



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-259753- -00000-0000

Fecha: 2013-11-01 15:59:15 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4

SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO **“ELIMINACIÓN DE CÉLULAS DIANA POR
PARTE DE CÉLULAS T CITOTÓXICAS
ESPECÍFICAS DE VIRUS UTILIZANDO
COMPLEJOS QUE COMPRENDEN MHC DE
CLASE I”**

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL **CO7K16/46**

71. SOLICITANTE **F. HOFFMANN-LA ROCHE AG**

DOMICILIO **BASILEA, SUIZA.**

74. REPRESENTANTE LEGAL **ALICIA LLOREDA RICAURTE**
T.P. 53.215

22. BOGOTÁ, D.C. **01 NOV 2013**



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO


No. 13-259753- -00000-0000

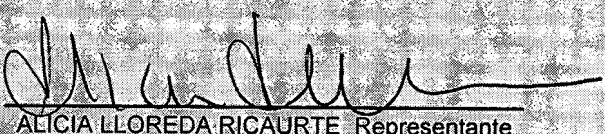
Fecha: 2013-11-01 15:59:15 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4

radicación

L

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL –PCT

1	(12) TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No.		PCT/EP2012/061734	Fecha 19/06/12
Publicación Internacional No.		WO 2012/175508 A1	Fecha 27/12/12
3	(54) TÍTULO DE LA INVENCION:		
"ELIMINACIÓN DE CÉLULAS DIANA POR PARTE DE CÉLULAS T CITOTÓXICAS ESPECÍFICAS DE VIRUS UTILIZANDO COMPLEJOS QUE COMPRENDEN MHC DE CLASE I"			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (51) CIP		
C07K 16/46			
5	(71) SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN TIPO
4. F. HOFFMANN-LA ROCHE AG			
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN		Grenzacher Strasse 124, CH-4070 Basilea, Suiza.	No. TELÉFONO 3264270
CIUDAD		Basilea	E-MAIL notificacionespatentes@lloredacamacho.com
DEPARTAMENTO/ESTADO			NACIONALIDAD O LUGAR DE SUIZA
PAÍS DE RESIDENCIA		Suiza	CONSTITUCIÓN
7	(72) INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
1. KNOETGEN		Hendrik	Alemania
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO: notificacionespatentes@lloredacamacho.com			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
Alemania		Penzberg	Agathe-Fleissner-Weg 16, 82377 Penzberg, Alemania.
9	(74) ☒ REPRESENTANTE ☒ APODERADO		
APELLIDOS		NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
LLOREDA RICAURTE		ALICIA	C.C 39.690.713 T.P .53.215
DIRECCIÓN		Calle 72 No 5-83 Piso 5to	No. TELÉFONO 3264270
CIUDAD		Bogotá	E-MAIL notificacionespatentes@lloredacamacho.com
PAÍS		Colombia	No. DE PROTOCOLO EN LA OFICINA

10	(30) DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO			
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO	(32) FECHA (AAAA/MM/DD)
1. Oficina Europea de Patentes		EP	11171027.3	11/06/22
11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS			
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.</i>				
☐ SI ☒ NO				
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.				
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES			
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.</i>				
☐ SI ☒ NO				
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.				
13	REDUCCIÓN DE TASAS			
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i>				
☐ SI ☒ NO				
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.				
Micro, pequeñas y medianas empresas		Universidades públicas o privadas	Entidades sin ánimo de lucro	
☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.		☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación. Acreditación Colciencias.	☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio.	
☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.			☐ Hoja de información complementaria.	
			☐ Otros, especificar	
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☒ SI ☐ NO			
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de Internet.				
14	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	N° 13-104001	Fecha 15-10-2013	
15	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL			
Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)				
 ALICIA LLOREDA RICAURTE Representante C.C. 39.690.713 T.P.53.215 Apoderado				
16	ORDEN Y RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE ACOMPAÑAN LA SOLICITUD			
Documentación Técnica		Documentación Jurídica		
Solicitud Internacional en castellano				
1. ☒ Descripción N° de folios: 112		9. ☒ Poderes, si fuera el caso.		
2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: 30		10. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.		
3. ☒ Dibujos y/o figuras N° folios: 20		11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.		
4. ☒ Resumen.		12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.		
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.		13. ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal, cuando el solicitante es persona jurídica.		
6. ☒ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.		14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.		
7. ☐ Arte final 12 x 12.		15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.		
8. ☒ Anexo formato digital.		16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.		
		17. ☐ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.		

VER ANEXO CD

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 13 - 104001
		Bogotá D.C., Octubre 15 de 2013 - 13:32:29

RECIBIDO DE : LLOREDA & CIA. S.A. NI 830.022.145

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	590199002	15/10/2013	15.653.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	500.000.00 500.000.00
			\$500.000.00
			=====

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: 

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-259753- -00000-0000
Fecha: 2013-11-01 15:59:15 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4



No. 13-259753- -00000-0000

Fecha: 2013-11-01 15:59:15 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4



LISTA DE CHEQUEO
ADMISIÓN A TRÁMITE - NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☒	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☒	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ELIMINACIÓN DE CÉLULAS DIANA POR PARTE DE CÉLULAS T CITOTÓXICAS ESPECÍFICAS DE VIRUS UTILIZANDO COMPLEJOS QUE COMPRENDEN MHC DE CLASE I

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

En la presente memoria se informa de un complejo que comprende como primer componente una parte derivada de un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno diana, y como segundo componente un péptido derivado de un virus unido a un complejo de proteína de MHC de clase I. Con el complejo indicado en la presente memoria pueden dirigirse células T citotóxicas circulantes específicas de virus existentes (células T de memoria o células T efectoras) de un individuo a células que expresan el antígeno diana, a las que se une específicamente la parte del complejo covalente derivada de un anticuerpo, mediante la cobertura de dichas células con un complejo MHC de clase I imitando una infección vírica aguda. De esta manera, un aspecto indicado en la presente memoria es un complejo, caracterizado porque comprende un polipéptido de fusión que comprende, en dirección N-terminal a C-terminal, (i) una $\beta 2$ -microglobulina, e (ii) los dominios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de 1% o superior, y dos cadenas polipeptídicas, que se encuentran unidas mediante uno o más enlaces disulfuro, en el que la primera cadena polipeptídica unida mediante disulfuro comprende, en dirección N-terminal a C-terminal, (i) un dominio variable de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina, (ii) un dominio constante de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina, e (iii) un polipéptido de región bisagra de cadena pesada de anticuerpo, y la segunda cadena polipeptídica unida mediante disulfuro comprende un polipéptido de región bisagra de cadena pesada de anticuerpo, en el que el polipéptido de fusión se encuentra unido covalentemente al extremo C-terminal o al extremo N-terminal de una de las cadenas polipeptídicas unidas mediante disulfuro, o se encuentra unida covalentemente al extremo N-terminal de un dominio variable de anticuerpo que es el dominio variable de cadena pesada o ligera complementario al comprendido en la primera cadena polipeptídica unida mediante disulfuro.

SECTOR: Biotecnología. Inmunoglobulinas hídras en las que el ingrediente activo esté unido químicamente a los ingredientes no activos.

ELIMINACIÓN DE CÉLULAS DIANA POR PARTE DE CÉLULAS T CITOTÓXICAS ESPECÍFICAS DE VIRUS UTILIZANDO COMPLEJOS QUE COMPRENDEN MHC DE CLASE I

En la presente memoria se informa de un polipéptido de fusión que comprende un anticuerpo y un componente MHC de clase I y su utilización para la eliminación de células diana mediante la atracción dirigida de células T citotóxicas circulantes específicas de virus.

5 **Antecedentes de la invención**

La proteína de MHC de clase I consiste de una cadena α (α -1-3 y un dominio transmembranal) y β 2-microglobulina. Es poligénico (3 loci génicos de la proteína MHC de clase I en el genoma haploide), dando lugar a seis cadenas α diferentes de proteína MHC de clase I (en el ser humano, dos HLA-A, dos HLA-B y dos HLA-C). El MHC es, además, polimórfico. El alelo de HLA-A humano A*0201 es prevalente en aproximadamente 30% a 50% de la población caucásica (Player *et al.*, J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol. 19:357-363, 1996). El citomegalovirus humano, HCMV (=virus herpes humano 5, HHV-5) es uno de los virus humanos de mayor tamaño. Su genoma comprende aproximadamente 230.000 pb de ADN lineal de doble cadena y codifica más de 160 proteínas (Davison A.J. *et al.*, J. Gen. Virol. 84:17-28, 2003).

El CMV ha evolucionado hasta convertirse en un parásito perfecto del genoma humano y es un potente inmunógeno que desencadena fuertes respuestas inmunológicas de todos los brazos del sistema inmunológico. Dicho virus aparentemente se encuentra entre los antígenos más inmunodominantes que se conocen del sistema inmunológico humano y estimula respuestas de células T CD8⁺ de una magnitud sin precedentes. La "latencia" del CMV depende de la inmunosupresión crónica de los virus CMV y no de un cambio del patrón de transcripción vírica (Moss y Khan, Human Immunology 65:456-464, 2004).

Las respuestas inmunológicas de células T CD8⁺ no se dirigen uniformemente contra todas las proteínas del CMV sino que son respuestas focalizadas. Las proteínas del CMV pp65 e IE-1 son las dianas predominantes (McLaughlin-Taylor E. *et al.*, J. Med. Virol. 43:103-110,

1994; Moss y Khan, Human Immunology 65:456-464, 2004).

La frecuencia real de las células T específicas de CMV es muy alta, con frecuencias para los péptidos individuales del orden de incluso 1-2% del repertorio total de células T CD8⁺ (Moss y Khan, Human Immunology, 5 *supra*; Wills M.R. *et al.*, J. Virol. 70:7569-7579, 1996).

La respuesta de células T CD8⁺ específica del CMV se incrementa marcadamente con la edad y los tetrámeros de péptido HLA individuales frecuentemente tiñen más de 10% del pool total de células T CD8⁺ (Khan N. *et al.*, J. Immunol. 169:1984-1992, 2002).

10 La respuesta total de células T CD8⁺ en donantes de edad avanzada sanos podría constituir aproximadamente 50% del repertorio de células T CD8⁺.

Las enormes expansiones de las células T CD8⁺ con frecuencia se encuentran muy restringidas clonalmente, y se estima que el CMV es la causa de por lo menos 30% de las expansiones clonales de células T CD8⁺ 15 observadas en sangre periférica con el envejecimiento. El recuento total de células T CD8⁺ es dos veces más elevado en donantes seropositivos para CMV de más de 60 años de edad en comparación con una cohorte seronegativa para el CMV (Looney R.J. *et al.*, Clin. Immunol. 90:213-219, 1999).

20 Se informa de una fusión de HLA soluble y β -2-microglobulina en Mottez *et al.* (Eur. J. Immunol. 21:467-471, 1991); Godeau *et al.* (J. Biol. Chem. 267:24223-24229, 1992) y Maget *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. 89:10658-10662, 1992). Se informa de una fusión de péptido derivado de virus con HLA soluble y β 2-microglobulina en Mottez *et al.* (J. Exp. Med. 181:493-25 502, 1995). Se informa de una fusión de una cadena pesada de inmunoglobulina con HLA soluble y β -2-microglobulina coexpresada en Dal Porto *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. 90:6671-6675, 1993). Se describe un complejo tetramérico de péptido biotinilado-HLA soluble y β 2-microglobulina con estreptavidina químicamente acoplada a un Fab en Robert *et al.* (Eur. J. Immun. 30:3165-3170, 2000). Se informa de un Fab 30 químicamente acoplado con una fusión de péptido derivado de virus con HLA soluble y β 2-microglobulina en Robert *et al.* (Cancer Immunity 1:2, 2001). Se informa de una fusión de péptido derivado de virus con HLA soluble y β 2-microglobulina con una cadena pesada de anticuerpo 35 monoclonal murino en Greten *et al.* (J. Immunol. Methods 271:125-135,

2002). Se informa de una expresión de *E. coli* de fusiones de scFv sin péptido, el replegamiento *in vitro* y la carga de péptidos en Lev *et al.* (J. Immunol. 169:2988-2996), Lev *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. 101:9051-9056, 2004) y Novak *et al.* (Int. J. Cancer 120:329-336, 2006). La utilización de MHC soluble biotinilado cargado con péptidos y acoplado con anticuerpos Fab o scFv fusionados con estreptavidina se informa en Mous *et al.* (Leukemia 20:1096-1102, 2006).

En la patente WO nº 2005/099361 se informa de conjugados de MHC de clase I-péptido-anticuerpo con β 2-microglobulina modificada. Se informa de conjugados ejemplares en la patente WO nº 2005/099361, obtenidos mediante conjugación *in vitro* de la cadena α del complejo MHC (HLA) o mediante coexpresión a partir de genes separados en la misma célula.

En la patente US nº 2004/0091488 se informa de constructos antigénicos de antígenos del complejo de histocompatibilidad mayor de clase I con moléculas portadoras específicas. En la presente memoria se informa de polipéptidos de fusión que no presentan una región bisagra.

Descripción resumida de la invención

En la presente memoria se informa de un método para producir recombinantemente un complejo que comprende como primera parte una parte derivada de un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno diana, y como segunda parte, un péptido derivado de virus unido covalentemente a un complejo de proteínas del MHC de clase I, así como el complejo mismo.

Con el complejo informado en la presente memoria pueden dirigirse células T citotóxicas circulantes existentes específicas de virus (células T de memoria o células T efectoras o ambas) de un individuo a células que expresan el antígeno diana, a las que se une específicamente la parte del complejo derivada de un anticuerpo, mediante la cobertura de dichas células con un complejo MHC de clase I que imita una infección vírica aguda por parte del péptido derivado del virus unido al complejo de proteínas del MHC de clase I.

