo Biojector™;
- "administración tópica" en solución acuosa, en particular, en los tejidos de la mucosa,

Todos estos métodos son comúnmente conocidos por los expertos en la materia en el campo, y están abarcados por la presente divulgación. Se pueden usar adecuadamente en el contexto de la invención, de acuerdo con el conocimiento del experto en la materia. Se hace referencia a Petrovsky et al. (Expert Rev Vaccines, febrero de 2012; 11 (2): 189-209), para más detalles.

Se pueden usar adyuvantes cuando se realiza la inmunización con ADN. También pueden ayudar a modular la respuesta inmunitaria que se busca. Adyuvantes tradicionales, que actúan como estimuladores inmunitarios o sistemas de suministro de antígenos, o ambos, abarcan, por ejemplo, alumbre, polisacáridos, liposomas, nanopartículas basadas en polímeros biodegradables, lipopolisacáridos. Los adyuvantes codificados por plásmidos abarcan citocinas (como IL-2, IL-12, IFN- γ , GM-CSF, IL-15), Motivos de CpG encontrados en el esqueleto del plásmido, quimiocinas, entre otras. Se hace referencia a Petrovsky et al. (Expert Rev Vaccines, febrero de 2012; 11(2): 189-209), para más detalles.

Por el contrario, "inmunización o vacuna de ADN desnudo" se refiere a la inmunización o vacuna de ADN realizada en ausencia de adyuvante(s), que es una realización también abarcada dentro de la presente invención.

De acuerdo con un aspecto particular, la divulgación usa un polipéptido, que:

- a. tiene una secuencia de aminoácidos que tiene la SEQ ID NO: 1 o 2,
- b. tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 %, preferentemente al menos un 90 %, más preferentemente al menos un 95 %, y lo más preferentemente al menos un 98 % o 99 % de identidad en toda su longitud con la secuencia de aminoácidos que tiene la SEQ ID NO: 1 o 2,
- c. es un fragmento de a. o b adecuado para provocar una respuesta inmunitaria en un hospedador, ya sea una respuesta de linfocitos T y/o linfocitos B.

La secuencia divulgada en la SEQ ID NO: 2 abarca una secuencia enlazadora de 12 aminoácidos aguas arriba de la secuencia polipeptídica del dominio $\alpha 3$ de HLA-G humana, sirviendo para facilitar la dimerización del polipéptido correspondiente. Sin embargo, los inventores no consideran que este enlazador tenga una función particular con respecto al objetivo alcanzado por la presente invención, en relación con la obtención de anticuerpos.

Se proporcionan ejemplos específicos de polipéptido(s) en la sección de Resultados en el presente documento, cuando se realiza la inmunización con una secuencia de polipéptidos.

La divulgación también se refiere a una composición que comprende como principio activo un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo o una molécula quimérica como se divulga en el presente documento, con un vehículo farmacéutico tal como un excipiente, en el que dicha composición farmacéutica opcionalmente comprende otro principio activo adicional diferente.

"Principio activo" se refiere a un ingrediente responsable del efecto biológico producido. En una realización particular,

dicho principio activo también posee una(s) propiedad(es) adyuvante(s).

De acuerdo con la divulgación, una composición que comprende como principio activo, un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo o un suero policlonal como se reivindica en el presente documento puede usarse como medicamento o como principio activo de un medicamento, en particular, para su uso como vacuna inmunoterapéutica.

La divulgación describe una composición que comprende como principio activo, un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo o una molécula quimérica:

- a. para su uso en un hospedador que lo necesite, en particular, un paciente humano, para interferir con y, en particular, neutralizar la regulación inmunitaria a la baja debido a las proteínas HLA-G, y/o;
- b. para su uso en un hospedador que lo necesite, en particular, un paciente humano, para mejorar o tratar afecciones que muestran lesiones HLA-G+, es decir, condiciones en las que HLA-G o de las vías asociadas con HLA-G se emplean disfuncionalmente en células de dicho hospedador, en particular, para favorecer el desarrollo de dicha afección o de una enfermedad, y/o;
- c. para su uso en un hospedador que lo necesite, en particular, un paciente humano, para mejorar o tratar una afección o enfermedad neoplásica, en particular, una enfermedad cancerosa, en particular, una afección o enfermedad que muestra lesiones de HLA-G+, es decir, una afección o enfermedad en la que HLA-G o de las vías asociadas con HLA-G se emplean disfuncionalmente en células de dicho hospedador, en particular, para favorecer el desarrollo de dicha afección o enfermedad.

Los efectos de la regulación inmunitaria a la baja debido a las proteínas HLA-G se divulgan anteriormente, dicha regulación inmunitaria a la baja es generalmente el mecanismo responsable del comportamiento de "escape tumoral" en los hospedadores que presentan tal afección. Sin embargo, el concepto de regulación inmunitaria a la baja debido a las proteínas HLA-G es intrínseco al papel de las proteínas HLA-G en un cuerpo vivo y, por lo tanto, se puede encontrar en cualquier tipo de estado de salud.

Por lo tanto, el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo o una molécula quimérica divulgada o una composición como se divulga en el presente documento puede usarse como medicamento, en particular, puede usarse como vacuna (provocación de una respuesta inmunitaria), en cualquier hospedador que exprese proteínas HLA-G.

"Hospedador" se refiere a un animal, especialmente un mamífero, pero también a un ser humano.

"Tratar" significa curar, revertir, atenuar, aliviar, minimizar, suprimir o detener los efectos de la afección o enfermedad para la que se busca un tratamiento.

"Medicamento" o "vacuna", se refiere a medios apropiados para tratar un hospedador, tal como se ha descrito anteriormente, en particular, provocando una reacción inmunitaria en dicho hospedador que conduce a la producción de anticuerpos en dicho hospedador.

Sin embargo, según un aspecto particular divulgado, el uso de una composición de la invención que comprende como principio activo, un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo o una molécula quimérica divulgada o una composición como se divulga en el presente documento, en un hospedador que lo necesite, se realiza en combinación con otro método de tratamiento de organismos vivos, tal como, pero no exhaustivamente, tratamiento de quimioterapia, tratamiento de radioterapia o similar.

La presencia de "lesiones de HLA-G+" depende de la afección o enfermedad de la que está sufriendo el hospedador que necesita una respuesta contra HLA-G. "Lesiones de HLA-G+" se refiere al hecho de que la función de HLA-G o las vías asociadas se pueden encontrar disfuncionalmente empleadas en el contexto de una enfermedad específica, favoreciendo notablemente el desarrollo de dicha enfermedad.

Por lo tanto, una composición que comprende como principio activo, un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo o composición divulgada que comprende como principio activo una molécula quimérica como se divulga en el presente documento puede usarse para dirigir e interferir a nivel celular con la función de HLA-G o las vías asociadas en un hospedador que lo necesite, cuando las proteínas HLA-G se encuentran expresadas por el hospedador bajo un estado de salud o afección particular.

Ejemplos no limitativos de afecciones que pueden presentar lesiones de HLA-G+ son infecciones virales como la infección por VIH, infección por el virus de la rabia o infección por el virus de la hepatitis B, enfermedades autoinmunitarias que implican células inmunitarias que expresan HLA-G con un dominio $\alpha 3$, notablemente inflamaciones crónicas o tumores malignos.

Ejemplos no limitativos de enfermedades cancerosas o enfermedades neoplásicas, notablemente presentando lesiones de HLA-G+ son leucemia, carcinoma de células basales, cáncer de vejiga, cáncer de mama, mesotelioma maligno, queratosis actínica, melanoma cutáneo, carcinoma renal de células claras, retinoblastoma, carcinoma de células espinosas, carcinoma in situ, cáncer colorrectal, carcinoma ovárico, linfoma cutáneo de linfocitos T,

adenocarcinoma endometrial, linfoma de Hodgkin clásico, carcinoma de pulmón, linfoma cutáneo de linfocitos B, cáncer gástrico, cáncer ampular, cáncer biliar, adenocarcinoma ductal pancreático, carcinoma de células escamosas esofágicas, molas hidatiformes.

- 5 Las "lesiones de HLA-G+" pueden estar presentes en menos o más del 30 % de las células disfuncionales presentes en el hospedador. Sin embargo, según una realización particular, un mínimo del 10 % de las células que presentan lesiones de HLA-G+ es suficiente para calificar la enfermedad como presentando "lesiones de HLA-G+".

10 La divulgación también describe un método de producción de un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que comprende:

- 15 a. Administrar a un animal no humano, un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 o 2, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 %, preferentemente al menos un 90 %, más preferentemente al menos un 95 %, y lo más preferentemente al menos un 98 % o 99 % de identidad en toda su longitud con la secuencia de aminoácidos que tiene la SEQ ID NO: 1 o 2 o que administra ácido(s) nucleico(s) como se divulga en el presente documento, en particular, una molécula de ácido nucleico que comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 9 o derivada de esta secuencia, o fragmentos inmunogénicos de la misma, o un vector que comprende o consiste en una molécula de ácido nucleico que comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 9 o derivada de esta secuencia, o fragmentos inmunogénicos de la misma, en particular, un vector como se divulga o se describe en el presente documento, y,
- 20 b. Recuperar de suero o muestras de plasma obtenidas de los animales los anticuerpos suscitados y verificar su especificidad para el dominio α_3 de la proteína HLA-G, y;
- 25 c. Opcionalmente, clonar los anticuerpos recuperados, y
- d. Opcionalmente, preparar fragmentos de unión al antígeno a partir de los anticuerpos recuperados.

30 La administración, recuperación de anticuerpos generados o fragmentos de unión al antígeno y la posterior clonación se pueden lograr mediante métodos convencionales en la técnica. Los métodos de caracterización previos a la clonación utilizando ejemplos avanzados de secuenciación también son bien conocidos en la técnica.

En un aspecto particular del método divulgado, la etapa a. no se reivindica y la etapa b. se realiza en una muestra obtenida previamente de un animal que recibió el componente como se define en la etapa a.

35 La preparación de fragmentos de unión al antígeno a partir de los anticuerpos recuperados también se puede lograr a través de métodos convencionales en la técnica, en particular, a través de tecnologías de síntesis de alto rendimiento.

Los animales hospedadores para la producción de anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno pueden ser mamíferos con exclusión del ser humano, especialmente, roedores, en particular, ratones.

40 De acuerdo con un aspecto particular, el método de producción divulgado en el presente documento también implica una etapa de sacrificar los animales hospedadores utilizados para la producción de los anticuerpos de la invención.

45 De acuerdo con un aspecto particular, el método divulgado de producción de un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo abarca la administración concomitante, en la etapa a., de un adyuvante, este último se define como cualquier ingrediente, en particular compuesto, que actúa para ayudar, acelerar, prolongar o mejorar las respuestas inmunitarias específicas de antígeno cuando se usa en combinación con un(os) antígeno(s) administrado(s) o fragmento(s) de antígeno inmunogénico. Los adyuvantes son bien conocidos en la técnica de la inmunización (o vacunación) y la inmunoterapia.

50 Como se dijo antes, con respecto a los aspectos relacionados con la inmunización con ADN, los adyuvantes pueden integrarse en los vectores (o plásmidos) utilizados para la inmunización con ADN.

55 Por "*fragmento inmunogénico*", se entiende un fragmento que retiene la capacidad de inducir una respuesta inmunitaria en el animal hospedador administrado con dicho fragmento, con el fin de permitir la producción de anticuerpos como se divulga en el presente documento.

60 Según un aspecto particular divulgado, la administración de acuerdo con la etapa a. del método divulgado anteriormente se realiza usando un protocolo de inmunización de refuerzo primaria que implica una primera administración (inmunización primaria o administración primaria) de agentes inmunogénicos activos, y luego al menos una administración adicional (inmunización de refuerzo o administración de refuerzo) que se separa en el tiempo desde la primera administración en el curso del protocolo de inmunización. Las inmunizaciones de refuerzo abarcan una, dos, tres o más administraciones.

65 En un aspecto particular, el protocolo de inmunización de refuerzo primaria utilizado es un protocolo de inmunización homólogo o heterólogo, lo que significa que los principios activos, inmunogénicos, administrados (por ejemplo, anticuerpos o fragmentos) son respectivamente los mismos en las administraciones primaria y de refuerzo, o

diferentes.

En un aspecto particular, la administración de principios activos, inmunogénicos, en la etapa a. del método mencionado anteriormente, incluso cuando se realiza una administración primaria y/o cuando se realiza una inmunización de refuerzo, se hace concomitantemente con un adyuvante, por ejemplo, un adyuvante de Freund. Los adyuvantes son sustancias bien conocidas en la técnica.

En un aspecto específico divulgado, la administración de adyuvantes se realiza tanto en inmunizaciones primarias como de refuerzo, en particular, cuando se usan polipéptidos o fragmentos inmunogénicos de los mismos para la inmunización.

Los detalles de un protocolo de inmunización que puede usarse tal cual o servir como base para diseñar un protocolo de inmunización destinado a producir anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos usando inmunización con ADN se proporcionan en la sección de ejemplos a continuación. También se puede hacer referencia al Capítulo 40 de *Electroporation Protocols: Preclinical and Clinical Gene Medicine de Methods in Molecular Biology*, vol. 423, páginas 509-520, por C.K. Yan et al. Ejemplos de período de tiempo restante entre una inmunización primaria y una inmunización de refuerzo, o administraciones de refuerzo posteriores, se dan en la sección Material y Métodos en el presente documento, así como en el Capítulo citado anteriormente o en la bibliografía.

La presente invención se basa en experimentos realizados usando inmunización con proteínas e inmunización con ADN, como se ilustra en la sección Resultados en el presente documento. Se llevó a cabo una inmunización con proteínas ilustrativa usando un polipéptido que tenía la secuencia de polipéptidos SEQ ID NO: 2. Se llevaron a cabo inmunizaciones de ADN ilustrativas usando un plásmido que comprende la secuencia de nucleótidos divulgada en la SEQ ID NO: 6. Como se ilustra a continuación, la SEQ ID NO: 2 abarca dos restos de aminoácidos después de la secuencia enlazadora, a saber, los restos R y A, pertenecientes al extremo del dominio $\alpha 2$ de HLA-G, de acuerdo con las definiciones proporcionadas en el presente documento, así como dos restos de aminoácidos después de la porción del dominio $\alpha 3$, que pertenecen a un dominio de anclaje transmembrana. En la bibliografía, por ejemplo, en McCluskey et al. (PNAS 2005, vol.102, n.º 9, 3360-3365 *Crystal structure of HLA-G: A nonclassical MHC class I molecule expressed at the fetal-maternal interface*), Sin embargo, los dos restos de aminoácidos R y A discutidos anteriormente pueden considerarse como pertenecientes al dominio $\alpha 3$ de HLA-G. Por lo tanto, la definición del dominio $\alpha 3$ de HLA-G puede depender ligeramente de las anotaciones consideradas en la bibliografía, pero no por más de unos pocos restos de aminoácidos. Además, los inventores determinaron que los anticuerpos se originaron contra la porción $\alpha 3$ del polipéptido como se define en el presente documento. SEQ ID NO: 6, como se detalla a continuación, también abarca, además de una porción que codifica el dominio $\alpha 3$ de HLA-G como se define en el presente documento, varias bases de nucleótidos que pertenecen al péptido señal encontrado en el exón 1 de HLA-G, o al final del dominio $\alpha 2$ de HLA-G, o un ancla transmembrana. Sin embargo, los inventores determinaron que, dentro de las condiciones de los experimentos realizados, los anticuerpos se generaron específicamente contra el dominio $\alpha 3$ de HLA-G como se define en el presente documento.

La divulgación también describe un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo obtenible u obtenido por el método de producción como se ha divulgado anteriormente.

La divulgación también describe un suero policlonal obtenido de la implementación de la etapa a. del método descrito anteriormente.

De acuerdo con un aspecto particular, dicho anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo obtenible u obtenido por el método de producción como se divulga anteriormente o suero policlonal obtenido de la implementación de la etapa a. del método divulgado anteriormente se obtienen mediante inmunización con ADN de un hospedador, en particular, un mamífero como un roedor, como se describe en el presente documento.

La invención también se refiere a una composición inmunogénica que comprende o que consiste en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 9 y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde dicha composición inmunogénica comprende opcionalmente un principio activo y/o adyuvante adicional, diferente. La divulgación también describe una composición inmunogénica que comprende una molécula de ácido nucleico derivada de la secuencia de la SEQ ID NO:9, o un polipéptido que (i) tiene una secuencia de aminoácidos que tiene la SEQ ID NO: 1 o 2, o (ii) tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 %, preferentemente al menos un 90 %, más preferentemente al menos un 95 %, y lo más preferentemente al menos un 98 % o 99 % de identidad en toda su longitud con la secuencia de aminoácidos que tiene la SEQ ID NO: 1 o 2, o (iii) un fragmento de (i) o (ii) y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde dicha composición inmunogénica comprende opcionalmente un principio activo y/o adyuvante adicional, diferente, como ya se definió en el presente documento.

La invención también se refiere a una molécula de ácido nucleico que comprende o que consiste en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 9 para su uso como medicamento, en particular, para su uso como vacuna en un mamífero, en particular, de un ser humano.

La divulgación también describe moléculas de ácido nucleico, vectores, células o composiciones, incluyendo una

molécula de ácido nucleico que comprende o que consiste en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 9, o a un polipéptido que (i) tiene una secuencia de aminoácidos que tiene SEQ ID NO: 1 o 2, o (ii) tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 %, preferentemente al menos un 90 %, más preferentemente al menos un 95 %, y lo más preferentemente al menos un 98 % o 99 % de identidad en toda su longitud con la secuencia de aminoácidos que tiene SEQ ID NO: 1 o 2, o (iii) un fragmento de (i) o (ii):

- para su uso como medicamento, en particular, para su uso como vacuna terapéutica, en un mamífero, en particular, un ser humano, especialmente como una vacuna de ADN, en particular para su uso como una vacuna de ADN desnudo, y/o;
- para su uso para provocar, en particular, en un hospedador como un mamífero, en particular, un ser humano o un roedor, una respuesta inmunitaria contra el dominio $\alpha 3$ de la proteína HLA-G y producir anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de la misma que se une específicamente al dominio $\alpha 3$ de la proteína HLA-G, como se divulga en la presente invención.

Estas moléculas de ácido nucleico, vectores, células divulgadas o composiciones de acuerdo con la invención a las que se hace referencia anteriormente pueden usarse para provocar una respuesta inmunitaria en un hospedador mamífero, en particular, un ser humano, a través de un protocolo de inmunización de refuerzo primario, especialmente un protocolo de inmunización de refuerzo primario que se ayuda en las administraciones primarias o en las administraciones de refuerzo, o en ambas. Estas moléculas de ácido nucleico, vectores, células divulgadas o composiciones de acuerdo con la invención mencionadas anteriormente también pueden usarse para provocar una respuesta inmunitaria en un hospedador mamífero, en particular, un ser humano, a través de un protocolo de inmunización heterólogo.

También, las moléculas de ácido nucleico, vectores, células divulgadas o composiciones como se describen en el presente documento, pueden usarse como medicamento, en particular, pueden usarse como vacuna (provocación de una respuesta inmunitaria), en cualquier hospedador que exprese proteínas HLA-G.

Se puede ver a partir de lo anterior que la presente invención tal como se define por las reivindicaciones y los medios divulgados en el presente documento son adecuados en un contexto de inmunoterapia(s), en particular, enfermedades neoplásicas o inmunoterapia(s) contra el cáncer. La inmunoterapia se define como el tratamiento de una enfermedad al inducir o mejorar una respuesta inmunitaria. La presente invención, tal como se define por las reivindicaciones, es particularmente relevante para ayudar a la eliminación del mecanismo de escape tumoral implicado en algunas enfermedades neoplásicas o cánceres.

La divulgación describe un método para tratar una afección o enfermedad en la que están implicadas las vías asociadas con HLA-G, de acuerdo con todos los aspectos descritos en el presente documento, que comprenden una etapa de administrar anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos descritos en el presente documento, o suero policlonal que comprende los mismos, moléculas quiméricas como se describe en el presente documento, moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento, vectores o células divulgadas o composiciones, incluyendo composiciones inmunogénicas en un hospedador que lo necesita, por referencia a las declaraciones proporcionadas en el presente documento, para fines profilácticos o terapéuticos o de vacunación, tal como se desarrolla en el presente documento.

La divulgación también describe un método *in vitro* para detectar la proteína HLA-G en una muestra y/o monitorear o diagnosticar un estado de salud o afección patológica a través del análisis de una muestra obtenida previamente de un paciente susceptible de presentar un estado de salud específico o de tener una afección patológica, en particular, una afección neoplásica, comprendiendo dicho método:

- a. Contactar, en condiciones que permiten la formación de complejos inmunitarios, la muestra con anticuerpos o fragmento de unión al antígeno de los mismos o una molécula quimérica como se divulga en el presente documento, y
- b. detectar *in vitro* los complejos inmunitarios resultantes formados entre dichos anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos y la proteína HLA-G, como se divulga en el presente documento.

Según un aspecto particular divulgado, la presente divulgación permite la detección *in vitro* de proteína HLA-G en una muestra, por ejemplo, una muestra obtenida previamente de una paciente susceptible de estar embarazada, o una muestra obtenida de un paciente que ha sido sometido a trasplante(s) de órganos, tejidos o células. Como resultado, se puede realizar el monitoreo de un estado de salud, es decir, un estado fisiológico que no implica necesariamente la presencia de una afección patológica. Por lo tanto, también se puede realizar un diagnóstico posterior de la presencia o ausencia de una afección patológica.

Cuando la muestra se ha obtenido previamente de un paciente susceptible de presentar una afección patológica, también se puede realizar un seguimiento o diagnóstico posterior de dicha afección patológica. En un aspecto particular, las condiciones patológicas a las que se hace referencia son las divulgadas anteriormente.

De acuerdo con un aspecto particular de la divulgación, el anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo,

que reconocen las isoformas de la proteína HLA-G libre de $\beta 2M$, son de particular interés para fines de detección o diagnóstico.

5 La divulgación también describe un kit para un método de ensayo o diagnóstico *in vitro* como se ha divulgado anteriormente, comprendiendo dicho kit:

- a. Al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en: un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo o una molécula quimérica como se divulga en el presente documento,
- 10 b. Reactivo(s) apropiado(s) para la formación de complejos inmunitarios entre al menos un compuesto listado en a. y la muestra a analizar;
- c. Opcionalmente, reactivo(s) apropiado(s) para detectar la formación de los complejos inmunitarios de la etapa b.

15 Otros ejemplos y características de la divulgación serán evidentes al leer los resultados obtenidos por los inventores y las figuras, que ilustran los experimentos realizados por los inventores, en complemento a las características y definiciones dadas en la presente descripción.

Leyendas de las figuras

20 Figura 1: Isoformas de la proteína HLA-G

Figura 2: Estructura general del complejo LILRB2 de HLA-G

25 Figura 3: Expresión de HLA-G en lesiones tumorales

Figura 4: Experimentos *in vivo*: sin efecto tolerogénico de moléculas α_3 y $(\alpha_3)_2$ después del aloinjerto de piel en ratones

30 Figura 5: Detalle de construcciones de proteínas HLA-G de dominio α_3 (SEQ ID NO: 12)

Figura 6: Principio del método Luminex para detectar la unión específica de la proteína HLA-G de dominio α_3 por anticuerpos anti-HLA-G

35 Figura 7: Anticuerpos de proteína anti-HLA-G de dominio α_3 detectados en plasmas de ratones transgénicos C57Bl/6J HLA-B*0702 inmunizados con proteína después del 4º refuerzo mediante (A) ELISA, (B) microesferas Luminex y (C) ensayo de transferencia por ranuras.

40 Figura 8: Anticuerpos de proteína anti-HLA-G de dominio α_3 en plasmas de ratones Balb/c inmunizados con ADN después del segundo refuerzo (4 semanas) detectado (A) por microesferas Luminex y (B) por ensayo de transferencia por ranuras

45 Figura 9: Anticuerpos de proteína anti-HLA-G de dominio α_3 en plasmas de ratones C57Bl/6J inmunizados con ADN después del segundo refuerzo (3 semanas) detectados (A) por microesferas Luminex y (B) por ensayo de transferencia por ranuras

50 Figura 10: Ninguna vacuna de ADN HLA-G- α_3 : $2 \cdot 10^6$ M8-pcDNA o M8-HLA-G1 se implantaron por vía subcutánea en ratones Balb/c (M8-pcDNA: Melanoma humano transfectado con plásmido de control pcDNA 3.1; M8-HLA-G1: Melanoma humano transfectado con plásmido pcDNA 3.1 que contiene la secuencia de HLA-G1). Se traza el volumen tumoral de acuerdo con la concentración de melanoma humano. No se detectaron anticuerpos contra el dominio α_3 de HLA-G-en ratones no inmunizados monitorizados antes del desafío tumoral.

55 Figura 11: Vacuna de ADN HLA-G- α_3 : $2 \cdot 10^6$ M8-pcDNA o M8-HLA-G1 se implantaron por vía subcutánea en ratones Balb/c (M8-pcDNA: Melanoma humano transfectado con plásmido de control pcDNA 3.1; M8-HLA-G1: Melanoma humano transfectado con plásmido pcDNA 3.1 que contiene la secuencia de HLA-G1). Como se describe en la sección Materiales y métodos, los ratones Balb/c se inmunizaron 4 veces con ADN de HLA-G- α_3 . La inducción de anticuerpos contra el dominio HLA-G- α_3 se controló antes del desafío tumoral: todos los ratones Balb/c generaron anticuerpos anti-HLA-G- α_3 después de la inmunización con ADN. Se traza el volumen tumoral de acuerdo con la concentración de melanoma humano.