Un aspecto informado en la presente memoria es un método para la producción recombinante de un complejo que comprende: i) un polipéptido de fusión de β 2-microglobulina y los dominios extracelulares α 1, α 2 y α 3 de

una molécula del MHC de clase I, ii) una pareja de cadenas polipeptídicas unidas mediante enlace disulfuro, comprendiendo cada una, una región bisagra de anticuerpo, e iii) por lo menos una pareja de un dominio variable de cadena ligera de anticuerpo y un dominio variable de cadena pesada de anticuerpo en una célula eucariótica, comprendiendo las etapas de: i) cultivar una célula eucariótica que comprende uno o más ácidos nucleicos codificantes del complejo, e ii) recuperar el complejo de la célula o del medio de cultivo, en el que el complejo comprende exactamente un polipéptido de fusión de β 2-microglobulina y los dominios extracelulares α 1, α 2 y α 3 de una molécula de MHC de clase I.

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

En una realización, el complejo se obtiene a una concentración de 1 mg/ml o superior en el medio de cultivo. En una realización, el complejo se obtiene a una concentración de 4 mg/ml o superior en el medio de cultivo.

En una realización, la célula eucariótica es una célula de mamífero. En una realización, la célula de mamífero es una célula renal embrionaria humana o una célula de ovario de hámster chino o una célula renal de hámster neonato o una célula de mieloma de ratón.

En una realización, el polipéptido de fusión comprende, en dirección N-terminal a C-terminal, una β 2-microglobulina y los dominios extracelulares α 1, α 2 y α 3 de una molécula de MHC de clase I que presenta una frecuencia relativa inferior al 1%.

En una realización, el polipéptido de fusión comprende un péptido inductor de respuesta de células T, una β 2-microglobulina y los dominios extracelulares α 1, α 2 y α 3 de una molécula de MHC de clase I que presenta una frecuencia relativa de 1% o superior.

En una realización, los polipéptidos de la pareja de cadenas polipeptídicas unidas mediante enlaces disulfuro derivada de una región bisagra de anticuerpo i) se encuentran unidas mediante uno o más enlaces disulfuro, ii) la primera cadena polipeptídica unida mediante disulfuro comprende, en dirección N-terminal a C-terminal, un dominio variable de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina, un dominio constante de cadena ligera o

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

- 5 En una realización, el polipéptido de fusión se encuentra: i) unido covalentemente al extremo C-terminal o al extremo N-terminal de una de las cadenas polipeptídicas unidas mediante disulfuro, o ii) unido covalentemente al extremo N-terminal de un dominio variable de anticuerpo que es el dominio variable de cadena pesada o ligera respectivo
- 10 complementario al comprendido en la primera cadena polipeptídica unida mediante disulfuro, o iii) unido covalentemente al extremo C-terminal de un dominio constante de anticuerpo que es el dominio constante de cadena pesada o ligera complementario al comprendido en la primera cadena polipeptídica unida mediante disulfuro.
- 15 En una realización, el péptido inductor de respuesta de células T es un péptido derivado de un virus.

En una realización, el polipéptido de fusión comprende, en dirección N-terminal a C-terminal:

- 20 (i) un péptido derivado de virus que presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEC ID nº 01 y SEC ID nº 09,
- (ii) un primer péptido conector que presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEC ID nº 16, 17, 18, 21, 22 y 23,
- 25 (iii) una β 2-microglobulina que presenta la secuencia de aminoácidos 10,
- (iv) un segundo péptido conector que presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEC ID nº 16, 17, 18, 21, 22 y 23,
- 30 (v) los dominios extracelulares α 1, α 2 y α 3 de una molécula del MHC de clase I que presenta una secuencia de aminoácidos SEC ID nº 11, y
- (vi) un tercer péptido conector que presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEC ID nº 12, 16, 17, 18, 21, 22 y 23.

En una realización, la primera cadena polipeptídica unida mediante disulfuro y la segunda cadena polipeptídica unida mediante disulfuro comprenden: i) un dominio CH2 de IgG1 humana que comprende una
5 secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEC ID nº 31, 32 y 33, y
un dominio CH3 de IgG1 humana que comprende una secuencia de
aminoácidos seleccionada de entre SEC ID nº 34, 35 y 36.

En una realización, el complejo comprende: i) un primer péptido conector
que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 21 y/o ii) un
segundo péptido conector que presenta la secuencia de aminoácidos SEC
10 ID nº 22, y/o iii) un tercer péptido conector que presenta la secuencia de
aminoácidos SEC ID nº 12, y/o iv) un dominio CH2 de IgG1 humana que
presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 32 ó 33, y/o v) en el
primer polipéptido unido mediante disulfuro, un dominio CH3 de IgG1
humana que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 35 y en el
15 segundo polipéptido unido mediante disulfuro, un dominio CH3 de IgG1
humana que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 36.

Un aspecto informado en la presente memoria es un complejo,
caracterizado porque comprende:

20 - un polipéptido de fusión que comprende, en dirección N-terminal a C-
terminal,

o bien

- (i) una β 2-microglobulina, y
- (ii) los dominios extracelulares α 1, α 2 y α 3 de una molécula de
MHC de clase I con una frecuencia relativa inferior a 1%,

25 o

- (i) un péptido inductor de respuesta de células T,
- (ii) una β 2-microglobulina, y
- (iii) los dominios extracelulares α 1, α 2 y α 3 de una molécula de
MHC de clase I con una frecuencia relativa de 1% o superior,

30 y

- dos cadenas polipeptídicas, que se encuentran unidas mediante uno o más enlaces disulfuro, en las que la primera cadena polipeptídica unida mediante disulfuro comprende, en dirección N-terminal a C-terminal,
 - 5 (i) un dominio variable de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina,
 - (ii) un dominio constante de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina, y
 - 10 (iii) un polipéptido de región bisagra de cadena pesada de anticuerpo,

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

en el que el polipéptido de fusión:

- 15 - se encuentra unido covalentemente al extremo C-terminal o N-terminal de una de las cadenas polipeptídicas unidas mediante disulfuro, o
- se encuentra unido covalentemente al extremo N-terminal de un dominio variable de anticuerpo que es el dominio variable de
- 20 cadena pesada o ligera complementario al comprendido en la primera cadena polipeptídica unida mediante disulfuro, o
- se encuentra unido covalentemente al extremo C-terminal de un dominio variable de anticuerpo que es el dominio variable de
- 25 cadena pesada o ligera complementario al comprendido en la primera cadena polipeptídica unida mediante disulfuro.

En una realización de todos los aspectos, el complejo es un complejo ligante de antígeno.

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

- 30 En una realización de todos los aspectos, la molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de 1% o superior presenta una frecuencia relativa de 10% o superior. En una realización, la molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de 10% o superior es HLA-A*0201 ó

HLA-A*1101 ó HLA-A*2402 ó HLA-A*340101 ó HLA-C*0304 ó HLA-C*0401
ó HLA-C*0702

En una realización de todos los aspectos, la molécula de MHC de clase I
con una frecuencia relativa de 10% o superior se selecciona dependiendo
de la región de origen del individuo en el que debe administrarse el
complejo, de la manera siguiente:

- para un individuo de origen europeo, la molécula de MHC de clase I se selecciona de entre el grupo que comprende HLA-A*0101, HLA-A*0201, HLA-A*0301, HLA-B*0702, HLA-B*0801, HLA-B*4402, HLA-C*0401, HLA-C*0501, HLA-C*0701 y HLA-C*0702,-
- para un individuo de origen australiano, la molécula de MHC de clase I se selecciona de entre el grupo que comprende HLA-A*0201, HLA-A*1101, HLA-A*2402, HLA-A*340101, HLA-B*1301, HLA-B*1521, HLA-B*5601, HLA-B*5602, HLA-C*0102, HLA-C*0401, HLA-C*0403 y HLA-C*1502,
- para un individuo de origen norteamericano, la molécula de MHC de clase I se selecciona de entre el grupo que comprende HLA-A*0201, HLA-A*2402, HLA-C*0202, HLA-C*0304, HLA-C*0401 y HLA-C*0702, y
- para un individuo de origen en el sudeste asiático, la molécula de MHC de clase I se selecciona de entre el grupo que comprende HLA-A*1101, HLA-A*2402, HLA-B*1504, HLA-C*0102, HLA-C*0304, HLA-C*0702 y HLA-C*0801.

En una realización de todos los aspectos, la molécula de MHC de clase I
con una frecuencia relativa de 10% o superior se selecciona dependiendo
de la región del individuo en el que debe administrarse el complejo, de la
manera siguiente:

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

- para un individuo de origen en el sudeste asiático, la molécula de MHC de clase I es HLA-A*2402.

5 En una realización de todos los aspectos, el polipéptido de fusión que comprende, en dirección N-terminal a C-terminal, una β 2-microglobulina y los dominios extracelulares α 1, α 2 y α 3 de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa inferior a 1% comprende además, en su extremo N-terminal, un péptido que se une al surco de unión a péptidos del MHC.

10 En una realización de todos los aspectos, el péptido inductor de una respuesta de células T es un péptido inductor de una respuesta de células T CD8⁺. En una realización, el péptido inductor de respuesta de células T es un péptido derivado de un virus.

15 En una realización de todos los aspectos, la molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa inferior al 1% se selecciona de entre el grupo que comprende HLA-B*4201, HLA-B*5901, HLA-B*6701 y HLA-B*7802

En una realización de todos los aspectos, el polipéptido de fusión comprende:

- (i) un péptido derivado de un virus,
- (ii) una β 2-microglobulina, y
- 20 (iii) el alelo de HLA-A soluble A*0201.

25 En una realización de todos los aspectos, el virus se selecciona de entre adenovirus, virus herpes humano 1, virus herpes humano 2, virus herpes humano 4 (virus de Epstein-Barr), virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, citomegalovirus humano, virus de la inmunodeficiencia humana, virus del papiloma humano tipo 16, virus del papiloma humano tipo 18, virus del papiloma humano tipo 31, virus del papiloma humano tipo 33, virus del papiloma humano tipo 35, virus del papiloma humano tipo 39, - virus del papiloma humano tipo 45, virus del papiloma humano tipo 51, virus del papiloma humano tipo 52, virus del papiloma humano tipo 56, virus del papiloma humano tipo 58, virus del papiloma humano tipo 59, virus del papiloma humano tipo 68, virus del papiloma humano tipo 73, virus del papiloma humano tipo 82, virus linfotrópico de células T humanas de tipo I, virus de la influenza A humano, virus de la influenza B humano, virus Vaccinia y virus Dengue.

En una realización de todos los aspectos, el péptido derivado de un virus se selecciona de entre NLVPMVATV (SEC ID nº 01), SLYNTVATL (SEC ID nº 02), GLCTLVAML (SEC ID nº 03), GILGFVFTL (SEC ID nº 04), STNRQSGRQ (SEC ID nº 05), LLFGYPVYV (SEC ID nº 06),
5 FAEGFVRAL (SEC ID nº 07), LIVIGILIL (SEC ID nº 08) o ILHTPGCV (SEC ID nº 09), WYAQIQPHW (SEC ID nº 52), AFSGVSWTM (SEC ID nº 53), ILIGVVITW (SEC ID nº 54), MMIPTVAAF (SEC ID nº 55), PFPQSNAPI (SEC ID nº 56), LLLTLLATV (SEC ID nº 57), IVLEHGSCV (SEC ID nº 58), LLFKTENG (SEC ID nº 59), PLNEAIMAV (SEC ID nº 60), NLVRLQSGV (SEC ID nº 61), LVISGLFPV (SEC ID nº 62), LLLVAHYAI (SEC ID nº 63), LALLAAFKV (SEC ID nº 64), VILAGPMPV (SEC ID nº 65), HVLGRLITV (SEC ID nº 66), VTEHDTLLY (SEC ID nº 67), NTDFRVLEL (SEC ID nº 68), CVETMCNEY (SEC ID nº 69), VLEETSVML (SEC ID nº 70), NLVPMVATV (SEC ID nº 71), RIFAELEGV (SEC ID nº 72), IYTRNHEV (SEC ID nº 73),
15 VLAELVKQI (SEC ID nº 74), AVGGAVASV (SEC ID nº 75), TVRSHCVSK (SEC ID nº 76), IMREFNSYK (SEC ID nº 77), GPISHGHVLK (SEC ID nº 78), ATVQGQNLK (SEC ID nº 79), VYALPLKML (SEC ID nº 80), AYAQKIFKIL (SEC ID nº 81), QYDPVAALF (SEC ID nº 82), YVKVYLESF (SEC ID nº 83), DIYRIFAE (SEC ID nº 84), VFETSGGLVV (SEC ID nº 85), KARDHLAVL (SEC ID nº 86), QARLTVSGL (SEC ID nº 87), KARAKKDEL (SEC ID nº 88), QIKVRVDMV (SEC ID nº 89), RRRHRQDAL (SEC ID nº 90), ARVYEIKCR (SEC ID nº 91), KMQVIGDQY (SEC ID nº 92), NVRRSWEEL (SEC ID nº 93), CPSQEPMSIYVY (SEC ID nº 94), KPGKISHIMLDVA (SEC ID nº 95), ELRRKMMYM (SEC ID nº 96),
25 IPSINVHHY (SEC ID nº 97), FEQPTETPP (SEC ID nº 98), YAYIYTTYL (SEC ID nº 99), QEFFWDANDIY (SEC ID nº 100), YEQHKITSY (SEC ID nº 101), QEPMSIYVY (SEC ID nº 102), SEHPTFTSQY (SEC ID nº 103), QAIRETVEL (SEC ID nº 104), TRATKMQVI (SEC ID nº 105), DALPGPCI (SEC ID nº 106), CEDVPSGKL (SEC ID nº 107), HERNGFTVL (SEC ID nº 108), PTFTSQYRIQGKL (SEC ID nº 109), QMWQARLTV (SEC ID nº 110), HELLVLVKAQL (SEC ID nº 111), o DDYSNTHSTRYV (SEC ID nº 112), o una variante de los mismos que comprende entre 1 y 3 intercambios, adiciones y/o deleciones de aminoácidos.

En una realización de todos los aspectos, la β 2-microglobulina es la β 2-microglobulina humana. En una realización, la β 2-microglobulina es la β 2-microglobulina humana de tipo salvaje. En una realización, la β 2-microglobulina consiste de la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 10 ó

una variante de los mismos que comprende entre 1 y 10 intercambios, adiciones y/o deleciones de aminoácidos.