60 MATERIALES Y MÉTODOS

SEQ ID NO: 1: Secuencia de proteína HLA-Galfa3 o HLA-G α_3

ES 2 786 049 T3

DPPKTHVTHHPVFDYEATLRCWALGFYPAEIILTWQRDGEDQTQDVELVETRPAGDGTQK
WAAVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLMLRW

5 SEQ ID NO: 1 se basa en la divulgación encontrada en McCluskey et al. (PNAS 2005, vol.102, n.º 9, 3360-3365 *Crystal structure of HLA-G: A nonclassical MHC class I molecule expressed at the fetal-maternal interface*), y/o derivada de la proteína humana completa HLA-G como se encuentra en la bibliografía o con el número de acceso NM_002127.5, denominada SEQ ID NO: 4 en el presente documento.

SEQ ID NO: 4:

MVVMAPRTLFLLLSGALTLETWAGSHSMRYFSAAVSRPGRGEPFIAMGYVDDTQFVRFD
SDSACPRMEPRAPWVEQEGPEYWEETRNKKAHAQTDRMNLTLRGYYNQSEASSHTLQWMI
GCDLGS DGRLLRGYEQYAYDGKDYALNEDLRSWTAADTAAQISKRKCEANVAEQRRAYL
EGTCVEWLHRYLENGKEMLQRADPPKTHVTHHPVFDYEATLRCWALGFYPAEIILTWQRD
EDQTQDVELVETRPAGDGTQKWAAVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLMLRWKQSSLPTI
PIMGIVAGLVVLAAVVTGAAVA AVLWRKKSSD

10

La secuencia de ácido nucleico "natural", es decir, no diseñada por ingeniería o encontrada naturalmente en organismos vivos, que codifica una secuencia de polipéptidos del dominio HLA-Gα3 se puede encontrar en la secuencia divulgada con el número de acceso NM_002127.5, entre las posiciones 797 y 1072 (276 pb), y se denomina SEQ ID NO: 9 en el presente documento.

15

SEQ ID NO: 9

gaccccccaagacacacgtgaccaccaccctgtctttgactatgaggccaccctgaggt
gctgggacctgggcttctacctgacgatcatactgacctggcagcgggatggggagga
ccagaccaggacgtggagctcgtggagaccaggcctgcaggggatggaacctccagaag
tgggcagctgtggtggtgccttctggagaggagcagagatacacgtgccatgtgcagcatg
aggggctgccggagccctcatgctgagatgg

20

Un ejemplo de una secuencia de ácido nucleico optimizada, que se considera optimizada en comparación con la SEQ ID NO: 9 definida en el presente documento, y que codifica una secuencia de polipéptido del dominio HLA-Gα3, se divulga y se hace referencia como SEQ ID NO: 10 en el presente documento.

gaccccccaaaacctatgtgaccaccaccagctctttgactatgaagctacactgagat
gttgggacctgggcttctacctgcagagatcatcctgacctggcagcgcgacggagaaga
tcagacacaggacgtcgagctcgtggaaccggcctgctggtgatggcacatccagaag
tgggcccggctggtggttccatccggtgaggaacagcgtacacttgccatgtgcagcacg
agggcttgccctgagcctcttatgcttcgggtgg

25

La secuencia nucleica completa de HLA-G humana divulgada con el número de acceso NM_002127.5 se divulga en el presente documento como SEQ ID NO: 5:

agtgtggtac tttgtcttga ggagatgtcc tggactcaca cggaaactta gggctacgga
atgaagtctt cactcccatt aggtgacagg tttttagaga agccaatcag cgtcgccgcg
gtcctggttc taaagtcttc gctcaccac cggactcat tctcccaga cgccaaggat
ggtggtcatg gcgccccgaa ccctcttctt gctgctctcg ggggacctga ccctgaccga
gacctgggcg ggctcccact ccatgaggta tttcagcgcc gccgtgtccc ggccccggcg
cggggagccc cgcttcatcg ccatgggcta cgtggacgac acgcagttcg tgcggttcga
cagcgactcg gcgtgtccga ggatggagcc gcgggcccgc tgggtggagc aggaggggccc
ggagtattgg gaagaggaga cacggaacac caaggcccac gcacagactg acagaatgaa
cctgcagacc ctgcgcggtt actacaacca gagcgaggcc agttctcaca ccctccagtg

gatgattggc tgcgacctgg ggtccgacgg acgcctcctc cgcgggtatg aacagtatgc
ctacgatggc aaggattacc tcgcccctgaa cgaggacctg cgctcctgga cgcagcggga
cactgcccgt cagatctcca agcgcgaagtg tgaggcggcc aatgtggctg aacaaggag
agcctacctg gagggcacgt gcgtggagtg gctccacaga tacctggaga acgggaagga
gatgctgcag cgcgcccacc ccccccaagac acacgtgacc caccacctg tctttgacta
tgaggccacc ctgaggtgct gggcccctggg cttctaccct gcggagatca tactgacctg
gcagcgggat ggggaggacc agaccagga cgtggagctc gtggagacca ggctgcagg
ggatggaacc ttccagaagt gggcagctgt ggtggtgcct tctggagagg agcagagata
cacgtgccat gtgcagcatg aggggctgcc ggagcccctc atgctgagat ggaagcagtc
ttccctgcc accatcccc tcatgggtat cgttctgctgc ctggttctcc ttgcagctgt
agtcactgga gctgcggctg ctgctgtgct gtggagaaa aagagctcag attgaaaagg
aggagctac tctcaggctg caatgtgaaa cagctgccct gtgtgggact gagtggcaag
tccctttgtg acttcaagaa ccctgactcc tctttgtgca gagaccagcc caccctgtg
cccacatga ccctcttct catgctgaac tgcattcctt ccccaatcac ctttctgtt
ccagaaaagg ggctgggatg tctccgtctc tgtctcaaat ttgtgttcca ctgagctata
actacttct gtattaaaat tagaatctga gtataaattt actttttcaa attatttcca
agagagattg atgggttaat taaaggagaa gattcctgaa atttgagaga caaataaat
ggaagacatg agaacttt

5 *Agentes inmunizantes*

Inmunización con proteínas

10 El dominio α_3 de HLA-G utilizado para la inmunización con proteínas se produjo por síntesis química (Patente: WO 2010/150233). Esta proteína está compuesta por 108 aminoácidos, de peso molecular 11957 Da, y está compuesta por la siguiente secuencia de proteína (SEQ ID NO: 2), para la cual los primeros 12 aminoácidos contienen una secuencia enlazadora (SEQ ID NO: 3):

GCGGGGSGGGGSRADPPKTHVTHHPVF**D**Y**EATL**R**CWALGFYPAEIILTWQRDGEDQTQDVE**
LVETRPAGDGT**F**QKWA^{AVVV}PSGEEQRYT**C**HVQHEGLPEPLMLRWKQ

15

SEQ ID NO: 3: GCGGGGSGGGG

Inmunización con ADN

5 Para la inmunización con ADN, la secuencia del dominio α_3 se fusionó con la secuencia de etiqueta de proteína V5 del virus 5 de simio, el conjunto se clonó en el vector plasmídico pcDNA 3.1 (+) (Invitrogen) por los sitios de restricción HindIII y XhoI (subrayados). La secuencia de nucleótidos utilizada es (SEQ ID NO: 6):

5' AAGCTTGCCGCCAtggtcgttatggcaccaggaccttgttcctcctgctctctggagc
 actgacccttactgagacatgggccc**agtagagcc**gacccccccaaaacccatgtgaccac
 caccagtccttgactatgaagctacactgagatggtgggcctgggcttctaccccgag
 agatcatcctgacctggcagcgcgacggagaagatcagacacaggacgtcgagctcgtgga
 aaccggcctgctggtgatggcacatttcagaagtgggcccgcgtggtggttccatccggt
 gaggaacagcgtacacttgccatgtgcagcagaggcctgcctgagcctcttatgcttc
 ggtgg**aagcagtcacccctgccaaactattcccatcatgggcattgtggccggactggtggt**
tctggcagctgtggtgactggcgctgccgtcgccgctgtcctctggaggaaaaagagcagc
gatggcaagccaattcctaattcattgctgggcctggactcaacttgaTGATAACTCGAG
 3'

10 Leyenda para SEQ ID NO: 6:
 (SEQ ID NO: 7) GCCGCCAtg en la extremidad 5': secuencia Kozak 5'
Péptido señal como se encuentra en el exón 1 de HLA-G
 Nucleótidos que codifican aminoácidos añadidos
 Los nucleótidos que se encuentran en el extremo de la porción α_2 (alfa2) del dominio α_3 (alfa3) de HLA-G
 15 (correspondiente a la SEQ ID NO: 10)
Porción que codifica la proteína de anclaje transmembrana
 Secuencia de la etiqueta V5
 (SEQ ID NO: 8) tgaTGATAA en la extremidad 3': Codón de terminación 3'

20 La secuencia clonada en el vector plasmídico pcDNA 3.1 (+) entre GCCGCCA (SEQ ID NO: 7) y tgaTGATAA (SEQ ID NO: 8) tiene, por lo tanto, una longitud de 534 pb.

Los sitios HindIII y XhoI están subrayados, mientras que la secuencia V5 correspondiente a la etiqueta V5 del virus 5:de simio se muestra en cursiva, de acuerdo con la leyenda proporcionada anteriormente. El gen fue sintetizado por GeneCust después de la optimización del codón con respecto a la secuencia de ácido nucleico natural para eliminar los codones de baja abundancia.

Para los propósitos ilustrativos, la secuencia de proteínas (SEQ ID NO: 11) correspondiente a, es decir, codificada por, la secuencia de ácido nucleico elaborada para la inmunización con ADN se da a continuación. Dominios α_1 (alfa1) y α_2 (alfa2) se eliminaron dejando un péptido señal (también encontrado en la porción del exon1 de HLA-G), dos aminoácidos del extremo del dominio α_2 (alfa2), el dominio α_3 (alfa3) y una secuencia de anclaje transmembrana, como se anota abajo.

35 SEQ ID NO: 11

MVVMAPRTLFLLLSGALTLETWASRADPPKTHVTHHPVFDYEATLRCWALGFYPAEIILT
 WQRDGEDQTQDVELVETRPAGDGTfQKWAAVVVPsGEEQRYTCHVQHEGLPEPLMLRW**KQS**
SLPTIPIMGIVAGLVVLAAVVTGA~~AA~~AVLWR**KKSSD**GKPIPNPLLLGLDST

40 Leyenda para SEQ ID NO: 11:
Péptido señal como se encuentra en el exón 1 de HLA-G
 Aminoácidos añadidos
 Aminoácidos encontrados al final de la porción α_2 (alfa2) del dominio HLA-G α_3 (alfa3) (correspondiente a la SEQ ID

NO: 1)

Porción que codifica la proteína de anclaje transmembrana

Secuencia de la etiqueta V5

5 La secuencia de ácido nucleico divulgada en la SEQ ID NO: 6 no es la misma que en la base de datos en NM_002127.5 (SEQ ID NO: 5), especialmente entre las posiciones 797 y 1072 correspondientes a una porción que codifica un polipéptido que abarca el dominio $\alpha 3$ de la proteína HLA-G, así como en la porción que codifica una señal peptídica y un anclaje transmembrana. La mayoría de los codones se han cambiado con 12 codones que no se utilizan en absoluto. Esto se llama optimización de codones, según los métodos convencionales. El conjunto de reglas actual
10 elimina los ARNt y codones raros que se usan con poca frecuencia en el genoma humano, con poca frecuencia se define como < 10 %. En consecuencia, se eliminaron los siguientes codones: Leu TTA, Leu CTA, Ile ATA, Val GTA, Ser TCG, Pro CCG, Thr ACG, Ala GCG, Gln CAA, Arg CGT, Arg CGA y Gly GGG.

15 La correspondencia entre la secuencia nucleica "natural" de HLA-G y la secuencia de ácido nucleico optimizada utilizada para los experimentos en el presente documento se proporciona a continuación: La SEQ ID NO: 6 optimizada se representa con bases nucleotídicas interlineadas, que son las bases de nucleótidos encontradas en la secuencia nucleica "natural" de HLA-G.