5 En una realización de todos los aspectos, la β 2-microglobulina es la β 2-microglobulina humana y la molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de 10% o superior es la HLA-A*0201 humana. En una realización, los dominios extracelulares α 1, α 2 y α 3 de una molécula de MHC de clase I consisten de la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 11 ó una variante de los mismos que comprende entre 1 y 10 intercambios, adiciones y/o deleciones de aminoácidos.

10 En una realización de todos los aspectos, el péptido derivado de un virus se fusiona con la β 2-microglobulina mediante un primer péptido conector. En una realización, el péptido derivado de un virus se fusiona con el extremo N-terminal de la β 2-microglobulina.

15 En una realización de todos los aspectos, la β 2-microglobulina se fusiona con el dominio extracelular α 1 de una molécula de MHC de clase I mediante un segundo péptido conector.

20 En una realización de todos los aspectos, los dominios extracelulares α 3 de una molécula de MHC de clase I se fusionan con una de las cadenas polipeptídicas unidas mediante disulfuros, mediante un tercer péptido conector.

En una realización de todos los aspectos, el primer, segundo y tercer péptidos conectores son iguales o diferentes.

25 En una realización de todos los aspectos, el primer péptido conector, el segundo péptido conector y el tercer péptido conector se seleccionan, independientemente, de entre las secuencias de aminoácidos GS (SEC ID nº 12), GGS (SEC ID nº 13), GGGS (SEC ID N° 14), GGGSGGGS (SEC ID nº 15), GGGSGGGS GGGS (SEC ID nº 16), GGGSGGGS GGGSGGGS (SEC ID nº 17), GGGSGGGS GGGSGGGS GGGS (SEC ID nº 18), GGGGS (SEC ID nº 19), GGGSGGGS (SEC ID nº 20), GGGSGGGS GGGGS (SEC ID nº 21), GGGSGGGS GGGSGGGS GGGS (SEC ID nº 22) y GGGSGGGS GGGSGGGS GGGSGGGS (SEC ID nº 23).

30

En una realización de todos los aspectos, el primer péptido conector comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 21.

En una realización de todos los aspectos, el segundo péptido conector comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 22.

En una realización de todos los aspectos, el tercer péptido conector comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 12.

5 En una realización de todos los aspectos, el polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo se selecciona de entre un polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de un anticuerpo humano de la clase IgG o de la clase IgE.

10 En una realización de todos los aspectos, el polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo se selecciona de entre un polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de un anticuerpo humano de la subclase IgG1, IgG2, IgG3 ó IgG4.

15 En una realización de todos los aspectos, el polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de un anticuerpo comprende, o consiste de la secuencia de aminoácidos EPKSCDKTHTCPPCP (SEC ID nº 24), EPKSADKTHTCPPCP (SEC ID nº 25), ERKCCVECPGPCP (SEC ID nº 26), ERKCAVECPGPCP (SEC ID nº 27), ERKACVECPGPCP (SEC ID nº 28), ELKTPLGDTTHTCPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP)₃ (SEC ID nº 29), ESKYGPPCPSCP (SEC ID nº 30), DKTHTCPPCP (SEC ID nº 47),
20 VECPPCP (SEC ID nº 48), AVECPGPCP (SEC ID nº 49), DTTHTCPRCP (SEC ID nº 50) o PPCPSCP (SEC ID nº 51).

25 En una realización de todos los aspectos, el primer polipéptido unido mediante disulfuro y/o el segundo polipéptido unido mediante disulfuro comprende un dominio CH2 y/o un dominio CH3 de origen humano. En una realización, el dominio CH2 y el dominio CH3 de origen humano son de un anticuerpo humano de clase IgG o IgE. En una realización, el dominio CH2 y el dominio CH3 son de un anticuerpo humano de la subclase IgG1, IgG2, IgG3 ó IgG4. En una realización, el dominio CH2 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 31. En una
30 realización, el dominio CH2 es de un anticuerpo humano de la subclase IgG1 ó IgG2 y comprende por lo menos una mutación en E233, L234, L235, G236, D265, D270, N297, E318, K320, K322, A327, P329, A330 y/o P331 (numeración según el índice EU de Kabat). En una realización, el dominio CH2 es de un anticuerpo humano de la subclase IgG1 ó de la
35 subclase IgG2 humanas con las mutaciones L234A y L235A, y/o con las

mutaciones D265A y N297A, y/o contiene la mutación PVA236 y/o contiene la mutación P329G. En una realización, el dominio CH2 es de un anticuerpo humano de la subclase IgG1 con las mutaciones L234A y L235A y/o P329G. En una realización, el dominio CH2 es de un anticuerpo humano de la subclase IgG4 con las mutaciones S228P y/o L235E. En una realización, el dominio CH2 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 32 ó a la secuencia SEC ID nº 33. En una realización, el dominio CH3 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 34.

En una realización de todos los aspectos, el primer polipéptido unido mediante disulfuro comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 35 y el segundo polipéptido unido mediante disulfuro comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 36.

En una realización de todos los aspectos, el primer y el segundo polipéptidos unidos mediante disulfuros comprenden la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 37 ó SEC ID nº 38.

En una realización de todos los aspectos, el primer y el segundo polipéptidos unidos mediante disulfuros consisten de la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 37 ó a la secuencia SEC ID nº 38.

En una realización de todos los aspectos, el primer polipéptido unido mediante disulfuro comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 39 y el segundo polipéptido unido mediante disulfuro comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 40.

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

En una realización de todos los aspectos, el complejo se caracteriza porque el polipéptido de fusión comprende, en dirección N-terminal a C-terminal:

(i) un péptido derivado de virus que presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que comprende SEC ID nº 01 y SEC ID nº 09,

- (ii) un primer péptido conector que presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que comprende SEC ID nº 16, 17, 18, 21, 22 y 23.
- 5 (iii) una β 2-microglobulina que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 10 ó una variante de la misma que comprende entre 1 y 10 intercambios, adiciones y/o deleciones de aminoácidos.
- (iv) un segundo péptido conector que presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que comprende SEC ID nº 16, 17, 18, 21, 22 y 23.
- 10 (v) los dominios extracelulares α 1, α 2 y α 3 de una molécula del MHC de clase I que presenta una secuencia de aminoácidos SEC ID nº 11 ó una variante de la misma que comprende entre 1 y 10 intercambios, adiciones y/o deleciones de aminoácidos.
- 15 (vi) un tercer péptido conector que presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que comprende SEC ID nº 12, 16, 17, 18, 21, 22 y 23.

En una realización de todos los aspectos, el primer polipéptido unido mediante disulfuro y el segundo polipéptido unido mediante disulfuro comprende además:

- 20 - un dominio CH2 de IgG1 humana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEC ID nº 31, 32 y 33, y
- un dominio CH3 de IgG1 humana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEC ID nº 34, 35 y 36.

25 En una realización de todos los aspectos, el complejo se caracteriza porque comprende:

- un polipéptido de fusión que comprende, en dirección N-terminal a C-terminal:
 - 30 (i) un péptido derivado de virus que presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEC ID nº 01 y SEC ID nº 09,
 - (ii) un primer péptido conector que presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEC ID nº 16, 17, 18, 21, 22 y 23.
 - 35 (iii) una β 2-microglobulina que presenta una secuencia de aminoácidos SEC ID nº 10 ó una variante de la misma que

comprende entre 1 y 10 intercambios, adiciones y/o deleciones de aminoácidos.

- 5 (iv) un segundo péptido conector que presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEC ID nº 16, 17, 18, 21, 22 y 23.
- (v) los dominios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de una molécula del MHC de clase I que presenta una secuencia de aminoácidos SEC ID nº 11 ó una variante de la misma que comprende entre 1 y 10 intercambios, adiciones y/o deleciones de aminoácidos.
- 10 (vi) un tercer péptido conector que presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEC ID nº 12, 16, 17, 18, 21, 22 y 23,

y

- 15 - dos cadenas polipeptídicas, que se encuentran unidas mediante uno o más enlaces disulfuro, en las que la primera cadena polipeptídica unida mediante disulfuro comprende, en dirección N-terminal a C-terminal,
- (i) un dominio variable de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina,
- 20 (ii) un dominio constante de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina,
- (iii) un polipéptido de región bisagra de cadena pesada de anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEC ID nº 24 y SEC ID nº 30, y de entre SEC ID nº 47 y SEC ID nº 51,
- 25 (iv) un dominio CH2 de IgG1 humana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEC ID nº 31, 32 y 33, y
- (v) un dominio CH3 de IgG1 humana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEC ID nº 34, 35 y 36,
- 30

y el segundo polipéptido unido mediante disulfuro comprende, en dirección N-terminal a C-terminal:

- 35 (i) un polipéptido de región bisagra de cadena pesada de anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos

seleccionada de entre SEC ID nº 24 y SEC ID nº 30, y de entre SEC ID nº 47-51,

- 5
- (ii) un dominio CH2 de IgG1 humana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEC ID nº 31, 32 y 33, y
 - (iii) un dominio CH3 de IgG1 humana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEC ID nº 34, 35 y 36,

en el que el polipéptido de fusión:

- 10
- se encuentra unido covalentemente al extremo C-terminal o N-terminal de una segunda cadena polipeptídica unida mediante disulfuro.

En una realización de todos los aspectos, la primera y segunda cadenas polipeptídicas unidas mediante disulfuro comprenden el mismo polipéptido de región bisagra de cadena pesada de anticuerpo.

15

En una realización de todos los aspectos, el polipéptido derivado de virus comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 01, el primer péptido conector comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 21, el segundo péptido conector comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 22, el tercer péptido conector comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 12, el dominio CH2 de la IgG1 humana comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 32 ó 33, y el dominio CH3 de la IgG1 humana de un polipéptido unido mediante disulfuro comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 35 y el dominio CH3 de la IgG1 humana del otro polipéptido unido mediante disulfuro comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 36.

20

25

En una realización de todos los aspectos, el complejo se caracteriza porque comprende:

- 30
- un polipéptido de fusión que comprende, en dirección N-terminal a C-terminal:
 - (i) un péptido derivado de virus que presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEC ID nº 01 y SEC ID nº 09,

- (ii) un primer péptido conector que presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEC ID nº 16, 17, 18, 21, 22 y 23.
- 5 (iii) una β 2-microglobulina que presenta una secuencia de aminoácidos SEC ID nº 10 ó una variante de la misma que comprende entre 1 y 10 intercambios, adiciones y/o deleciones de aminoácidos.
- 10 (iv) un segundo péptido conector que presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEC ID nº 16, 17, 18, 21, 22 y 23.
- 15 (v) los dominios extracelulares α 1, α 2 y α 3 de una molécula del MHC de clase I que presenta una secuencia de aminoácidos SEC ID nº 11 ó una variante de la misma que comprende entre 1 y 10 intercambios, adiciones y/o deleciones de aminoácidos.
- (vi) un tercer péptido conector que presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEC ID nº 12, 16, 17, 18, 21, 22 y 23,
- y
- 20 - dos cadenas polipeptídicas, que se encuentran unidas mediante uno o más enlaces disulfuro,
- en las que la primera cadena polipeptídica unida mediante disulfuro comprende, en dirección N-terminal a C-terminal,
- 25 (i) un dominio variable de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina
- (ii) un dominio constante de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina,
- 30 (iii) un polipéptido de región bisagra de cadena pesada de anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEC ID nº 24 y SEC ID nº 30, y de entre SEC ID nº 47-51,
- (iv) un dominio CH2 de IgG1 humana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEC ID nº 31, 32 y 33, y

(v) un dominio CH3 de IgG1 humana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEC ID nº 34, 35 y 36,

5 y la segunda cadena polipeptídica unida mediante disulfuro comprende un polipéptido de región bisagra de cadena pesada de anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEC ID nº 24 y SEC ID nº 30 y SEC ID nº 47-51,

en el que el polipéptido de fusión:

- 10 - se encuentra unido covalentemente al extremo C-terminal o N-terminal de la primera cadena polipeptídica unida mediante disulfuro, o
- 15 - se encuentra unido covalentemente al extremo N-terminal de un dominio variable de anticuerpo que es el dominio variable de cadena pesada o ligera complementario al comprendido en la primera cadena polipeptídica unida mediante disulfuro, o
- 20 - se encuentra unido covalentemente al extremo C-terminal de un dominio variable de anticuerpo que es el dominio variable de cadena pesada o ligera complementario al comprendido en la primera cadena polipeptídica unida mediante disulfuro.

En una realización de todos los aspectos, el polipéptido derivado de virus comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 01, el primer péptido conector comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 21, el segundo péptido conector comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 22, el tercer péptido conector comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 12, el dominio CH2 de la IgG1 humana comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 32 ó 33, y el dominio CH3 de la IgG1 humana de un polipéptido unido mediante disulfuro comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 35 y el dominio CH3 de la IgG1 humana del otro polipéptido unido mediante disulfuro comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 36.

En una realización de todos los aspectos, el complejo se caracteriza porque comprende:

- un polipéptido de fusión que comprende, en dirección N-terminal a C-terminal:

- (i) un péptido derivado de virus que presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEC ID nº 01 y SEC ID nº 09,
- (ii) un primer péptido conector que presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEC ID nº 16, 17, 18, 21, 22 y 23.
- (iii) una β 2-microglobulina que presenta una secuencia de aminoácidos SEC ID nº 10 ó una variante de la misma que comprende entre 1 y 10 intercambios, adiciones y/o deleciones de aminoácidos.
- (iv) un segundo péptido conector que presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEC ID nº 16, 17, 18, 21, 22 y 23.
- (v) los dominios extracelulares α 1, α 2 y α 3 de una molécula del MHC de clase I que presenta una secuencia de aminoácidos SEC ID nº 11 ó una variante de la misma que comprende entre 1 y 10 intercambios, adiciones y/o deleciones de aminoácidos.
- (vi) un tercer péptido conector que presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEC ID nº 12, 16, 17, 18, 21, 22 y 23,

y

- dos cadenas polipeptídicas, que se encuentran unidas mediante uno o más enlaces disulfuro, en las que la primera y segunda cadenas polipeptídicas unidas mediante disulfuro comprenden, en dirección N-terminal a C-terminal:
 - (i) un dominio variable de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina,
 - (ii) un dominio constante de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina,
 - (iii) un polipéptido de región bisagra de cadena pesada de anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEC ID nº 24 y SEC ID nº 30, y de entre SEC ID nº 47-51,

(iv) un dominio CH2 de IgG1 humana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEC ID nº 31, 32 y 33, y

5 (v) un dominio CH3 de IgG1 humana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEC ID nº 34, 35 y 36,

en el que el polipéptido de fusión:

- 10 - se encuentra unido covalentemente al extremo C-terminal o N-terminal de la segunda cadena polipeptídica unida mediante disulfuro, o
- se encuentra unido covalentemente al extremo N-terminal de un dominio variable de anticuerpo que es el dominio variable de cadena pesada o ligera complementario al comprendido en la primera cadena polipeptídica unida mediante disulfuro, o
- 15 - se encuentra unido covalentemente al extremo C-terminal de un dominio variable de anticuerpo que es el dominio variable de cadena pesada o ligera complementario al comprendido en la primera cadena polipeptídica unida mediante disulfuro.