AAGCTT GCCGCC
Atggtcgttatggcaccaggaccttggttcctcctgctctctggagcaactgaccottactga
g c g c a c c g g g c g c
gacatgggcccagtagagccgaccccccaaaacccatgtgaccaccaccaccagtctttgact
c g cgcgcg g a c t
atgaagctacactgagatggtgggcccctgggcttctaccccgcagagatcatcctgacctgg
g c c g c t g a
cagcgcgacggagaagatcagacacaggacgtcgagctcgtggaaacccggcctgctggtga
g t g g c c g t g a a g
tggcacatttcagaagtgggcccgcctggtggttccatccggtgaggaaacagcgcctacactt
a c c a t g t t a g a g a g
gccatgtgcagcagcagggccttgacctgagcctcttatgcttcggtgg**aagcagtcacccctg**
t g c g c c g a a t
ccaactattcccatcatgggcatgtggccgactggtggttctggcagctgtggtgactgg
c c c t c t t c t c t a c
cgctgccgtcgccgctgtcctctggaggaaaagagcagcgatggcaagccaattcctaatc
a g t g g a g tca
cattgctgggacctgactcaacttgaTGATAA CTCGAG

20 **Leyenda:**
Sitios de restricción HindIII y XhoI
(SEQ ID NO: 7) GCCGCCATg en la extremidad 5': secuencia Kozak 5'
Péptido señal como se encuentra en el exón 1 de HLA-G

25 Aminoácidos añadidos
Los nucleótidos que se encuentran en el extremo de la porción $\alpha 2$ (alfa2) del dominio $\alpha 3$ (alfa3) de HLA-G (correspondiente a la SEQ ID NO: 10)

Porción que codifica la proteína de anclaje transmembrana
Secuencia de la etiqueta V5
30 (SEQ ID NO: 8) tgaTGATAA en la extremidad 3': Codón de terminación 3'

Con respecto a la secuencia de nucleótidos que codifica para el dominio $\alpha 3$ (alfa3), 46 nucleótidos fueron modificados sobre los 276 nucleótidos de dicho dominio.

35 Como se dijo anteriormente, la secuencia de codificación estaba limitada en la extremidad 5' por una buena secuencia de inicio Kozak (GCCGCCATG (SEQ ID NO: 7), codón iniciador en negrita) y un par de codones de terminación en la extremidad 3' (TGATAA (SEQ ID NO: 8) en negrita), el conjunto está flanqueado por sitios de restricción 5' HindIII y 3' XhoI (subrayados). El inserto de ADN fue sintetizado por GeneCust y clonado en el vector de expresión pcDNA3.1 + a través de los sitios HindIII y XhoI.

40

La secuencia resultante se divulga bajo SEQ ID NO: 6, que codifica un péptido señal HLAG, el dominio α_3 de HLA-G humana, una secuencia que abarca la transmembrana HLA-G fusionada con la secuencia de la etiqueta de la proteína V5 del virus 5 de simio, con una secuencia de inicio Kozak 5' y un par de codones de terminación 3', y sitios de restricción HindIII y XhoI.

5 La producción de plásmidos, la transfección y la electroporación se realizaron utilizando técnicas estándar.

Ratones

10 Se usaron ratones transgénicos C57Bl/6J HLA-B*0702 criados en la instalación de animales del Institut Pasteur para la inmunización con proteínas (8 semanas de edad). Se obtuvieron ratones Balb/c y C57Bl/6J (8 semanas de edad) de Janvier Laboratories y se usaron para la inmunización con ADN. Los ratones se anestesiaron antes de la inmunización por vía intraperitoneal (IP) con una solución mixta de xilacina al 2 % (Bayer AG) y ketamina al 8 % (Imalgen 1000) en PBS de acuerdo con el peso individual del animal. Todos los animales se alojaron en la instalación de animales del Institut Pasteur y se manejaron de acuerdo con las buenas prácticas animales y de acuerdo con la Carta de Ética del Institut Pasteur.

Proteína HLA-G del dominio α_3 y protocolos de inmunización con ADN

20 La proteína del dominio α_3 (0,1 mg/ml) se disolvió en PBS1x y se emulsionó en volúmenes iguales de adyuvante de Freund completo (CFA, Sigma) para la inmunización primaria y con adyuvante de Freund incompleto (IFA, Sigma) para los siguientes refuerzos de inmunización. Se inmunizaron ratones transgénicos C57Bl/6J HLA-B*0702 cada dos semanas realizando la administración intradérmica (ID) de la proteína en el área dorsal después del afeitado, utilizando agujas de insulina específicas U-100. Los inventores usaron formas no dimerizadas de SEQ ID NO: 2 para la administración. La inmunización con ADN se realizó mediante electroporación intramuscular (IM) no invasiva. Los animales fueron afeitados y frotados asépticamente antes de la inmunización. El plásmido se administró en el músculo tibial craneal inferior, inyectando 50 μ l del ADN plasmídico (0,1 mg/ml disuelto en tampón PBS, Invitrogen) en cada pata. Las inmunizaciones de ADN se realizaron como sigue; la inmunización con ADN primaria fue seguida 2 semanas después por los refuerzos de inmunización con ADN realizados cada semana durante 3 semanas. Los ratones inmunizados se purgaron en el momento de los refuerzos de inmunización para controlar la presencia de anticuerpos dentro de los plasmas. Inmediatamente después de la inoculación, las patas se cubrieron con gel de ultrasonido y se aplicaron los electrodos de placa no invasivos para el sistema de administración del electroporador Agilepulse™ (BTX). Se aplicó un pulso único de 560 V por cm de espacio entre electrodos durante 50 ms con una frecuencia de 1 Hz, y los electrodos de placa estaban separados por 0,5 cm.

35 **Análisis de las muestras**

Los anticuerpos anti-HLA-G de dominio α_3 específicos se determinaron en muestras de suero o plasma. Se obtuvieron sueros por sangrado de seno orbital y se obtuvieron plasmas por técnicas de sangrado de la vena de la cola para inmunizaciones de proteínas y ADN respectivamente. Se recogieron 20-50 μ l de muestras de sangre en microtubos de heparina.

Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

45 La presencia de anticuerpos anti-HLA-G de dominio α_3 dentro de los plasmas de ratones inmunizados con proteínas se analizó mediante un ELISA colorimétrico indirecto. Las placas de microtitulación se recubrieron con proteínas sintéticas. Los sueros se diluyeron en serie (de 1/500 a 1/32.000) y se agregaron a la placa después del bloqueo y lavado. Los anticuerpos específicos de antígeno unidos se detectaron usando 0,1 μ g/ml de anticuerpos específicos de ratón, anticuerpos anti IgG conjugados con rábano picante, incubados en los pocillos durante 1 hora a 37 °C. Las placas se desarrollaron con OPD y se leyeron a 405 nm (OD).

Análisis de citometría de flujo (Luminex)

55 Detección de anticuerpos anti-HLA-G de dominio α_3 en sueros y plasma de ratones inmunizados con proteínas y ADN respectivamente, se realizaron con Bio-Plex System Bead Coupling (Bio-Rad). Se activaron un millón de microesferas (80 μ l) y se acoplaron con 30 μ g/ml de proteína sintética HLA-G de dominio α_3 , como se describió anteriormente [42] y se describe en la Figura 7. Las microesferas acopladas se contaron mediante un citómetro Epics XL (Beckman Coulter) para evaluar el número final de microesferas. Para la detección de anticuerpos, se añadieron 10 μ l de muestra de suero a una microplaca de filtro de 96 pocillos (Millipore, Billerica, MA, EE. UU.) y se agregaron 2 μ l de microesferas recubiertas HLA-G de dominio α_3 y se incubaron en la oscuridad durante 30 minutos a TA. Después de lavar a fondo con tampón PBS, 50 μ l de 20 μ g/ml de anticuerpo IgG antiratón de cabra conjugado con ficoeritrina (GAM-PE, R&D Systems) se añadió anticuerpo secundario a las microesferas y las muestras se volvieron a conjugar durante 30 minutos en la oscuridad a TA. Después, las microesferas se lavaron por filtración al vacío. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado por citometría de flujo. Los resultados se presentaron en la intensidad de fluorescencia media (MFI) y el límite de las reacciones positivas se definió utilizando sueros de ratones no inmunizados de cada cohorte.

65

Análisis de transferencia por ranuras

La proteína HLA-G de dominio α_3 se transfirió a una membrana de nitrocelulosa después de la separación en una electroforesis SDS-PAGE al 12 % (GE Healthcare). Las membranas se bloquearon mediante incubación con PBS que contenía Tween 20 al 0,2 % y leche en polvo sin grasa al 5 % durante 1 hora a temperatura ambiente (TA). Las membranas se sondearon con plasmas de proteínas y ratones inmunizados con ADN plasmídico, se diluyeron a 1/20 y se incubaron en un aparato Mini-PROTEAN II Multiscreen (Bio-Rad) durante la noche a 4 °C. Después de lavar con PBS que contenía Tween 20 al 0,2 %, Las membranas se bloquearon nuevamente con PBS que contenía 0,2 % de Tween 20 y 5 % de leche en polvo sin grasa durante 20 minutos. Las membranas se incubaron posteriormente durante 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpo IgG de cabra antirratón conjugado con peroxidasa (Sigma), se lavaron a fondo, se tiñieron con reactivo ECL (GE Flealthcare) de quimioluminiscencia mejorado y se expusieron a película de rayos X.

RESULTADOS

*Anticuerpos de proteína anti-HLA-G de dominio α_3 producidos en ratones transgénicos HLA-B*0702 después de la inmunización con proteínas.*

Para la inmunización con proteínas, 4 ratones transgénicos C57Bl/6J HLA-B*0702 se inmunizaron primero con proteína HLA-G de dominio α_3 en CFA, y se inyectaron cada dos semanas con la proteína en IFA. Los sueros fueron probados por ELISA cada dos semanas después de la segunda inmunización. Después de 8 semanas de inmunización, se detectaron anticuerpos específicos para proteína HLA-G de dominio α_3 en un ratón, y otro ratón respondió después de 12 semanas de inmunización (el equivalente a 6 refuerzos), como se muestra en la Figura 7 (A).

A continuación, se realizaron otros dos métodos para controlar la secreción de anticuerpos, para confirmar estos resultados. En primer lugar, un ensayo de microesferas Luminex (configurado y validado para HLA-G por este laboratorio/laboratorio SRHI), se realizó para evaluar la presencia de anticuerpos conformacionales. Como se muestra en la Figura 7 (B), los plasmas de los ratones transgénicos C57Bl/6J HLA-B*0702 "4" y "5" se unieron positivamente a las microesferas de HLA-G revestidas con dominio α_3 , de acuerdo con los resultados de ELISA. De manera interesante, se observó que el plasma del ratón transgénico C57Bl/6J HLA-B*0702 "5" en la 8ª semana de inmunización ya fue positivo para el ensayo de microesferas Luminex, y no fue positivo para ELISA hasta la 12ª semana. Finalmente, la presencia de anticuerpos específicos de HLA-G de dominio α_3 contra epítopos desnaturalizados se confirmaron mediante un ensayo de transferencia por ranuras. Los resultados mostrados en la Figura 7 (C) indican un resultado positivo solo para el plasma del ratón "4".

*Anticuerpos de proteína anti-HLA-G de dominio α_3 producidos en ratones transgénicos Balb/c, C57Bl/6J y HLA-B*0702 después de la inmunización con ADN*

La segunda estrategia de inmunización se estableció usando la codificación de ADN para el dominio α_3 de las moléculas HLA-G. Se inmunizaron tres cepas murinas con la secuencia específica, que fue suministrada por EGT (Electro-Gene Transfer) en células musculares. En el caso de ratones Balb/c, tres animales inmunizados fueron positivos para el ensayo de microesferas Luminex, así como para el análisis de transferencia por ranuras, mostrado en la Figura 8 (A) y (B). Para la cepa C57Bl/6J, tres de cada cuatro animales inmunizados también fueron positivos, tanto para las microesferas Luminex como para los ensayos de transferencia por ranuras como se muestra en la Figura 9 (A) y (B).

Experimentos comparativos con respecto a la vacuna de ADN HLA-G- α_3

Los inventores también investigaron si la electroporación del dominio ADN-HLA-G α_3 podría inhibir el efecto inmunosupresor de la molécula completa de HLA-G. Para este fin, se electroporaron o no ratones Balb/c con el dominio ADN-HLA-G α_3 y se generaron anticuerpos circulantes producidos contra el dominio HLA-G- α_3 , como se describe en el presente documento. Ratones Balb/c no electroporados y ADN-HLA-G α_3 electroporados fueron inoculados por vía subcutánea con 2.10^6 células de melanoma M8 transfectadas o no con moléculas HLA-G1 y denominadas respectivamente células M8-HLA-G1 y M8-pcDNA [38]. Tal como se muestra en la Figura 10, sin electroporación de ADN-HLA-G α_3 , el crecimiento tumoral M8-HLA-G1 fue mayor que las células M8-pcDNA como se informó anteriormente [17]. Sin embargo, después de la electroporación de ADN-HLA-G α_3 , el crecimiento tumoral fue similar entre las células tumorales M8-HLA-G1 y M8-pcDNA implantadas por vía subcutánea (figura 11). De esta manera, el efecto protector de HLA-G1 se evitó en ratones electroporados. Los inventores mostraron además que la supresión del efecto protector de HLA-G en células M8-HLA-G1 transfectadas se correlacionó con la presencia de anticuerpos circulantes generados contra dominios α_3 de HLA-G en suero de ratones (datos no mostrados).