20 En una realización de todos los aspectos, el polipéptido derivado de virus comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 01, el primer péptido conector comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 21, el segundo péptido conector comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 22, el tercer péptido conector comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 12, el dominio CH2 de la IgG1 humana comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 32 ó 33, y el dominio CH3 de la IgG1 humana de un polipéptido unido mediante disulfuro comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 35 y el dominio CH3 de la IgG1 humana del otro polipéptido unido mediante disulfuro comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 36.

30 En una realización de todos los aspectos:

- el primer péptido conector comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 21, y/o
- el segundo péptido conector comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 22, y/o

- el tercer péptido conector comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 12, y/o
 - el dominio CH2 de la IgG1 humana comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 32 ó 33, y/o
 - 5 - el dominio CH3 de la IgG1 humana de un polipéptido unido mediante disulfuro comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 35 y el dominio CH3 de la IgG1 humana del otro polipéptido unido mediante disulfuro comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 36.
- 10 En una realización de todos los aspectos, el péptido derivado de un virus se selecciona de entre el grupo que comprende las secuencias SEC ID nº 01 y SEC ID nº 09, SEC ID nº 52 a SEC ID nº 112 ó es una variante de los mismos que comprende entre 1 y 3 intercambios, adiciones y/o deleciones de aminoácidos.
- 15 Un aspecto indicado en la presente memoria es el ácido nucleico codificante del complejo indicado en la presente memoria.
- En una realización, el ácido nucleico comprende dos a cuatro casetes de expresión que comprenden genes estructurales codificantes de polipéptidos de diferente secuencia de aminoácidos.
- 20 Un aspecto indicado en la presente memoria es una célula huésped que comprende el ácido nucleico indicado en la presente memoria.
- Un aspecto indicado en la presente memoria es un método para producir un complejo tal como se indica en la presente memoria, que comprende cultivar la célula huésped indicada en la presente memoria de manera que
- 25 se produce el complejo.
- En una realización, el complejo se recupera a partir de las células o del medio de cultivo y de esta manera se produce el complejo.
- Un aspecto indicado en la presente memoria es un inmunoconjugado que comprende el complejo indicado en la presente memoria y un agente
- 30 citotóxico.
- Un aspecto indicado en la presente memoria es una formulación farmacéutica que comprende el complejo indicado en la presente memoria y opcionalmente un portador farmacéuticamente aceptable.

En una realización, la formulación farmacéutica comprende además un agente terapéutico adicional.

Un aspecto indicado en la presente memoria es el complejo indicado en la presente memoria para la utilización a modo de medicamento.

- 5 Un aspecto indicado en la presente memoria es el complejo indicado en la presente memoria para la utilización en el tratamiento del cáncer o de una infección vírica crónica.

- 10 Un aspecto indicado en la presente memoria es el complejo indicado en la presente memoria para la utilización en la atracción de células T citotóxicas específicas de un virus de un individuo a una diana.

Un aspecto indicado en la presente memoria es el complejo indicado en la presente memoria para la utilización en la eliminación de células de cáncer o de células infectadas por virus.

- 15 Un aspecto indicado en la presente memoria es la utilización del complejo indicado en la presente memoria en la preparación de un medicamento.

En una realización, el medicamento está destinado al tratamiento del cáncer o de una infección vírica crónica.

En una realización, el medicamento está destinado a la atracción de células T citotóxicas específicas de virus de un individuo a una diana.

- 20 En una realización, el medicamento está destinado a la eliminación de células de cáncer o de células infectadas por virus.

- 25 Un aspecto indicado en la presente memoria es un método para el tratamiento de un individuo que presenta cáncer o una infección vírica crónica, que comprende administrar en el individuo una cantidad efectiva del complejo indicado en la presente memoria.

En una realización, el método comprende además administrar un agente terapéutico individual en el individuo.

- 30 Un aspecto indicado en la presente memoria es un método para la atracción de células T citotóxicas específicas de virus de un individuo a una diana en el individuo, que comprende administrar en el mismo una cantidad

efectiva del complejo indicado en la presente memoria para atraer las células T citotóxicas específicas de virus de un individuo a una diana.

Un aspecto indicado en la presente memoria es un método de eliminación de células de cáncer o de células infectadas por virus, que comprende
5 administrar en el individuo una cantidad efectiva del complejo indicado en la presente memoria para eliminar/desintegrar las células de cáncer o las células infectadas por virus.

Descripción detallada de la invención

Breve descripción de las figuras

- 10 **Figura 1** Esquema anotado de los complejos indicados en la presente memoria.
- Figura 2** Polipéptidos ejemplares comprendidos en el complejo indicado en la presente memoria: los polipéptidos de fusión se fusionaron N-terminalmente con un polipéptido
15 que comprendía una cadena ligera de anticuerpo o una región bisagra de cadena pesada de anticuerpo.
- Figura 3** Transferencia western de un gel de SDS-poliacrilamida de sobrenadante de cultivo de células HEK293 transfectadas con los plásmidos de expresión correspondientes. La tinción se llevó a cabo con anticuerpo policlonal de conejo anti-cadena ligera κ humana y anticuerpo policlonal de conejo anti-IgG humana conjugado con peroxidasa de rábano picante.
20
- Carriles: 1: péptido de dos brazos $\beta 2$ -microglobulina-HLA-A0201-Fc de IgG; 2: péptido de un brazo $\beta 2$ -microglobulina-HLA-A0201-Fc de IgG + Fc de IgG; 3: péptido de un brazo $\beta 2$ -microglobulina-HLA-A0201-cadena pesada de IgG + cadena ligera de IgG; 4: péptido de un brazo $\beta 2$ -microglobulina-HLA-A0201-cadena pesada de IgG + cadena ligera de IgG; 5: péptidos de dos brazos $\beta 2$ -microglobulina-HLA-A0201-cadena ligera de IgG + cadena pesada de IgG; 6: péptidos de dos brazos $\beta 2$ -microglobulina-HLA-A0201-cadena ligera de IgG + cadena pesada de IgG; 7: péptidos de dos brazos
25 $\beta 2$ -microglobulina-HLA-A0201-cadena pesada de IgG +
30
35

		cadena ligera de IgG;8: péptido de dos brazos β2-microglobulina-HLA-A0201-Fc de IgG-scFv;9: péptido de un brazo β2-microglobulina-HLA-A0201-Fc de IgG + IgG de un brazo (cadenas pesada y ligera);10: marcador de peso molecular;11: anticuerpo IgG1 estándar de referencia.
5	Figura 4	Análisis de citometría de flujo para determinar el número de células T citolíticas específicas del CMV procedentes de diferentes donadores antes y después de la estimulación <i>in vitro</i> con péptido específico: Análisis de linfocitos de sangre periférica (PBLs) derivados de 4 donantes humanos; anticuerpo anti-CD8 conjugado con tinción de marcaje FITC (BD, nº de cat. 345772) combinado con TCR teñido con APC pentámero Pro5 (Prolimmune, nº de cat. F008-4A-E) que reconoce el MHC de clase I (HLA-A*0201) cargado con péptido derivado del CMV (NLVPMVATV, SEC ID nº 01); círculos: células T CD8⁺ específicas del CMV.
10		
15	Figura 5	Análisis de citometría de flujo para analizar la capacidad citolítica de las CTLs estimuladas mediante lisis de células tumorales MN60 cargadas con péptido de CMV.
20	Figura 6	Eliminación específica de células T pulsadas con CMV: análisis de citometría de flujo para analizar la capacidad citolítica de las CTLs estimuladas mediante lisis de células tumorales MN60 cargadas con péptido de CMV según la proporción de células efectoras a células diana; columnas
25		negras: células MN60 cargadas con péptido del CMV; columnas blancas: células MN60 no cargadas con péptido del CMV.
	Figura 7	A: Gel SDS-PAGE con tinción de Coomassie: carril 1: estándar de peso molecular; carril 2: péptido de un brazo β2-microglobulina-HLA-A0201-Fc de IgG + complejo de IgG de un brazo (cadenas pesada y ligera), condiciones no reductoras; carril 3: péptido de un brazo β2-microglobulina-HLA-A0201-Fc de IgG + complejo de IgG de un brazo (cadenas pesada y ligera); condiciones reductoras.
30		
35		B: Cromatograma de cromatografía de exclusión por tamaño; 1: formas de elevado peso molecular (0,7% del área); 2: complejo monomérico (99,3% del area).

Figura 8

A: Gel SDS-PAGE con tinción de Coomassie: carril 1: estándar de peso molecular; carril 2: péptido de un brazo β 2-microglobulina-HLA-A0201-cadena pesada de IgG + cadena ligera de IgG + complejo de Fc de IgG, condiciones no reductoras; carril 3: péptido de un brazo β 2-microglobulina-HLA-A0201-cadena pesada de IgG + cadena ligera de IgG + complejo de IgG-Fc, condiciones reductoras.

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

Figura 9

Análisis de la unión de un complejo indicado en la presente memoria a una línea celular humana positiva para IGF-1R utilizando FACS:

1: células H460M2 incubadas con péptido de un brazo β 2-microglobulina-HLA-A0201-cadena pesada de IgG + cadena ligera de IgG + complejo de Fc de IgG, no teñidas;

2: células H460M2 incubadas con péptido de un brazo β 2-microglobulina-HLA-A0201-cadena pesada de IgG + cadena ligera de IgG + complejo de Fc de IgG a 4°C; teñidas con anticuerpo anti<IgG humana> marcado fluorescentemente;

3: células H460M2 incubadas con péptido de un brazo β 2-microglobulina-HLA-A0201-cadena pesada de IgG + cadena ligera de IgG + complejo de Fc de IgG a 37°C; teñidas con anticuerpo anti<IgG humana> marcado fluorescentemente;

4: células H460M2 incubadas con péptido de un brazo β 2-microglobulina-HLA-A0201-cadena pesada de IgG + cadena ligera de IgG + complejo de Fc de IgG; teñidas con anticuerpo de control marcado fluorescentemente (anticuerpo anti-DIG);

5: células H460M2 teñidas con anticuerpo anti-IgG humana marcado fluorescentemente;

6: células H460M2 teñidas con anticuerpo anti-IGF-1R humana marcado fluorescentemente;

- 5 **Figura 10** Imágenes de microscopía de la lisis de células 3T3 I24 expresantes de IGF-1R humano mediada por el complejo de unión a antígeno indicado en la presente memoria (células de crecimiento mayoritariamente adherente, punta de flecha blanca). La lisis se encuentra mediada por células T humanas específicas del CMV (células pequeñas de forma redondeada, flecha blanca, o células migratorias ameboides, flecha negra).
- 10 **Figura 11** Imágenes de microscopía de células 3T3 I24 (células de crecimiento adherente grandes, punta de flecha blanca) incubadas con células T humanas específicas del CMV (células pequeñas de forma redondeada, flecha blanca, o células migratorias ameboides, flecha negra) en ausencia de un complejo indicado en la presente memoria.
- 15 **Figura 12** Ensayo de citotoxicidad: el complejo de unión a antígeno indicado en la presente memoria induce la lisis de las células tumorales H460M2 mediada por células T humanas específicas del CMV. a) células diana (6 h): células T efectoras específicas del CMV 1:1,5; b) células diana (6 h): células T efectoras específicas del CMV 1:0,75; c) células diana (6 h): células T efectoras específicas del CMV 1:0,5; columnas a la izquierda: complejo indicado en la presente memoria; columnas a la derecha: MAB de IGF-1R afucosilado.
- 20
- 25 **Figura 13** Ensayo de citotoxicidad: el complejo de unión a antígeno indicado en la presente memoria induce la lisis de las células tumorales 3T3 I24 mediada por células T humanas específicas del CMV. a) células diana (9 h): células T efectoras específicas del CMV 1:1,5; b) células diana (9 h): células T efectoras específicas del CMV 1:0,75; c) células diana (9 h): células T efectoras específicas del CMV 1:0,5; columnas a la izquierda: complejo indicado en la presente memoria; columnas centrales: MAB de IGF-1R afucosilado; columnas a la derecha: anticuerpo anti-digoxigenina.
- 30
- 35 **Figura 14** Análisis de FACS de la unión del anticuerpo anti-IGF-1R y complejos indicados en la presente memoria a la línea celular de adenocarcinoma pulmonar H460M2; a)

- anticuerpo secundario únicamente (anticuerpo de cabra anti-IgG(H+L) humana (Jackson Laboratories, nº de cat. 109-116-088)); b) complejo indicado en la presente memoria, en el que el polipéptido de fusión se fusiona con el extremo N-terminal de la cadena pesada de un anticuerpo anti-IGF-1R que comprende únicamente una pareja de dominios variables; c) anticuerpo anti-IGF-1R.
- Figura 15** Eficacia y especificidad *in vitro* (ensayo de citotoxicidad) de diferentes complejos indicados en la presente memoria; a) complejo que comprende un anticuerpo anti-IGF-1R monovalente y un péptido derivado del CMV; b) complejo que comprende un anticuerpo anti-IGF-1R monovalente y un péptido derivado del EBV (control); c) complejo que comprende un anticuerpo anti-IGF-1R bivalente y un péptido derivado del CMV; d) anticuerpo anti-IGF-1R (control); e) anticuerpo anti-digoxigenina (control).
- Figura 16** Eficacia y especificidad *in vitro* (valor EC50) de un complejo indicado en la presente memoria, en el que el polipéptido de fusión se fusiona con el extremo N-terminal de la cadena pesada de un anticuerpo anti-IGF-1R completo, determinadas a diferentes proporciones de células diana (T) a células efectoras (E).
- Figura 17** Lisis de células diana tras 6 horas de incubación con: a) un complejo que comprende un anticuerpo anti-IGF-1R monovalente y un polipéptido de fusión que comprende un péptido derivado del CMV, y b) un anticuerpo anti-IGF-1R a una proporción de células diana a células efectoras de 1:1,5.

Breve descripción de las secuencias

- 30 **SEC ID nº 01** Péptido derivado del citomegalovirus humano.
SEC ID nº 02 Péptido derivado del virus de la inmunodeficiencia humana.
SEC ID nº 03 Péptido derivado del virus herpes humano 4.
SEC ID nº 04 Péptido derivado del virus influenza A.
35 **SEC ID nº 05** Péptido derivado del virus de la hepatitis B.
SEC ID nº 06 Péptido derivado del virus linfotrópico humano de células T de tipo 1.

	SEC ID nº 07	Péptido derivado del homólogo del oncogén (JUN) del virus 17 del sarcoma V-jun.
	SEC ID nº 08	Péptido derivado del adenovirus humano de tipo 3.
	SEC ID nº 09	Péptido derivado del virus de la hepatitis C.
5	SEC ID nº 10	Secuencia de aminoácidos de la β 2-microglobulina humana.
	SEC ID nº 11	Secuencia de aminoácidos de la cadena α 1- α 3 del antígeno HLA-A*0201 humano.
	SEC ID nº 12 a 23	Secuencias de aminoácidos de péptido conector.
10	SEC ID nº 24	Secuencia de aminoácidos del polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de la IgG1 humana.
	SEC ID nº 25	Secuencia de aminoácidos del polipéptido variante de la bisagra de la cadena pesada de la IgG1 humana.
	SEC ID nº 26	Secuencia de aminoácidos del polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de la IgG2 humana.
15	SEC ID nº 27	Secuencia de aminoácidos del polipéptido variante de la región bisagra de la cadena pesada de la IgG2 humana.
	SEC ID nº 28	Secuencia de aminoácidos del polipéptido variante de la región bisagra de la cadena pesada de la IgG2 humana.
20	SEC ID nº 29	Secuencia de aminoácidos del polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de la IgG3 humana.
	SEC ID nº 30	Secuencia de aminoácidos del polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de la IgG4 humana.
25	SEC ID nº 31	Secuencia de aminoácidos del dominio CH2 de la IgG1 humana.
	SEC ID nº 32	Secuencia de aminoácidos del dominio CH2 de la IgG1 humana mutante L234A, L235A.
30	SEC ID nº 33	Secuencia de aminoácidos del dominio CH2 de la IgG1 humana mutante L234A, L235A, P329G.
	SEC ID nº 34	Secuencia de aminoácidos del dominio CH3 de la IgG1 humana.
	SEC ID nº 35	Secuencia de aminoácidos del dominio CH3 de la IgG1 humana de botón variante.
35	SEC ID nº 36	Secuencia de aminoácidos del dominio CH3 de la IgG1 humana de ojal variante.

	SEC ID nº 37	Secuencia de aminoácidos de la región Fc de la IgG1 humana.
	SEC ID nº 38	Secuencia de aminoácidos de la región Fc de la IgG1 humana mutante L234A, L235A.
5	SEC ID nº 39	Secuencia de aminoácidos de la región Fc de la IgG1 humana mutante L234A, L235A y de botón variante.
	SEC ID nº 40	Secuencia de aminoácidos de la región Fc de la IgG1 humana mutante L234A, L235A y de botón variante.
10	SEC ID nº 41	Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera (kappa) del anticuerpo monoclonal anti-IGF-1R humanizado.
	SEC ID nº 42	Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal anti-IGF-1R humanizado (IgG1 mutante L234A, L235A).
15	SEC ID nº 43	Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal anti-IGF-1R humanizado (IgG1 mutante L234A, L235A y de botón variante).
	SEC ID nº 44	Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal anti-IGF-1R humanizado (IgG1 mutante L234A, L235A y de ojal variante).
20	SEC ID nº 45	Región bisagra de región Fc mutante de la IgG1 humana y mutante L234A, L235A y de botón variante.
	SEC ID nº 46	Fv de una cadena estabilizado por disulfuro del anticuerpo monoclonal anti-IGF-1R humanizado.
25	SEC ID nº 47-51	Secuencias de aminoácidos cortas del polipéptido de región bisagra de cadena pesada de anticuerpo humano.
	SEC ID nº 52-66	Péptidos derivados del virus Dengue.
	SEC ID nº 67-112	Péptidos derivados del citomegalovirus humano.

I. DEFINICIONES

30	El término "afinidad" se refiere a la magnitud de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo un anticuerpo) y su pareja de unión (por ejemplo un antígeno). A menos que se indique lo contrario, tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión
35	intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre los miembros de una pareja de unión (por ejemplo anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X para su pareja Y puede representarse de manera general mediante la

constante de disociación (Kd). La afinidad puede medirse mediante métodos comunes conocidos de la técnica, incluyendo los descritos en la presente memoria. A continuación se describen realizaciones específicas ilustrativas y ejemplares para medir la afinidad de unión.

5 El término "aminoácido" tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere al grupo de carboxi α -aminoácidos, que directamente o en forma de un precursor pueden encontrarse codificados por un ácido nucleico. Los aminoácidos individuales se encuentran codificados por ácidos nucleicos consistentes de tres nucleótidos, denominados codones o tripletes de
10 bases. Cada aminoácido se encuentra codificado por como mínimo un codón. Esto se conoce como "degeneración del código genético". El término "aminoácido" tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere a los carboxi α -aminoácidos naturales que comprenden alanina (código de tres letras: ala, código de una letra: A), arginina (arg, R), asparagina (asn, N), ácido aspártico (asp, D), cisteína (cys, C), glutamina (gln, Q), ácido
15 glutámico (glu, E), glicina (gly, G), histidina (his, H), isoleucina (ile, I), leucina (leu, L), lisina (lys, K), metionina (met, M), fenilalanina (phe, F), prolina (pro, P.), serina (ser, S), treonina (thr, T), triptófano (trp, W), tirosina (tyr, Y) y valina (val, V).

20 Las expresiones "anticuerpo anti-diana" y "un anticuerpo que se une a una diana" se refieren a un anticuerpo que es capaz de unirse a una diana con suficiente afinidad para que el anticuerpo resulte útil como agente diagnóstico y/o terapéutico de reconocimiento de la diana. En determinadas realizaciones, un anticuerpo que se une a la diana presenta
25 una constante de disociación (Kd) ≤ 10 nM, ≤ 1 nM, $\leq 0,1$ nM, $\leq 0,01$ nM o $\leq 0,001$ nM (por ejemplo de 10^{-8} M o inferior, por ejemplo de entre 10^{-8} M y 10^{-13} M, por ejemplo de entre 10^{-9} M y 10^{-13} M).

El término "anticuerpo" en la presente memoria se utiliza en el sentido más amplio y comprende diversas estructuras de anticuerpo, incluyendo,
30 aunque sin limitarse a ellos, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos, con la condición de que muestren la actividad de unión a antígeno deseada.

Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula diferente de un
35 anticuerpo intacto que comprende una parte de un anticuerpo intacto que

se une al antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Entre los ejemplos de fragmentos de anticuerpo se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo de una cadena (por ejemplo scFv), anticuerpos de un solo dominio y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

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

La expresión "molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de" se refiere a que la molécula de MHC de clase I respectiva presenta una frecuencia de aparición en una población específica de seres humanos o respecto a todos los seres humanos de la frecuencia relativa proporcionada. Es decir, una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de 10% o superior puede encontrarse en 10% o más de todos los seres humanos de una población específica, tal como en, por ejemplo, 27,2% de todos los seres humanos de origen europeo.

El "conjugado" de un complejo con su pareja de conjugación puede llevarse a cabo mediante diferentes métodos, tales como la unión química, o la unión mediante una pareja de unión específica. La expresión "pareja de conjugación" se refiere a, por ejemplo, polipéptidos, marcapos detectables o miembros de parejas de unión específicas. En una realización, la conjugación del complejo con su pareja de conjugación se lleva a cabo uniendo químicamente grupos N-terminales y/o grupos ϵ -amino (lisina), grupos ϵ -amino de diferentes lisinas, grupos carboxi, sulfhidrilo, hidroxilo y/o fenólico funcionales de la secuencia de aminoácidos de las partes del complejo y/o grupos alcohol de sacárido de la estructura carbohidrato del complejo. En una realización, se conjuga el complejo con su pareja de conjugación mediante una pareja de unión específica. La expresión "agente citotóxico" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una sustancia que inhibe o impide el funcionamiento de las células y/o provoca la muerte o destrucción de las

células. Entre los agentes citotóxicos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, isótopos radioactivos (por ejemplo At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} e isótopos radioactivos de Lu), agentes o fármacos quimioterapéuticos (por ejemplo metotrexato, adriamicina, alcaloides vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorubicina u otros agentes intercalantes), agentes inhibidores del crecimiento, enzimas y fragmentos de los mismos, tales como enzimas nucleolíficos; antibióticos; toxinas, tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de las mismas, y los diversos agentes antitumorales o anticáncer.

Los cromógenos (grupos y pigmentos fluorescentes o luminiscentes), enzimas, grupos activos en RMN o partículas metálicas, haptenos, por ejemplo digoxigenina, son ejemplos de "marcajes detectables". El marcaje detectable también puede ser un grupo entrecruzante fotoactivable, por ejemplo un grupo azido o azirina. Los quelatos metálicos que pueden detectarse mediante electroquimioluminiscencia también son grupos emisores de señales adecuados, resultando de particular interés los quelatos del rutenio, por ejemplo el quelato $(\text{bispíridilo})_3^{2+}$ de rutenio. Se describen grupos de marcaje de rutenio en, por ejemplo, las patentes EP nº 0 580 979, WO nº 90/05301, WO nº 90/11511 y WO nº 92/14138. Para la detección directa, el grupo de marcaje puede seleccionarse de entre cualquier grupo marcador detectable conocido, tal como pigmentos, grupos de marcaje luminiscentes, tales como grupos quimioluminiscentes, por ejemplo ésteres de acridinio o dioxetanos, o pigmentos fluorescentes, por ejemplo fluoresceína, coumarina, rodamina, oxazina, resorufina, cianina y derivados de los mismos. Otros ejemplos de grupos de marcajes son los complejos metálicos luminiscentes, tales como los complejos de rutenio o de europio; enzimas, por ejemplo los utilizados para ELISA o para CEDIA (inmunoensayo de enzima donante clonado, por ejemplo la patente EP nº A-0 061 888) e isótopos radioactivos.

Las "funciones efectoras" se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo, que varían según el isotipo del anticuerpo. Entre los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo se incluyen: unión de C1q y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), unión de receptor de Fc, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis, regulación negativa de

los receptores de superficie celular (por ejemplo receptores de células B) y la activación de las células B.

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

El término "expresión" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a procesos de transcripción y/o traducción y secreción que se producen dentro de una célula. El nivel de transcripción de una secuencia de ácidos
10 nucleicos de interés en una célula puede determinarse basándose en la cantidad de ARNm correspondiente que se encuentra presente en la célula. Por ejemplo, el ARNm transcrito a partir de una secuencia de interés puede cuantificarse mediante RT-PCR o mediante hibridación northern (ver Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring
15 Harbor, N.Y., 1989). Los polipéptidos codificados por un ácido nucleico pueden cuantificarse mediante diversos métodos, por ejemplo mediante ELISA; mediante el ensayo de la actividad biológica del polipéptido o mediante la utilización de ensayos que sean independientes de dicha actividad, tales como la transferencia western o el radioinmunoensayo, utilizando inmunoglobulinas que reconocen y se unen al polipéptido (ver Sambrook *et al.*, *supra*, 1989).
20

Un "casete de expresión" se refiere a un constructo que contiene los elementos reguladores necesarios, tales como un promotor y un sitio de
25 poliadenilación, para la expresión de por lo menos el ácido nucleico contenido en una célula.

La expresión "maquinaria de expresión" se refiere a la suma de los enzimas, cofactores, etc., de una célula que participan en varias etapas, desde la etapa de transcripción de un ácido nucleico o gen (también denominada "maquinaria de expresión génica") hasta la modificación post-traducciona
30 l del polipéptido codificado por el ácido nucleico. La maquinaria de expresión comprende, por ejemplo, las etapas de transcripción del ADN en pre-ARNm, el procesamiento del pre-ARNm en ARNm maduro, la traducción en un polipéptido del ARNm y la modificación post-traducciona
35 l del polipéptido.