ANÁLISIS

Los inventores han producido anticuerpos anti-HLA-G mediante el uso de dominio α_3 de HLA-G por inmunización con proteínas y ADN. La inmunización con ADN demostró ser la forma eficiente de generar anticuerpos contra el dominio

α_3 de la proteína HLA-G, como se ilustra en ratones. Esta estrategia se consideró relevante para la generación de anticuerpos anti-HLA-G porque el dominio α_3 de HLA-G contiene un motivo único de la molécula, presente en ninguna otra molécula de HLA. Los anticuerpos anti-HLA-G generados reconocen un epítipo conformacional en las proteínas HLA-G, como presente en las proteínas HLA-G expresadas naturalmente por la maquinaria celular. Adicionalmente, se anticipó que el uso del dominio α_3 de HLA-G sería particularmente relevante para la generación de anticuerpos bloqueantes, porque la función de HLA-G depende de la asociación entre las moléculas LILRB y el dominio α_3 de HLA-G, aunque se requiere una unión adicional a β_2M para el receptor LILRB1. Sin embargo, como se ha discutido anteriormente, todos los intentos de apuntar a dicho dominio α_3 de HLA-G produciendo los anticuerpos anti-HLA de dominio α_3 han fallado hasta ahora. Finalmente, esta estrategia representa un avance significativo porque el anticuerpo producido podrá reconocer isoformas asociadas con β_2M , libres de β_2M y de HLA-G truncadas, que todas contienen el dominio α_3 y todas son inmunoinhibitorias y patológicamente relevantes.

Se implementaron dos métodos, que permitieron la inmunización eficiente de la mayoría de las isoformas de HLA-G usando una secuencia de ADN y una proteína diseñada correspondiente al dominio α_3 de HLA-G. Estas innovadoras estrategias de inmunización permitieron el desarrollo y la producción de anticuerpos anti-HLA-G, que son fundamentales para las terapias basadas en tumores anti-HLA-G y la monitorización de HLA-G.

Los inventores han demostrado mediante tres métodos de detección diferentes, que fue posible producir nuevos anticuerpos anti HLA-G mediante la inmunización de ratones transgénicos HLA-B*0702 con el dominio α_3 de HLA-G. La diferencia observada entre ELISA, microesferas Luminex y los ensayos de transferencia por ranuras se pueden explicar por el hecho de que el último método utiliza epítopos desnaturalizados, para los cuales algunos de los clones que producen anticuerpos, detectados en los otros ensayos, reconocen tal epítipo. Por lo tanto, algunos anticuerpos policlonales podrían unirse a epítopos desnaturalizados, mientras que otros podrían unirse a los conformacionales.

También se realizó una estrategia diferente con el propósito de producir anticuerpos específicos del dominio α_3 anti-HLA-G a través de la inmunización con ADN. La inmunización con ADN produjo 3/6 para la cepa Balb/c y 3/4 resultados positivos para la cepa C57Bl/6J, detectada por Luminex y ensayos de transferencia por ranuras.

En los experimentos de la vacuna de ADN HLA-G- α_3 , los inventores han demostrado que los ratones Balb/c generaron anticuerpos anti-HLA-G- α_3 después de la inmunización con ADN, con un fuerte efecto sobre el crecimiento tumoral.

REFERENCIAS

- Geraghty, D.E., B.H. Koller y H.T. Orr, *A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with shortened cytoplasmic segment*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987. 84(1): págs. 9145-9149.
- Ellis, S.A., M.S. Palmer y A.J. McMichael, *Human trophoblast and the choriocarcinoma cell line BeWo express a truncated HLA Class I molecule*. J Immunol, 1990. 144(2): págs. 731-5.
- Rouas-Freiss, N., et al., *The alpha1 domain of HLA-G1 and HLA-G2 inhibits cytotoxicity induced by natural killer cells: is HLA-G the public ligand for natural killer cell inhibitory receptors?* Proc Natl Acad Sci USA, 1997. 94(10): págs. 5249-54.
- Carosella, E.D., et al., *Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule*. Blood, 2008. 111(10): págs. 4862-70.
- Rouas-Freiss, N., et al., *Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. 94(21): págs. 11520-5.
- Riteau, B., et al., *HLA-G2, -G3, and -G4 isoforms expressed as nonmature cell surface glycoproteins inhibit NK and antigen-specific CTL cytotoxicity*. J Immunol, 2001. 166(8): págs. 5018-26.
- Riteau, B., et al., *HLA-G inhibits the allogeneic proliferative response*. J Reprod Immunol, 1999. 43(2): págs. 203-11.
- Bainbridge, D.R., S.A. Ellis, y I.L. Sargent, *HLA-G suppresses proliferation of CD4(+) T-lymphocytes*. J Reprod Immunol, 2000. 48(1): págs. 17-26.
- Bahri, R., et al., *Soluble HLA-G inhibits cell cycle progression in human alloreactive T lymphocytes*. J Immunol, 2006. 176(3): págs. 1331-9.
- LeMaoult, J., et al., *Immune regulation by pretenders: cell-to-cell transfers of HLA-G make effector T cells act as regulatory cells*. Blood, 2007. 109(5): págs. 2040-8.
- Caumartin, J., et al., *Trogocytosis-based generation of suppressive NK cells*. EMBO J, 2007. 26(5): págs. 1423-33.
- Ristich, V., et al., *Tolerization of dendritic cells by HLA-G*. Eur J Immunol, 2005. 35(4): págs. 1133-42.
- Gros, F., et al., *Soluble HLA-G molecules impair natural killer/dendritic cell crosstalk via inhibition of dendritic cells*. Eur J Immunol, 2008. 38(3): págs. 742-9.
- Liang, S., et al., *Modulation of dendritic cell differentiation by HLA-G and ILT4 requires the IL-6--STAT3 signaling pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(24): págs. 8357-62.
- LeMaoult, J., et al., *HLA-G1 -expressing antigen-presenting cells induce immunosuppressive CD4+ T cells*. Proc Natl Acad Sci USA, 2004. 101(18): págs. 7064-9.
- Gregori, S., et al., *Differentiation of type 1 T regulatory cells (Tr1) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10-dependent ILT4/HLA-G pathway*. Blood, 2010. 116(6): págs. 935-44.
- Agaugue, S., E.D. Carosella, y N. Rouas-Freiss, *Role of HLA-G in tumor escape through expansion of myeloid-*

- derived suppressor cells and cytokinic balance in favor of Th2 versus Th1/Th17.* Blood, 2011. 117(26): págs. 7021-31.
18. Carosella, E.D., et al., *HLA-G: from biology to clinical benefits.* Trends Immunol, 2008. 29(3): págs. 125-32.
 19. Ibrahim, E.C., et al., *Analysis of HLA antigen expression in benign and malignant melanocytic lesions reveals that upregulation of HLA-G expression correlates with malignant transformation, high inflammatory infiltration and HLA-A1 genotype.* Int J Cancer, 2004. 108(2): págs. 243-50.
 20. Riteau, B., et al., *HLA-G2, -G3, and -G4 isoforms expressed as nonmature cell surface glycoproteins inhibit NK and antigen-specific CTL cytotoxicity.* J Immunol, 2001. 166(8): págs. 5018-26.
 21. Paul, P., et al., *HLA-G expression in melanoma: a way for tumor cells to escape from immunosurveillance.* Proc Natl Acad Sci USA, 1998. 95(8): págs. 4510-5.
 22. Nuckel, H., et al., *HLA-G expression is associated with an unfavorable outcome and immunodeficiency in chronic lymphocytic leukemia.* Blood, 2005. 105(4): págs. 1694-1698.
 23. Qiu, J., et al., *Soluble HLA-G expression and renal graft acceptance.* Am J Transplant, 2006. 6(9): págs. 2152-6.
 24. Naji, A., et al., *Neoplastic B-cell growth is impaired by HLA-G/ILT2 interaction.* Leukemia, 2012.
 25. Hunt, J.S., et al., *Immunogenicity of the soluble isoforms of HLA-G.* Mol Hum Reprod, 2003. 9(11): págs. 729-35.
 26. Le Rond, S., et al., *Alloreactive CD4+ and CD8+ T cells express the immunotolerant HLA-G molecule in mixed lymphocyte reactions: in vivo implications in transplanted patients.* Eur J Immunol, 2004. 34(3): págs. 649-60.
 27. Lila, N., et al., *Soluble HLA-G protein secreted by allospecific CD4+ T cells suppresses the allo-proliferative response: a CD4+ T cell regulatory mechanism.* Proc Natl Acad Sci USA, 2001. 98(21): págs. 12150-5.
 28. Favier, B., et al., *Tolerogenic function of dimeric forms of HLA-G recombinant proteins: a comparative study in vivo.* PLoS One, 2011. 6(7): págs. e21011.
 29. HoWangYin, K.Y., et al., *Multimeric structures of HLA-G isoforms function through differential binding to LILRB receptors.* Cell Mol Life Sci, 2012.
 30. Cooper, M.A., T.A. Fehniger y M.A. Caligiuri, *The biology of human natural killer-cell subsets.* Trends Immunol, 2001. 22(11): págs. 633-40.
 31. Rajagopalan, S. y E.O. Long, *A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells.* J. Exp. Med., 1999. 189(7): págs. 1093-100.
 32. Yan, W.H. y L.A. Fan, *Residues met76 and gln79 in HLA-G alpha1 domain involve in KIR2DL4 recognition.* Cell Res, 2005. 15(3): págs. 176-82.
 33. Colonna, M., et al., *A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells.* J. Exp. Med., 1997. 186(11): págs. 1809-1818.
 34. Colonna, M., et al., *Human myelomonocytic cells express an inhibitory receptor for classical and nonclassical MHC class I molecules.* J. Immunol., 1998. 160(7): págs. 3096-3100.
 35. Allan, D.S., et al., *Tetrameric complexes of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G bind to peripheral blood myelomonocytic cells.* J. Exp. Med., 1999. 189(7): págs. 1149-56.
 36. Colonna, M., et al., *Human myelomonocytic cells express an inhibitory receptor for classical and nonclassical MHC class I molecules.* J Immunol, 1998. 160(7): págs. 3096-100.
 37. Shiroishi, M., et al., *Efficient leukocyte Ig-like receptor signaling and crystal structure of disulfide-linked HLA-G dimer.* J Biol Chem, 2006. 281(15): págs. 10439-47.
 38. Caumartin, J., et al., *Trogocytosis-based generation of suppressive NK cells.* EMBO J, 2007. 26: págs. 1423-1433.
 39. Shiroishi, M., et al., *Structural basis for recognition of the nonclassical MHC molecule HLA-G by the leukocyte Ig-like receptor B2 (LILRB2/IL2R2/IL T4/CD85d).* Proc Natl Acad Sci USA, 2006. 103(44): págs. 16412-7.
 40. Gonen-Gross, T., et al., *The CD85J/Leukocyte Inhibitory Receptor-1 Distinguishes between Conformed and {beta}2-Microglobulin-Free HLA-G Molecules.* J. Immunol., 2005. 175(8): págs. 4866-4874.
 41. Shiroishi, M., et al., *Structural basis for recognition of the nonclassical MHC molecule HLA-G by the leukocyte Ig-like receptor B2 (LILRB2/IL2R2/ILT4/CD85d).* PNAS, 2006. 103(44): págs. 16412-16417.
 42. Rebmann, V., et al., *Rapid evaluation of soluble HLA-G levels in supernatants of in vitro fertilized embryos.* Hum Immunol, 2007. 68(4): págs. 251-8.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente al dominio alfa 3 de una proteína HLA-G y que reconoce un epítipo conformacional contenido en una secuencia de aminoácidos que tiene la SEQ ID NO: 1 y que bloquea la unión de una proteína HLA-G que exhibe un dominio alfa 3 a al menos uno de los receptores B1 (LILRB1) de tipo inmunoglobulina leucocitaria o receptor B2 (LILRB2) de tipo inmunoglobulina leucocitaria, en particular, que bloquea la unión de dicha proteína HLA-G a los receptores LILRB1 y LILRB2.
- 10 2. Un suero policlonal que comprende anticuerpos según la reivindicación 1.
3. Una composición que comprende como principio activo, un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo según la reivindicación 1 o un suero policlonal según la reivindicación 2, para su uso como medicamento, en particular, para su uso como vacuna inmunoterapéutica.
- 15 4. Una composición para su uso según la reivindicación 3, en un hospedador que lo necesite, en particular, un paciente humano:
para mejorar o tratar afecciones que presentan lesiones de HLA-G+ que son infecciones virales como la infección por VIH, infección por el virus de la rabia o infección por el virus de la hepatitis B, enfermedades autoinmunitarias que implican células inmunitarias que expresan HLA-G con un dominio alfa 3 tal como inflamación crónica, o tumores malignos y/o;
20 para mejorar o tratar la afección que presenta lesiones de HLA-G+ que es una enfermedad neoplásica, en particular, una enfermedad cancerosa.
- 25 5. Una composición inmunogénica que comprende una molécula de ácido nucleico que es una molécula de ácido nucleico que comprende o que consiste en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 9 y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde dicha composición inmunogénica comprende opcionalmente un principio activo y/o adyuvante adicional, diferente.
- 30 6. Una molécula de ácido nucleico que comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 9, para su uso como medicamento, en particular, para su uso como vacuna en un mamífero, en particular, de un ser humano.
7. Una molécula de ácido nucleico para su uso según la reivindicación 6 en el tratamiento de enfermedades neoplásicas o cáncer.