- Un "plásmido de expresión" es un ácido nucleico que proporciona todos los elementos necesarios para la expresión del gen o genes estructurales comprendidos en una célula huésped. Típicamente, un plásmido de expresión comprende una unidad de propagación plasmídica procariótica, por ejemplo para *E. coli*, que comprende un origen de replicación y un marcador seleccionable, un marcador de selección eucariótico y uno o más casetes de expresión para la expresión del gen o genes estructurales de interés, comprendiendo cada uno un promotor, un gen estructural y un terminador de transcripción, incluyendo una señal de poliadenilación. La expresión génica habitualmente se encuentra bajo el control de un promotor y dicho gen estructural se dice que se encuentra "operablemente ligada" al promotor. De manera similar, un elemento regulador y un promotor nuclear se encuentran operablemente ligados en el caso de que el elemento regulador module la actividad del promotor mínimo.
- La expresión "región Fc" en la presente memoria se utiliza para definir una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene por lo menos parte de la región constante. La expresión incluye las regiones de Fc de secuencia nativa y las regiones de Fc variantes. En una realización, una región Fc de cadena pesada de IgG humana se extiende desde Cys226, o desde Pro230, hasta el extremo carboxilo-terminal de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina C-terminal (Lys447) de la región Fc puede encontrarse presente o no. A menos que se indique lo contrario en la presente memoria, la numeración de los residuos aminoácidos en la región de Fc o en la región constante sigue el sistema de numeración EU, también denominado índice EU, tal como se describe en Kabat E.A. *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5a edición, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991, publicación del NIH nº 91-3242.
- Una "región de Fc" es una expresión bien conocida y definida basándose en el corte con papaína de las cadenas pesadas de anticuerpo. Los complejos indicados en la presente memoria comprenden, en una realización, a modo de polipéptido de región bisagra de cadena pesada de anticuerpo, una región de Fc humana o una región de Fc derivada de origen humano. En una realización adicional, la región de Fc es una región de Fc de un anticuerpo humano de la subclase IgG4 o una región Fc de un anticuerpo humano de la subclase IgG1, IgG2 ó IgG3, que se ha modificado de manera que no puede detectarse la unión de receptores de

Fcγ (por ejemplo FcγRIIIa) y/o de C1q. En una realización, la región de Fc es una región de Fc humana y especialmente de la subclase IgG4 humana o una región de Fc mutada de la subclase IgG1 humana. En una realización, la región de Fc es de la subclase IgG1 humana con las mutaciones L234A y L235A. Aunque IgG4 muestra un nivel reducido de unión del receptor de Fcγ (FcγRIIIa), los anticuerpos de otras subclases de IgG muestran una unión fuerte. Sin embargo, Pro238, Asp265, Asp270, Asn297 (pérdida del carbohidrato de Fc), Pro329, Leu234, Leu235, Gly236, Gly237, Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434 y/o His435 son residuos que, en caso de alterarse, también proporcionan un nivel reducido de unión de receptor de Fcγ (Shields R.L. *et al.*, J. Biol. Chem. 276:6591-6604, 2001; Lund J. *et al.*, FASEB J. 9:115-119, 1995; Morgan A. *et al.*, Immunology 86:319-324, 1995; patente EP nº 0 307 434). En una realización, un complejo indicado en la presente memoria se encuentra asociado a la unión del receptor de Fcγ de la subclase IgG4 o de la subclase IgG1 ó IgG2, con una mutación en L234, L235 y/o D265, y/o contiene la mutación PVA236. En una realización, las mutaciones son S228P, L234A, L235A, L235E y/o PVA236 (PVA236 se refiere a que la secuencia de aminoácidos ELLG (proporcionada en código de aminoácidos de una letra) entre las posiciones aminoácidas 233 y 236 de IgG1 ó EFLG de IgG4 ha sido sustituida por PVA). En una realización, las mutaciones son S228P de IgG4, y L234A y L235A de IgG1. La región de Fc de un anticuerpo participa directamente en la ADCC (citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos) y en la CDC (citotoxicidad dependiente del complemento). Un complejo que no se une al receptor de Fcγ y/o al factor del complemento C1q no induce citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

Las expresiones "célula huésped", "línea celular huésped" y "cultivo de células huésped" se utilizan intercambiabilmente y se refieren a células en las que se ha introducido un ácido nucleico exógeno, incluyendo la progenie de dichas células. Entre las células huésped se incluyen los "transformantes" y las "células transformadas", que incluyen la célula transformada primaria y la progenie derivada de la misma con independencia del número de pases. La progenie puede no ser completamente idéntica en su contenido de ácidos nucleicos a la célula parental, sino que puede contener mutaciones. Se encuentra incluida la

progenie variante que presenta la misma función o actividad biológica según el cribado o selección realizado en la célula originalmente transformada.

5 El término "célula" incluye tanto las células procarióticas, que se utilizan para la propagación de plásmidos, como las células eucarióticas, que se utilizan para la expresión de un ácido nucleico. En una realización, la célula eucariótica es una célula de mamífero. En una realización, la célula de mamífero se selecciona de entre el grupo de células de mamífero que comprende las células CHO (por ejemplo CHO K1, CHO DG44), las células
10 BHK, las células NS0, las células Sp2/0, las células HEK 293, las células HEK 293 EBNA, las células PER.C6® y las células COS.

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

Un "inmunoconjugado" se refiere a un complejo indicado en la presente memoria conjugado con una o más moléculas heterólogas, incluyendo, aunque sin limitación, un agente citotóxico.
20

Un "individuo" o "sujeto" es un mamífero. Entre los mamíferos se incluyen, aunque sin limitación, animales domesticados (por ejemplo vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (por ejemplo seres humanos y primates no humanos, tales como monos), conejos y roedores (por ejemplo ratones y ratas). En determinadas realizaciones, el individuo o sujeto es un ser humano.
25

Un complejo "aislado" es uno que ha sido separado de un componente de su ambiente natural. En algunas realizaciones, se purifica un complejo hasta una pureza superior a 95% ó 99%, determinada mediante, por ejemplo, electroforesis (por ejemplo SDS-PAGE, enfoque isoeléctrico (IEF), electroforesis capilar) o cromatografía (por ejemplo HPLC de intercambio iónico o de fase reversa).
30

Un ácido nucleico "aislado" se refiere a una molécula de ácidos nucleicos que ha sido separada de un componente de su ambiente natural. Un ácido nucleico aislado incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que habitualmente contienen la molécula de ácido nucleico, pero la molécula de ácido nucleico se encuentra presente extracromosómicamente o en una localización cromosómica que es diferente de su localización cromosómica natural.

La expresión "un polipéptido de fusión" se refiere exactamente a un polipéptido de fusión tal como se ha definido y excluye la presencia de un polipéptido de fusión adicional tal como se ha definido. El término "uno" se refiere a "exactamente uno" o a "un solo".

La expresión "operablemente ligado" se refiere a una yuxtaposición de dos o más componentes, en la que los componentes descritos de esta manera se encuentran en una relación que les permite funcionar del modo pretendido. Por ejemplo, un promotor y/o intensificador se encuentran operablemente ligados con una secuencia codificante en el caso de que actúen en cis para controlar o modular la transcripción de la secuencia ligada. Generalmente, aunque no necesariamente, las secuencias de ADN que se encuentran "operablemente ligadas" son contiguas y, en caso necesario para unir dos regiones codificantes de proteína, tales como un líder secretorio y un polipéptido, contiguas y en el mismo marco (de lectura). Sin embargo, aunque un promotor operablemente ligado generalmente se encuentra localizado cadena arriba de la secuencia codificante, no es necesariamente contigua a la misma. Los intensificadores no son necesariamente contiguos. Un intensificador se encuentra operablemente ligado a una secuencia codificante en el caso de que el intensificador incremente la transcripción de la secuencia codificante. Los intensificadores operablemente ligados pueden encontrarse situados cadena arriba, dentro o cadena abajo de las secuencias codificantes y a distancia considerable del promotor. Un sitio de poliadenilación se encuentra operablemente ligado a una secuencia codificante en el caso de que se encuentre situado en el extremo de cadena abajo de la secuencia codificante de manera que la transcripción se produzca pasando por la secuencia codificante y hacia el interior de la secuencia de poliadenilación. Un codón de parada de traducción se encuentra operablemente ligado a una secuencia de ácidos nucleicos exónica en el caso de que se encuentre localizado en el extremo de

cadena abajo (extremo 3') de la secuencia codificante, de manera que la traducción se produce pasando por la secuencia codificante hasta el codón de parada y se detiene en el mismo. El ligamiento se lleva a cabo mediante métodos recombinantes conocidos de la técnica, por ejemplo utilizando metodología de PCR y/o mediante ligación en sitios de restricción convenientes. En el caso de que no existan sitios de restricción convenientes, se utilizan adaptadores o conectores oligonucleótidos sintéticos según la práctica convencional.

La expresión "impreso en el paquete" se utiliza para referirse a instrucciones habitualmente incluidas en los paquetes comerciales de productos terapéuticos, las cuales contienen información sobre las indicaciones, utilización, dosis, administración, terapia de combinación, contraindicaciones y/o advertencias referentes a la utilización de dichos productos terapéuticos.

La expresión "péptido conector" se refiere a secuencias de aminoácidos de origen natural y/o sintético. Consisten de una cadena lineal de aminoácidos en las que los 20 aminoácidos naturales son los bloques constructivos monoméricos. El péptido conector presenta una longitud de entre 1 y 50 aminoácidos; en una realización, de entre 1 y 28 aminoácidos; en una realización adicional, de entre 2 y 25 aminoácidos. El péptido conector puede contener secuencias repetitivas de aminoácidos o secuencias de polipéptidos naturales. El conector presenta la función de garantizar que los polipéptidos conjugados entre sí pueden llevar a cabo su actividad biológica, al posibilitar que los polipéptidos se plieguen correctamente y sean correctamente presentados. En una realización, el péptido conector es rico en residuos de glicina, glutamina y/o serina. Estos residuos se disponen, por ejemplo, en unidades repetitivas pequeñas de hasta cinco aminoácidos, tales como GS (SEC ID nº 12), GGS (SEC ID nº 13), GGGS (SEC ID nº 14), y GGGGS (SEC ID nº 19). Esta unidad repetitiva pequeña puede repetirse una a cinco veces. En los extremos aminoterminal y/o carboxiterminal de la unidad multimérica pueden añadirse seis aminoácidos adicionales naturales arbitrarios. Otros conectores peptídicos sintéticos están compuestos de un solo aminoácido, que se repite entre 10 y 20 veces y que puede comprender en el extremo aminoterminal y/o carboxiterminal hasta seis aminoácidos adicionales naturales arbitrarios. Todos los conectores peptídicos pueden encontrarse codificados por una molécula de ácidos nucleicos y por lo tanto pueden expresarse

recombinantemente. Debido a que los conectores mismos son péptidos, el polipéptido conectado mediante el conector se encuentra conectado al conector mediante un enlace peptídico formado entre dos aminoácidos.

5 La expresión "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que se encuentra en una forma que permite que la actividad biológica de un ingrediente activo contenido en la misma resulte efectiva, y que no contiene componentes adicionales que resulten inaceptablemente tóxicos para un sujeto en el que se administre la formulación.

10 Un "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente en una formulación farmacéutica, aparte de un ingrediente activo, que no resulta tóxico para el sujeto. Un portador farmacéuticamente aceptable incluye, aunque sin limitación, un tampón, excipiente, estabilizador o conservante.

15 Un "polipéptido" es un polímero que consiste de aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos, producidos natural o sintéticamente. Los polipéptidos de menos de aproximadamente 25 residuos aminoácidos pueden denominarse "péptidos", mientras que las moléculas que consisten de dos o más polipéptidos o que comprenden un polipéptido de más de 100 residuos amionácidos pueden denominarse "proteínas". Un polipéptido
20 también puede comprender componentes no aminoácidos, tales como grupos carbohidrato, iones metálicos o ésteres de ácido carboxílico. Los componentes no aminoácidos pueden ser añadidos por la célula, en la que se expresa el polipéptido, y pueden variar según el tipo de célula. Los polipéptidos se definen en la presente memoria en términos de la
25 estructura del esqueleto de aminoácidos o el ácido nucleico codificante del mismo. Las adiciones, tales como grupos carbohidrato, generalmente no se especifican, aunque, sin embargo, pueden encontrarse presentes.

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

30 La expresión "péptido inductor de la respuesta de células T" se refiere a un péptido presentado en el surco de unión a péptido de un complejo de MHC de clase I y que resulta reconocido por células T circulantes de memoria o efectoras. El reconocimiento del péptido resulta en una respuesta inmunológica que resulta en la eliminación de las células que presentan
35 dicho complejo de péptido-MHC de clase I.

- Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "tratamiento" (y variaciones gramaticales del mismo, tales como "tratar" o "tratando") se refiere a la intervención clínica en un intento de alterar el curso natural del individuo bajo tratamiento, y puede llevarse a cabo para la profilaxis o durante el curso de la patología clínica. Entre los efectos deseables del tratamiento se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, la prevención de la aparición o de la recurrencia de una enfermedad, el alivio de los síntomas, la reducción de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, la prevención de la metástasis, la reducción de la tasa de progresión de la enfermedad, la mejora o paliación del estado de enfermedad, y la remisión o mejora del pronóstico. En algunas realizaciones, se utilizaron anticuerpos de la invención para retrasar el desarrollo de una enfermedad o para enlentecer la progresión de una enfermedad.
- La expresión "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena pesada o ligera de anticuerpo que participa en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y de la cadena ligera (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo nativo generalmente presentan estructuras similares, comprendiendo cada dominio cuatro regiones marco (FRs) conservadas y tres regiones hipervariables (HVRs) (ver, por ejemplo, Kindt T.J. *et al.*, Kuby Immunology, 6a edición, W.H. Freeman and Co., N.Y., 2007, página 91). Un único dominio VH o VL puede resultar suficiente para proporcionar especificidad de unión a antígeno. Además, los anticuerpos que se unen a un antígeno particular pueden aislarse utilizando un dominio VH o VL de un anticuerpo que se une al antígeno con el fin de cribar una biblioteca de dominios VL o VH complementarios, respectivamente. Ver, por ejemplo, Portolano S. *et al.*, J. Immunol. 150:880-887; Clackson T. *et al.*, Nature 352:624-628, 1991.
- El término "vector", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una molécula de ácidos nucleicos capaz de propagar otro ácido nucleico al que se encuentra ligado. El término incluye el vector como estructura de ácidos nucleicos autorreplicante, así como el vector incorporado en el genoma de una célula huésped en la que ha sido introducido. Determinados vectores son capaces de dirigir la expresión de los ácidos nucleicos a los que se encuentran operablemente ligados. Dichos vectores se denominan en la presente memoria "vectores de expresión".

II. COMPOSICIONES Y MÉTODOS

A. Complejos ejemplares

En la presente memoria se informa de un complejo de unión a antígeno que comprende como primer componente una parte derivada de anticuerpo
5 que se une específicamente a un antígeno diana, y como segundo componente un péptido derivado de un virus unido a un complejo de proteína de MHC de clase I.

Con el complejo indicado en la presente memoria pueden dirigirse células T citotóxicas circulantes específicas de virus existentes (células T de
10 memoria o células T efectoras o ambas) de un individuo a células que expresan el antígeno diana, a las que se une específicamente la parte del complejo derivada de un anticuerpo, mediante la cobertura de dichas células con un complejo MHC de clase I que imita una infección vírica aguda.

En un aspecto, la invención se basa, en parte, en el resultado de que un complejo indicado en la presente memoria, que comprende como primera parte un péptido derivado de un virus unido a una proteína de MHC de clase I, y como segunda parte, una molécula unida mediante disulfuro derivada de un anticuerpo, puede utilizarse para dirigir las células T
15 citotóxicas específicas de virus existentes de un individuo a células que expresan un antígeno diana que imita una infección vírica aguda y, de esta manera, puede iniciarse la eliminación de las células que expresan el antígeno diana.

En determinadas realizaciones, se proporciona un complejo que comprende un polipéptido de fusión que comprende: (i) un péptido derivado de un virus, (ii) el alelo A*0201 de HLA-A soluble, e (iii) β 2-microglobulina.
25

Los complejos de la invención resultan útiles, por ejemplo para el diagnóstico o el tratamiento de diversas enfermedades, tales como el
30 cáncer o las infecciones víricas.

En un aspecto, la invención proporciona polipéptidos de fusión que se unen (i) a un antígeno de superficie celular, e (ii) a células T citotóxicas. En

determinadas realizaciones, el polipéptido de fusión se une al antígeno de superficie celular con una afinidad de ≤ 10 nM.

5 Los complejos indicados en la presente memoria explotan una respuesta inmunológica antivírica altamente efectiva de origen natural para eliminar/desintegrar las células diana, por ejemplo células tumorales o células infectadas por virus. La eliminación celular se consigue mediante la utilización de las propias células T circulantes del individuo, las cuales son muy potentes y no requieren ninguna coestimulación para su activación. Además, resulta necesario un número reducido de moléculas terapéuticas
10 sobre la superficie celular para el mecanismo de acción (Mottez *et al.*, 1995).

Durante el tratamiento, el polipéptido de fusión puede inducir la respuesta inmunológica antivírica del individuo de manera similar a una inmunización y potenciar de esta manera la eficacia en múltiples
15 tratamientos/aplicaciones.

Aunque sólo una limitada población de pacientes es de un alotipo específico (alotipo HLA-A: 30% a 50% de la población presenta el alelo A*0201) y la prevalencia de las infecciones víricas específicas también es limitada (infección por CMV de 60% a 90%, dependiendo principalmente de
20 la edad), puede utilizarse una inmunización como pretratamiento para potenciar la eficacia.

Alternativamente, puede utilizarse un alotipo cuya frecuencia en la población sea muy reducida, en una realización inferior al 1%. La utilización de dicho alotipo puede utilizar una etapa de inmunización obsoleta, ya que el alotipo resultará reconocido por el sistema
25 inmunológico del individuo como foráneo y se iniciará una respuesta inmunológica.

El anticuerpo dirigido debe ser altamente específico de una célula o antígeno para limitar la toxicidad y los efectos secundarios.

30 De esta manera, mediante la utilización de un complejo indicado en la presente memoria: (i) únicamente se activa una población de células T altamente específica (células efectoras/de memoria CD8-positivas específicas para un único complejo MHC-péptido); todas

las demás células $CD3^+$ no resultan afectadas (células T $CD4^+$: TH1, TH2, TH17, células T reguladoras);

- (ii) se imita la respuesta natural del sistema inmunológico del individuo (eliminación normal de células infectadas por virus), y
- 5 (iii) la respuesta a la aplicación será reducida al inicio pero puede resultar reforzada por el tratamiento (se activan las células T específicas y se expanden en número); de esta manera, inicialmente pueden reducirse las reacciones de infusión y la liberación inicial de citoquinas.

- 10 En una realización, el método comprende la etapa de estimular células T citotóxicas $CD8$ -positivas mediante la aplicación de un péptido seleccionado derivado de virus, por ejemplo un péptido derivado de citomegalovirus humano (HCMV).

- 15 Se ha demostrado que las células T específicas de un péptido de CMV activadas podrían mediar en la eliminación efectiva de células tumorales *in vitro* (células tumorales cargadas con el péptido derivado de CMV *in vitro*).

- 20 Las células infectadas por virus presentan péptidos derivados de virus con proteínas de MHC de clase I sobre su superficie celular. Éstas resultan reconocidas por células T $CD8^+$ específicas que eliminan/reducen el número de células presentadoras. Las células T $CD8^+$ citolíticas (citotóxicas) (CTL) reconocen péptidos en las proteínas de MHC de clase I a partir de su receptor de células T específico. Las CTLs inducen la eliminación de las células infectadas por virus sin necesidad de una señal coestimuladora.

- 25 Pueden utilizarse células efectoras, por ejemplo células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMCs) o células T $CD8^+$ separadas mediante FACS, las cuales pueden pre-estimularse con el péptido derivado del CMV tal como se encuentra comprendido en el polipéptido de fusión indicado en la presente memoria.

- 30 Debe identificarse el alotipo de HLA del individuo que debe tratarse.

Según el NCBI, los alotipos de HLA con una frecuencia de 10% o superior se distribuyen tal como se indica en la tabla a continuación.

Tabla.

Alotipo de HLA	Frecuencia a Australia [%]	Frecuencia a Europa [%]	Frecuencia Norteamérica [%]	Frecuencia a Sudeste Asiático [%]
A*01:01		16,4		
A*02:01	12,7	27,2	19,7	
A*02:04				
A*03:01		14,1		
A*11:01	13,5			20,4
A*24:02	25,9		37,7	29,9
A*31:01:02				
A*34:01:01	40,1			
B*07:02		13,9		
B*08:01		11,8		
B*13:01	23,8			
B*15:04				11,7
B*15:21	10,6			
B*44:02		10,6		
B*56:01	16,1			
B*56:02	10,3			
C*01:02	24,6			13,3
C*02:02			12,7	
C*03:03				
C*03:04			20,4	17,3
C*04:01	26,0	10,1	15,0	
C*04:03	13,9			
C*05:01		10,6		
C*06:02				
C*07:01		17,0		
C*07:02		15,9	10,2	18,9
C*08:01				12,8
C*15:02	16,5			

De esta manera, un aspecto indicado en la presente memoria es un complejo de unión a antígeno, caracterizado porque comprende:

- 5 - un único polipéptido de fusión que comprende, en dirección N-terminal a C-terminal:

- (i) una β 2-microglobulina, y
- (ii) los dominios extracelulares α 1, α 2 y α 3 de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa inferior al 10%,

o

- (i) un péptido inductor de respuesta de células T,
- (ii) una β 2-microglobulina, y
- (iii) los dominios extracelulares α 1, α 2 y α 3 de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de 10% o superior,

y

- dos cadenas polipeptídicas, que se encuentran unidas mediante uno o más enlaces disulfuro, en las que la primera cadena polipeptídica unida mediante disulfuro comprende, en dirección N-terminal a C-terminal,
 - (i) un dominio variable de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina,
 - (ii) un dominio constante de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina, y
 - (iii) un polipéptido de región bisagra de cadena pesada de anticuerpo,
- en el que el dominio variable de cadena ligera o pesada solo o en combinación con el dominio variable de cadena pesada o ligera complementario respectivo se une específicamente a un antígeno,
- y la segunda cadena polipeptídica unida mediante disulfuro comprende un polipéptido de región bisagra de cadena pesada de anticuerpo,

en el que el polipéptido de fusión:

- se encuentra unido covalentemente al extremo C-terminal o N-terminal de una de las cadenas polipeptídicas unidas mediante disulfuro, o
- se encuentra unido covalentemente al extremo N-terminal de un dominio variable de anticuerpo que es el dominio variable de cadena pesada o ligera complementario al comprendido en la primera cadena polipeptídica unida mediante disulfuro, o
- se encuentra unido covalentemente al extremo C-terminal de un dominio variable de anticuerpo que es el dominio variable de

cadena pesada o ligera complementario al comprendido en la primera cadena polipeptídica unida mediante disulfuro.

5 En una realización, el polipéptido de fusión que comprende, en dirección N-terminal a C-terminal, una $\beta 2$ -microglobulina y los dominios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa inferior a 1% comprende además, en su extremo N-terminal, un péptido que se une al surco de unión a péptidos del MHC. En una realización, el péptido es un péptido inductor de respuestas de células T.

En una realización, el complejo se caracteriza porque comprende:

- 10 - un polipéptido de fusión que comprende, en dirección N-terminal a C-terminal:
o bien
(i) una $\beta 2$ -microglobulina, y
(ii) los dominios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de una molécula de
15 MHC de clase I con una frecuencia relativa inferior a 10 %, o
(i) un péptido inductor de respuesta de células T,
(ii) una $\beta 2$ -microglobulina, y
(iii) los dominios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de una molécula de
20 MHC de clase I con una frecuencia relativa de 10% o superior, y
- dos cadenas polipeptídicas, que se encuentran unidas mediante uno o más enlaces disulfuro, en las que la primera cadena polipeptídica unida mediante disulfuro
25 comprende, en dirección N-terminal a C-terminal,
(i) un dominio variable de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina,
(ii) un dominio constante de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina, y
30 (iii) un polipéptido de región bisagra de cadena pesada de anticuerpo,
en el que el dominio variable de cadena ligera o pesada solo o en combinación con el dominio variable de cadena pesada o ligera complementario respectivo se une específicamente a un antígeno,

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

en el que el polipéptido de fusión:

- 5 - se encuentra unido covalentemente al extremo C-terminal o N-terminal de una de las cadenas polipeptídicas unidas mediante disulfuro, o
- se encuentra unido covalentemente al extremo N-terminal de un dominio variable de anticuerpo que es el dominio variable de
- 10 cadena pesada o ligera complementario al comprendido en la primera cadena polipeptídica unida mediante disulfuro, o
- se encuentra unido covalentemente al extremo C-terminal de un dominio variable de anticuerpo que es el dominio variable de
- 15 cadena pesada o ligera complementario al comprendido en la primera cadena polipeptídica unida mediante disulfuro.

En una realización, el complejo se caracteriza porque comprende:

- un polipéptido de fusión que comprende, en dirección N-terminal a C-terminal:
 - (i) un péptido inductor de respuesta de células T,
 - 20 (ii) una β 2-microglobulina, y
 - (iii) los dominios extracelulares α 1, α 2 y α 3 de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de 10% o superior,

y

- dos cadenas polipeptídicas, que se encuentran unidas mediante uno
- 25 o más enlaces disulfuro,
- en las que la primera cadena polipeptídica unida mediante disulfuro comprende, en dirección N-terminal a C-terminal,
 - (i) un dominio variable de cadena ligera (VL) de inmunoglobulina y un dominio constante seleccionado de entre un dominio
 - 30 constante de cadena ligera de inmunoglobulina (CL) y un primer dominio constante de cadena pesada (CH1) de inmunoglobulina , o
 - un dominio variable de cadena pesada (VL) de inmunoglobulina y un dominio constante seleccionado de entre
 - 35 un primer dominio constante de cadena pesada (CH1) de

inmunoglobulina y un dominio constante de cadena ligera (CL) de inmunoglobulina, y

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

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

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

en el que el polipéptido de fusión:

- se encuentra unido covalentemente al extremo C-terminal o N-terminal de una de las cadenas polipeptídicas unidas mediante disulfuro, o
- 15 - se encuentra unido covalentemente al extremo N-terminal de un dominio variable de anticuerpo que es el dominio variable de cadena pesada o ligera complementario al comprendido en la primera cadena polipeptídica unida mediante disulfuro, o
- 20 - se encuentra unido covalentemente al extremo C-terminal de un dominio variable de anticuerpo que es el dominio variable de cadena pesada o ligera complementario al comprendido en la primera cadena polipeptídica unida mediante disulfuro.

En una realización, el complejo se caracteriza porque comprende:

- 25 - un polipéptido de fusión que comprende, en dirección N-terminal a C-terminal:
 - (i) un péptido inductor de respuesta de células T,
 - (ii) una β 2-microglobulina, y
 - (iii) los dominios extracelulares α 1, α 2 y α 3 de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de 10% o superior,

30 y

- dos cadenas polipeptídicas, que se encuentran unidas mediante uno o más enlaces disulfuro, en las que la primera cadena polipeptídica unida mediante disulfuro comprende, en dirección N-terminal a C-terminal,

- (i) un dominio variable de cadena ligera (VL) de inmunoglobulina y un dominio constante seleccionado de entre un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina (CL) y un primer dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina (CH1),
5 o
un dominio variable de cadena pesada (VL) de inmunoglobulina y un dominio constante seleccionado de entre un primer dominio constante de cadena pesada (CH1) de inmunoglobulina y un dominio constante de cadena ligera (CL) de
10 inmunoglobulina, y
(ii) un polipéptido de región bisagra de cadena pesada de anticuerpo, y
(iii) un segundo (CH2) y tercer dominio constante (CH3) de
15 cadena pesada de inmunoglobulina,
en el que el dominio variable de cadena ligera o pesada solo o en combinación con el dominio variable de cadena pesada o ligera complementario respectivo se une específicamente a un antígeno,
y la segunda cadena polipeptídica unida mediante disulfuro
20 comprende un polipéptido de región bisagra de cadena pesada de anticuerpo,
en el que el polipéptido de fusión:
- se encuentra unido covalentemente al extremo C-terminal o N-terminal de una de las cadenas polipeptídicas unidas mediante disulfuro, o
25 - se encuentra unido covalentemente al extremo N-terminal de un dominio variable de anticuerpo que es el dominio variable de cadena pesada o ligera complementario al comprendido en la primera cadena polipeptídica unida mediante disulfuro, o
- se encuentra unido covalentemente al extremo C-terminal de un
30 dominio variable de anticuerpo que es el dominio variable de cadena pesada o ligera complementario al comprendido en la primera cadena polipeptídica unida mediante disulfuro.