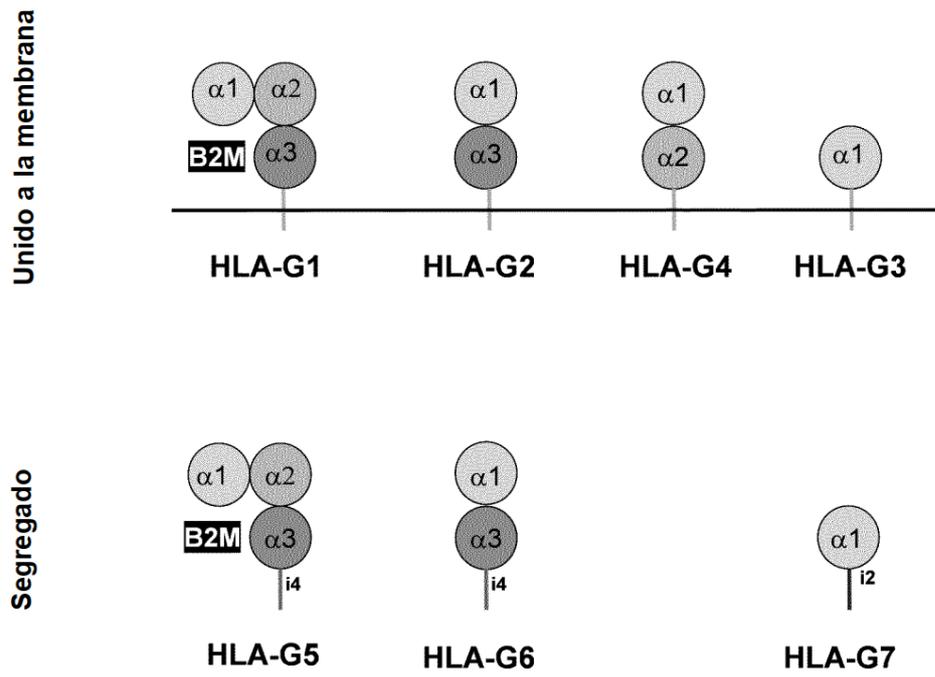


Fig. 1

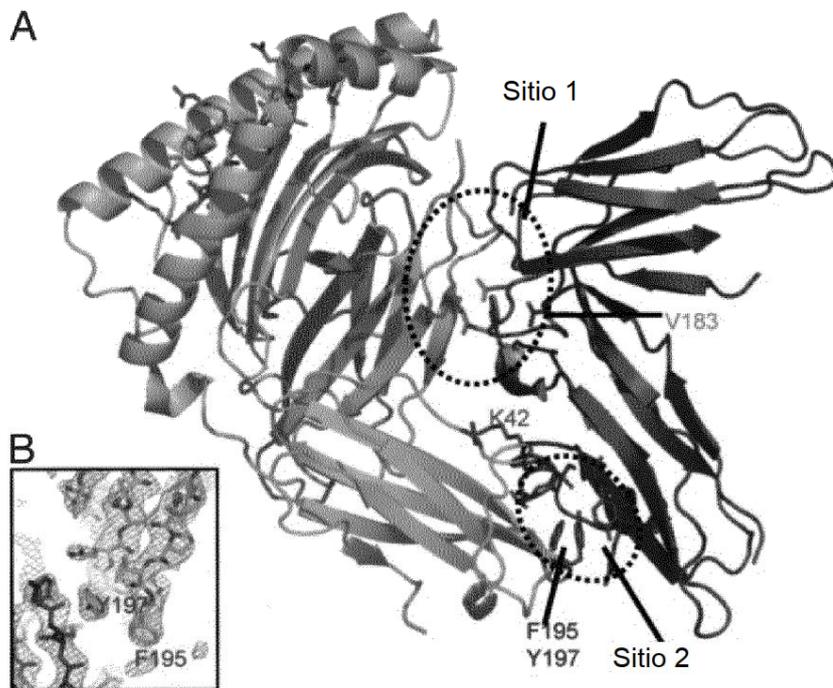


Fig. 2

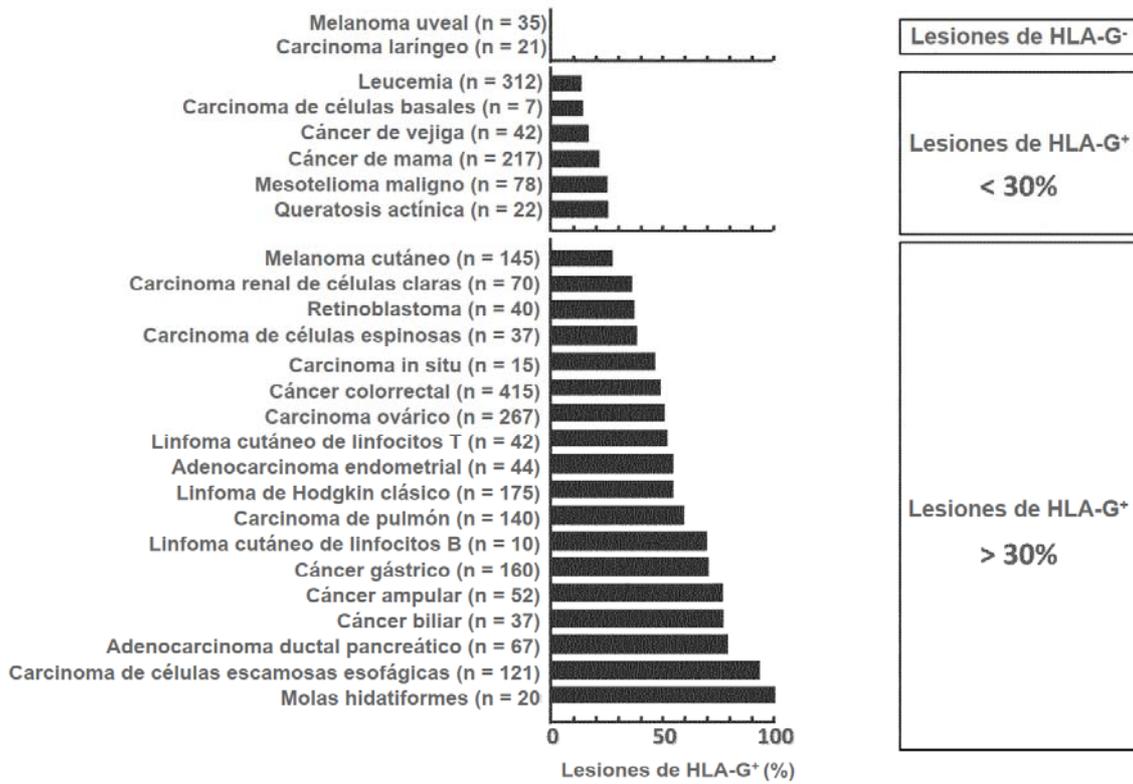
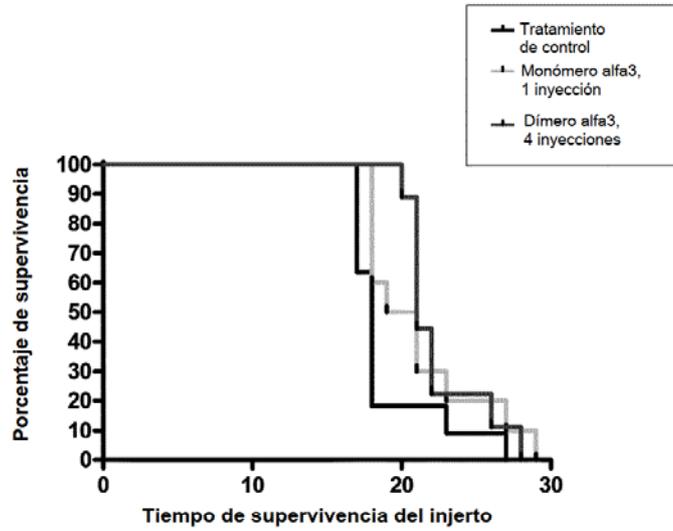


Fig. 3

Microesferas únicas (no péptido)
 N = 11
 Supervivencia media = 18 días

Microesferas de $\alpha 3$ (monómero)
1 inyección
 N = 10
 Supervivencia media = 20 días
 p = 0,0955

Microesferas de $(\alpha 3) \times 2$ (dímero)
4 inyecciones
 N = 9
 Supervivencia media = 21 días
 p = 0,0486



* Supervivencia media = día en el cual el 50 % de los injertos fue rechazado

Fig. 4

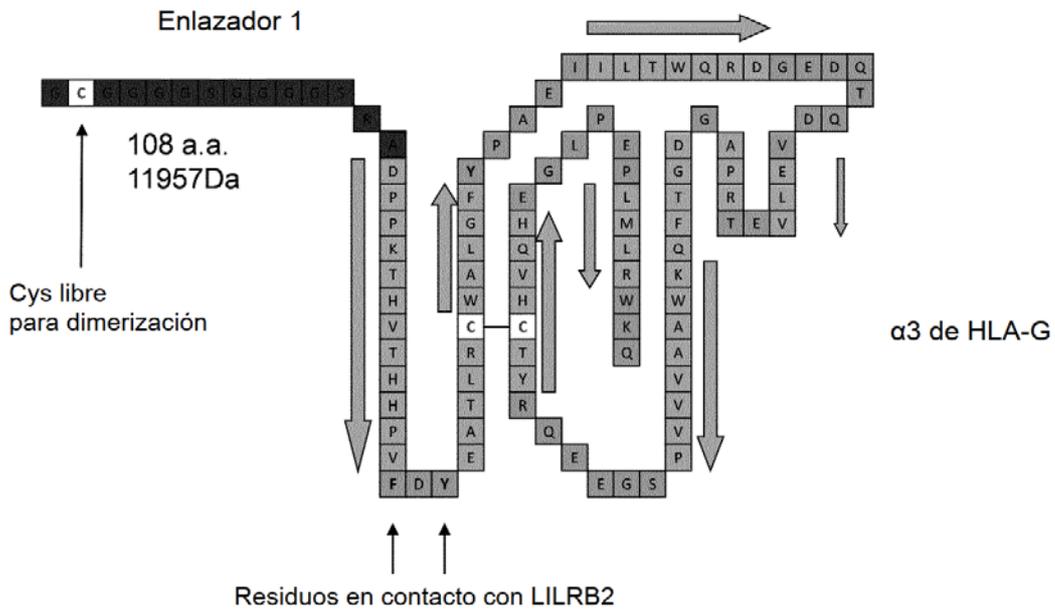


Fig. 5

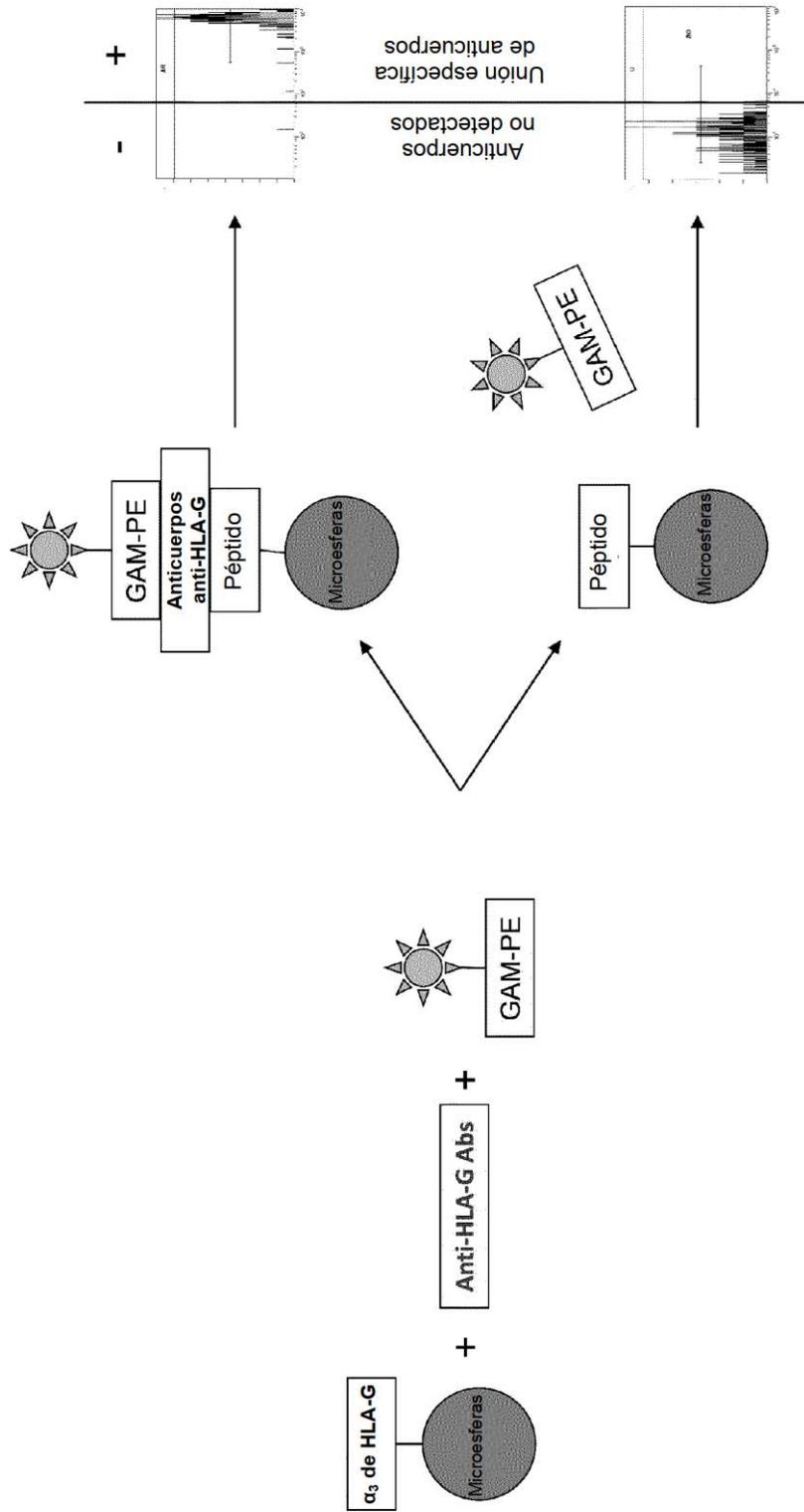


Fig. 6

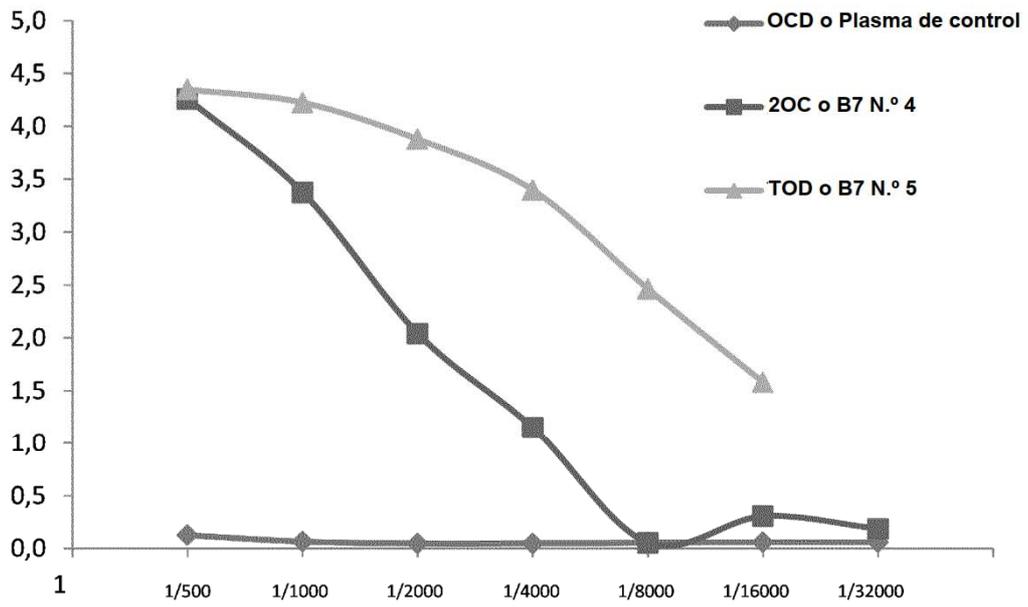


Fig. 7A

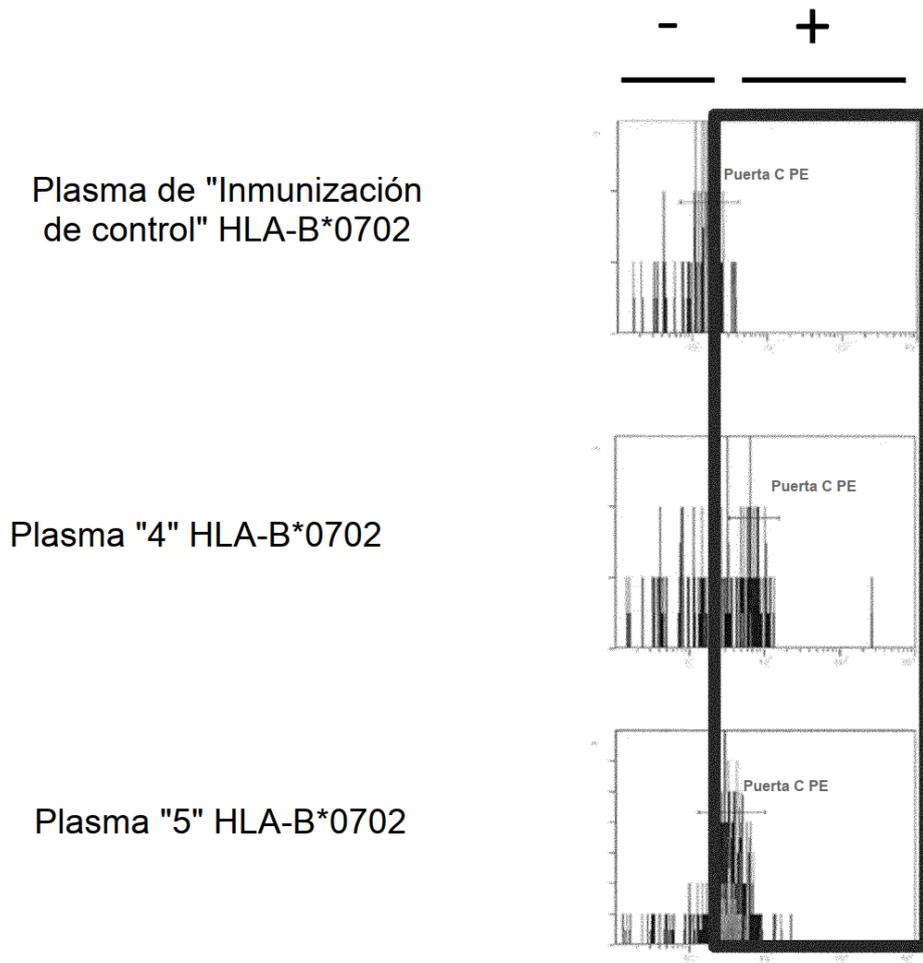


Fig. 7B

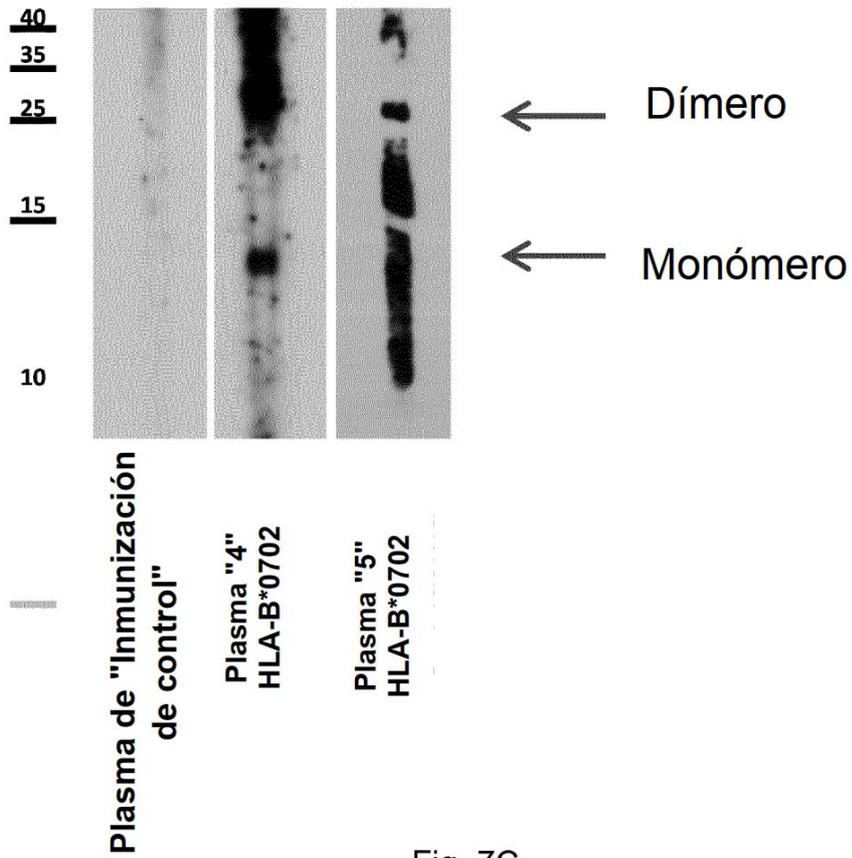


Fig. 7C

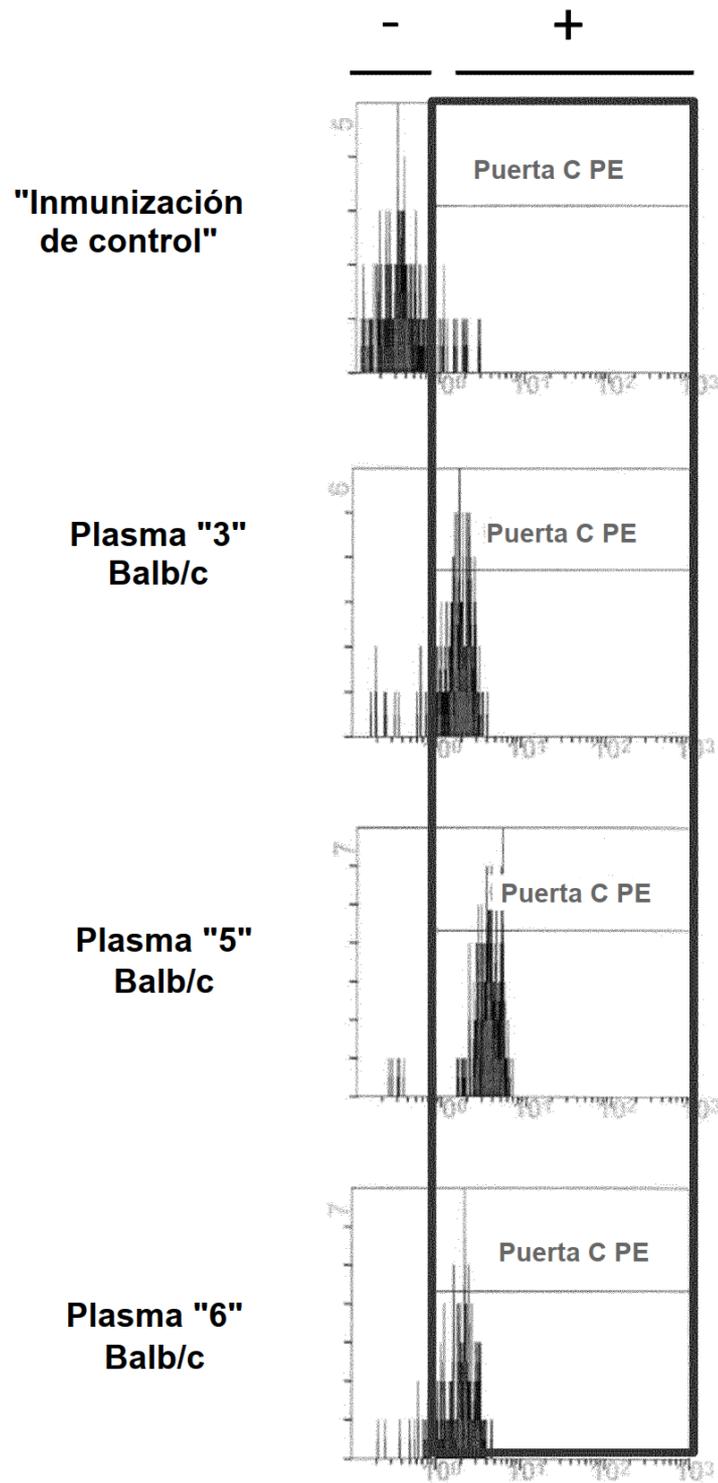


Fig. 8A

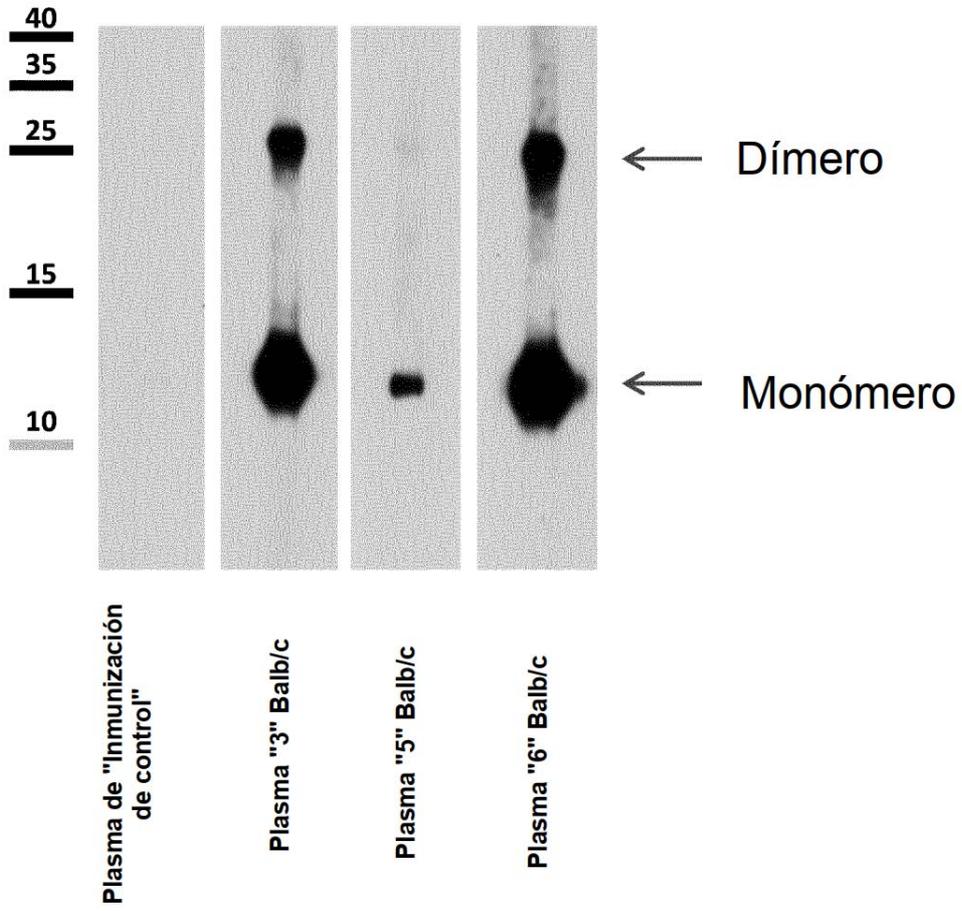


Fig. 8B

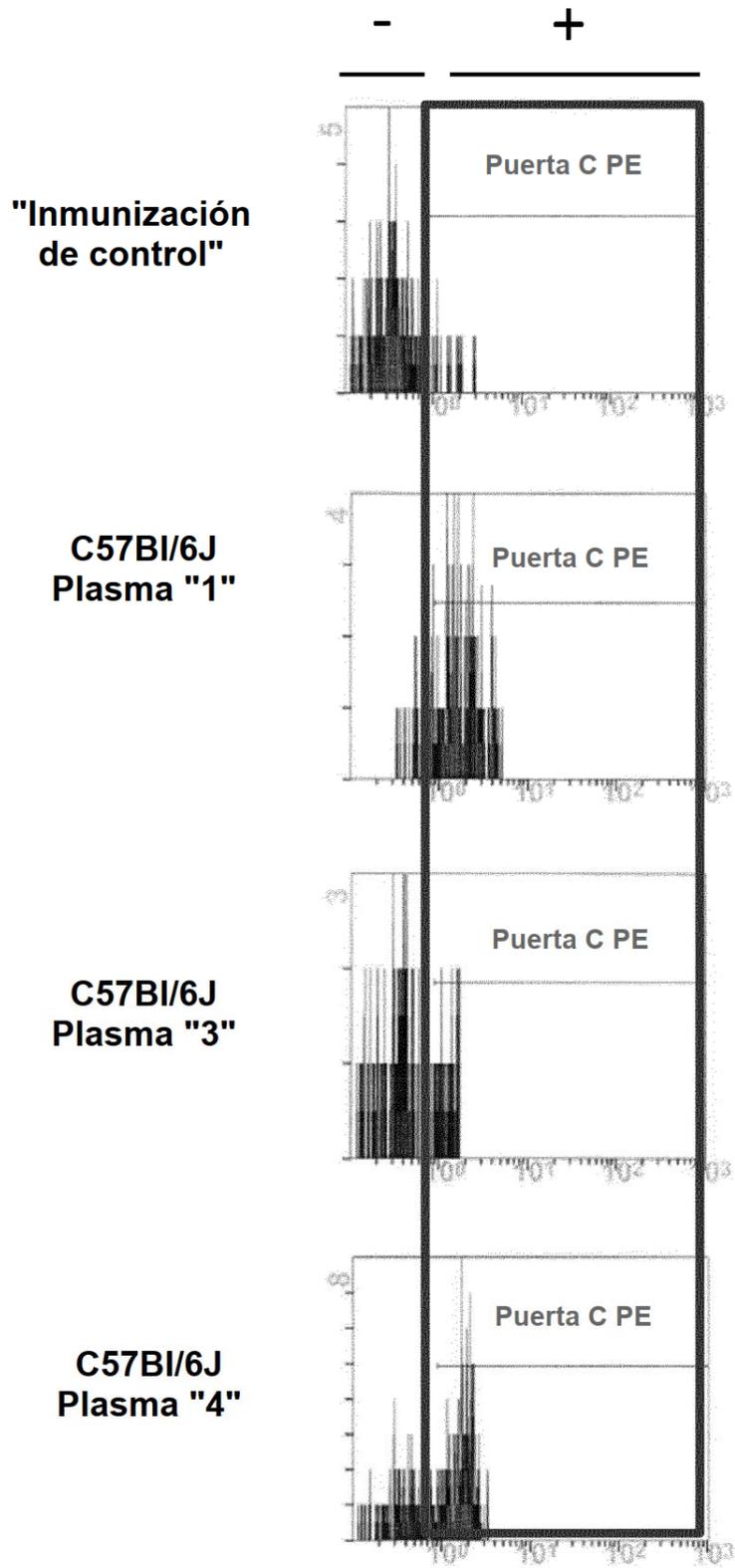


Fig. 9A

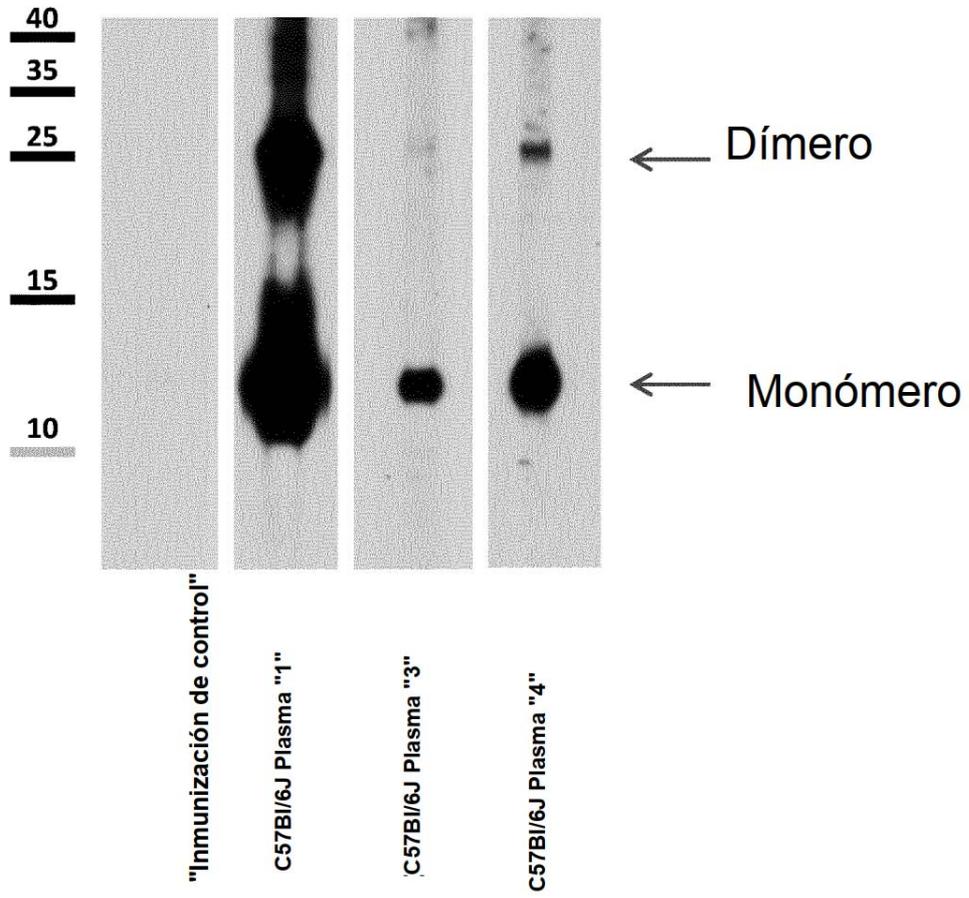


Fig. 9B

Volumen tumoral según la concentración de melanoma humano

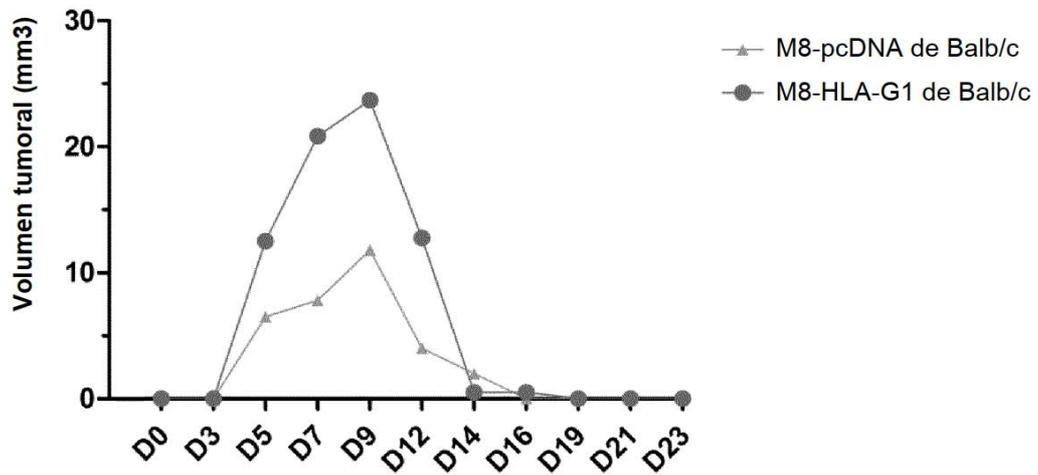


Fig. 10

Volumen tumoral según la concentración de melanoma humano

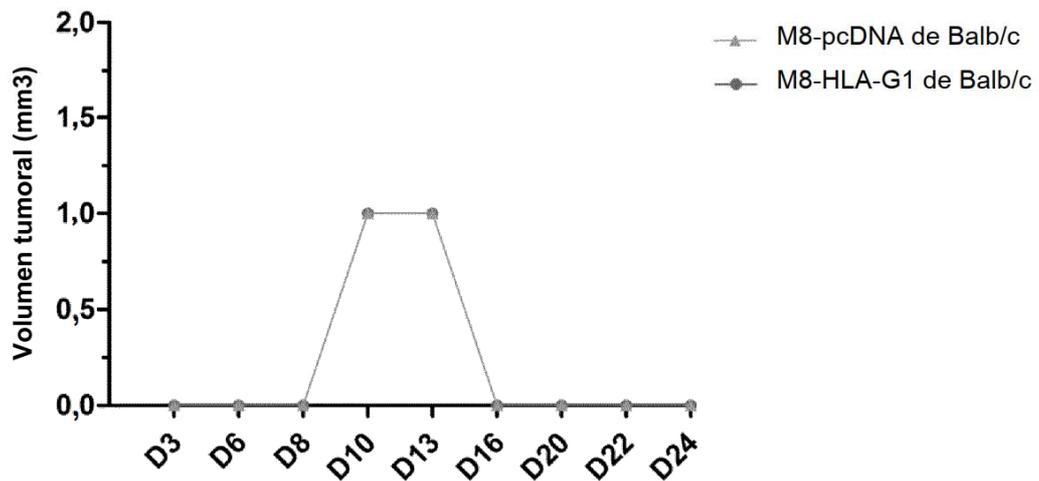


Fig. 11