En una realización, el complejo se caracteriza porque comprende:

- un polipéptido de fusión que comprende, en dirección N-terminal a C-terminal:
35

- (i) un péptido inductor de respuesta de células T,
- (ii) una β 2-microglobulina, y
- (iii) los dominios extracelulares α 1, α 2 y α 3 de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de 10% o superior,

5 y

- dos cadenas polipeptídicas, que se encuentran unidas mediante uno o más enlaces disulfuro, en las que la primera cadena polipeptídica unida mediante disulfuro comprende, en dirección N-terminal a C-terminal,

10 (i) un dominio variable de cadena ligera (VL) de inmunoglobulina y un dominio constante seleccionado de entre un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina (CL) y un primer dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina (CH1),
o

15 un dominio variable de cadena pesada (VL) de inmunoglobulina y un dominio constante seleccionado de entre un primer dominio constante de cadena pesada (CH1) de inmunoglobulina y un dominio constante de cadena ligera (CL) de inmunoglobulina, y

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

(iii) un segundo (CH2) y tercer dominios constantes de cadena pesada (CH3) de inmunoglobulina,
en el que el dominio variable de cadena ligera o pesada solo o en
25 combinación con el dominio variable de cadena pesada o ligera complementario respectivo se une específicamente a un antígeno,

y la segunda cadena polipeptídica unida mediante disulfuro comprende, en dirección N-terminal a C-terminal, un polipéptido de
región bisagra de cadena pesada de anticuerpo, una segunda región
30 constante de cadena pesada (CH2) de inmunoglobulina y una tercera región constante de cadena pesada (CH3) de inmunoglobulina,

en el que el polipéptido de fusión:

- se encuentra unido covalentemente al extremo C-terminal o N-terminal de una de las cadenas polipeptídicas unidas mediante
35 disulfuro, o

- se encuentra unido covalentemente al extremo N-terminal de un dominio variable de anticuerpo que es el dominio variable de cadena pesada o ligera complementario al comprendido en la primera cadena polipeptídica unida mediante disulfuro, o
- 5 - se encuentra unido covalentemente al extremo C-terminal de un dominio variable de anticuerpo que es el dominio variable de cadena pesada o ligera complementario al comprendido en la primera cadena polipeptídica unida mediante disulfuro.

En una realización, el complejo se caracteriza porque comprende:

- 10 - un polipéptido de fusión que comprende, en dirección N-terminal a C-terminal:
 - (i) un péptido inductor de respuesta de células T,
 - (ii) una β 2-microglobulina, y
 - (iii) los dominios extracelulares α 1, α 2 y α 3 de una molécula de
- 15 MHC de clase I con una frecuencia relativa de 10% o superior,

y

- dos cadenas polipeptídicas, que se encuentran unidas mediante uno o más enlaces disulfuro,
- 20 en las que la primera cadena polipeptídica unida mediante disulfuro comprende, en dirección N-terminal a C-terminal,
 - (i) un dominio variable de cadena ligera (VL) de inmunoglobulina y un dominio constante seleccionado de entre un dominio constante de cadena ligera (CL) de inmunoglobulina y un primer dominio constante de cadena pesada (CH1) de
 - 25 inmunoglobulina, o
 - un dominio variable de cadena pesada (VH) de inmunoglobulina y un dominio constante seleccionado de entre un primer dominio constante de cadena pesada (CH1) de inmunoglobulina y un dominio constante de cadena ligera
 - 30 (CL) de inmunoglobulina, y
 - (ii) un polipéptido de región bisagra de cadena pesada de anticuerpo, y
 - (iii) un segundo (CH2) y tercer dominios constantes de cadena pesada (CH3) de inmunoglobulina,

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

y el segundo polipéptido unido mediante disulfuro comprende, en dirección N-terminal a C-terminal:

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

o

un dominio variable de cadena pesada (VL) de inmunoglobulina y un dominio constante seleccionado de entre un primer dominio constante de cadena pesada (CH1) de inmunoglobulina y un dominio constante de cadena ligera (CL) de inmunoglobulina,

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

(iii) una segunda región constante de cadena pesada (CH2) de inmunoglobulina, y una tercera región constante de cadena pesada (CH3) de inmunoglobulina,

en el que el polipéptido de fusión:

- se encuentra unido covalentemente al extremo C-terminal o N-terminal de una de las cadenas polipeptídicas unidas mediante disulfuro, o

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

- se encuentra unido covalentemente al extremo C-terminal de un dominio variable de anticuerpo que es el dominio variable de cadena pesada o ligera complementario al comprendido en la primera cadena polipeptídica unida mediante disulfuro.

En una realización, el complejo se caracteriza porque comprende:

- un polipéptido de fusión que comprende, en dirección N-terminal a C-terminal:

- (i) un péptido inductor de respuesta de células T,
 - (ii) una $\beta 2$ -microglobulina, y
 - (iii) los dominios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de 10% o superior,
- 5 - dos cadenas polipeptídicas, que se encuentran unidas mediante uno o más enlaces disulfuro,
- en las que la primera cadena polipeptídica unida mediante disulfuro comprende, en dirección N-terminal a C-terminal,
- 10 (i) un dominio variable de cadena ligera (VL) de inmunoglobulina y un dominio constante seleccionado de entre un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina (CL) y un primer dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina (CH1),
- O
- 15 un dominio variable de cadena pesada (VL) de inmunoglobulina y un dominio constante seleccionado de entre un primer dominio constante de cadena pesada (CH1) de inmunoglobulina y un dominio constante de cadena ligera (CL) de inmunoglobulina, y
- 20 (ii) un polipéptido de región bisagra de cadena pesada de anticuerpo, y
- (iii) un segundo (CH2) y tercer dominios constantes de cadena pesada (CH3) de inmunoglobulina,
- 25 en el que el dominio variable de cadena ligera o pesada solo o en combinación con el dominio variable de cadena pesada o ligera complementario respectivo se une específicamente a un antígeno,
- y el segundo polipéptido unido mediante disulfuro comprende, en dirección N-terminal a C-terminal:
- 30 (i) un dominio variable de cadena ligera (VL) de inmunoglobulina y un dominio constante seleccionado de entre un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina (CL) y un primer dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina (CH1),
- o
- 35 un dominio variable de cadena pesada (VL) de inmunoglobulina y un dominio constante seleccionado de entre un primer dominio constante de cadena pesada (CH1) de inmunoglobulina y un dominio constante de cadena ligera (CL) de inmunoglobulina,

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

(iii) una segunda región constante de cadena pesada (CH2) de inmunoglobulina, y una tercera región constante de cadena pesada (CH3) de inmunoglobulina,

- una cadena polipeptídica que comprende, en dirección N-terminal a C-terminal, un dominio variable de inmunoglobulina complementario al dominio variable en la primera cadena unida mediante disulfuro y un dominio constante complementario al dominio constante situado a continuación del dominio variable en la primera cadena polipeptídica unida mediante disulfuro,

en el que el polipéptido de fusión:

- se encuentra unido covalentemente al extremo C-terminal o N-terminal de una de las cadenas polipeptídicas unidas mediante disulfuro, o
- se encuentra unido covalentemente al extremo N-terminal de un dominio variable de anticuerpo que es el dominio variable de cadena pesada o ligera complementario al comprendido en la primera cadena polipeptídica unida mediante disulfuro, o
- se encuentra unido covalentemente al extremo C-terminal de un dominio variable de anticuerpo que es el dominio variable de cadena pesada o ligera complementario al comprendido en la primera cadena polipeptídica unida mediante disulfuro.

En una realización, el complejo se caracteriza porque comprende:

- un polipéptido de fusión que comprende, en dirección N-terminal a C-terminal:
 - (i) un péptido inductor de respuesta de células T,
 - (ii) una β 2-microglobulina,
 - (iii) los dominios extracelulares α 1, α 2 y α 3 de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de 10% o superior,
 - (iv) un polipéptido de región bisagra de cadena pesada de anticuerpo,
 - (v) un segundo (CH2) y tercer dominios constantes de cadena pesada (CH3) de inmunoglobulina,

y

- una primera cadena polipeptídica, en dirección N-terminal a C-terminal:

(i) un dominio variable de cadena ligera (VL) de inmunoglobulina y un dominio constante seleccionado de entre un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina (CL) y un primer dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina (CH1), o un dominio variable de cadena pesada (VL) de inmunoglobulina y un dominio constante seleccionado de entre un primer dominio constante de cadena pesada (CH1) de inmunoglobulina y un dominio constante de cadena ligera (CL) de inmunoglobulina, y

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

(iii) un segundo (CH2) y tercer dominios constantes de cadena pesada (CH3) de inmunoglobulina,

y

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

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

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

En una realización, el complejo se caracteriza porque comprende:

- un polipéptido de fusión que comprende, en dirección N-terminal a C-terminal:

(i) un péptido inductor de respuesta de células T,

(ii) una β 2-microglobulina,

(iii) los dominios extracelulares α 1, α 2 y α 3 de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de 10% o superior,

(iv) un dominio variable de cadena ligera (VL) de inmunoglobulina y un dominio constante seleccionado de entre un dominio constante de cadena ligera (CL) de inmunoglobulina y un

- primer dominio constante de cadena pesada (CH1) de inmunoglobulina, o
- un dominio variable de cadena pesada (VH) de inmunoglobulina y un dominio constante seleccionado de entre
- 5 un primer dominio constante de cadena pesada (CH1) de inmunoglobulina y un dominio constante de cadena ligera (CL) de inmunoglobulina,
- (v) un polipéptido de región bisagra de cadena pesada de anticuerpo,
- 10 (vi) un segundo (CH2) y tercer dominios constantes de cadena pesada (CH3) de inmunoglobulina,
- y
- una primera cadena polipeptídica, en dirección N-terminal a C-terminal:
- 15 (i) un polipéptido de región bisagra de cadena pesada de anticuerpo, y
- (ii) un segundo (CH2) y tercer dominios constantes de cadena pesada (CH3) de inmunoglobulina,
- y
- 20 - una segunda cadena polipeptídica que comprende, en dirección N-terminal a C-terminal, un dominio variable de inmunoglobulina complementario al dominio variable en la primera cadena polipeptídica y un dominio constante complementario al dominio constante de la primera cadena polipeptídica,
- 25 en el que el dominio variable de cadena ligera o pesada solo o en combinación con el dominio variable de cadena pesada o ligera complementario respectivo se une específicamente a un antígeno, y
- en el que el polipéptido de fusión y la primera cadena polipeptídica se encuentran unidos mediante disulfuro.
- 30 En una realización, el complejo se caracteriza porque comprende:
- un polipéptido de fusión que comprende, en dirección N-terminal a C-terminal:
- (i) un péptido inductor de respuesta de células T,
- (ii) una β 2-microglobulina,

- (iii) los dominios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de 10% o superior, y
- 5 (iv) un dominio variable de cadena ligera (VL) de inmunoglobulina y un dominio constante seleccionado de entre un dominio constante de cadena ligera (CL) de inmunoglobulina y un primer dominio constante de cadena pesada (CH1) de inmunoglobulina, o
- 10 un dominio variable de cadena pesada (VH) de inmunoglobulina y un dominio constante seleccionado de entre un primer dominio constante de cadena pesada (CH1) de inmunoglobulina y un dominio constante de cadena ligera (CL) de inmunoglobulina,
- y
- 15 - una primera cadena polipeptídica, en dirección N-terminal a C-terminal:
- (i) un dominio variable de inmunoglobulina complementario al dominio variable del polipéptido de fusión y un dominio constante complementario al dominio constante del polipéptido de fusión,
- 20 (ii) un polipéptido de región bisagra de cadena pesada de anticuerpo, y
- (iii) un segundo (CH2) y tercer dominios constantes de cadena pesada (CH3) de inmunoglobulina,
- 25 en el que el dominio variable de cadena ligera o pesada solo o en combinación con el dominio variable de cadena pesada o ligera complementario respectivo se une específicamente a un antígeno, y
- en el que el polipéptido de fusión y la primera cadena polipeptídica se encuentran unidos mediante disulfuro.
- 30 En una realización, el complejo se caracteriza porque comprende:
- un polipéptido de fusión que comprende, en dirección N-terminal a C-terminal:
- (i) un péptido inductor de respuesta de células T,
- (ii) una $\beta 2$ -microglobulina,

- (iii) los dominios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de 10% o superior,
- (iv) un dominio variable de cadena ligera (VL) de inmunoglobulina y un dominio constante seleccionado de entre un dominio constante de cadena ligera (CL) de inmunoglobulina y un primer dominio constante de cadena pesada (CH1) de inmunoglobulina, o
- un dominio variable de cadena pesada (VH) de inmunoglobulina y un dominio constante seleccionado de entre un primer dominio constante de cadena pesada (CH1) de inmunoglobulina y un dominio constante de cadena ligera (CL) de inmunoglobulina,
- (v) un polipéptido de región bisagra de cadena pesada de anticuerpo,
- (vi) un segundo (CH2) y tercer dominios constantes de cadena pesada (CH3) de inmunoglobulina,
- y
- una primera cadena polipeptídica, en dirección N-terminal a C-terminal:
- (i) un dominio variable de cadena ligera (VL) de inmunoglobulina y un dominio constante seleccionado de entre un dominio constante de cadena ligera (CL) de inmunoglobulina y un primer dominio constante de cadena pesada (CH1) de inmunoglobulina, o
- un dominio variable de cadena pesada (VH) de inmunoglobulina y un dominio constante seleccionado de entre un primer dominio constante de cadena pesada (CH1) de inmunoglobulina y un dominio constante de cadena ligera (CL) de inmunoglobulina,
- (ii) un polipéptido de región bisagra de cadena pesada de anticuerpo, y
- (iii) un segundo (CH2) y tercer dominios constantes de cadena pesada (CH3) de inmunoglobulina,
- y
- una segunda cadena polipeptídica que comprende, en dirección N-terminal a C-terminal, un dominio variable de inmunoglobulina complementario al dominio variable en la cadena polipeptídica de

fusión y un dominio constante complementario al dominio constante de la cadena polipeptídica de fusión,

y

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

10 en el que el dominio variable de cadena ligera o pesada del polipéptido de fusión y/o la primera cadena polipeptídica sola o en combinación con el dominio variable de cadena pesada o ligera complementario respectivo se une específicamente a un antígeno, y

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

15 En una realización, el complejo se caracteriza porque comprende:

- un polipéptido de fusión que comprende, en dirección N-terminal a C-terminal:

- (i) un péptido inductor de respuesta de células T,
- (ii) una $\beta 2$ -microglobulina,
- 20 (iii) los dominios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de 10% o superior,

y

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

- 25 un dominio variable de cadena pesada (VH) de inmunoglobulina y un dominio constante seleccionado de entre un primer dominio constante de cadena pesada (CH1) de inmunoglobulina y un dominio constante de cadena ligera (CL) de inmunoglobulina,

y

- 35 - una primera cadena polipeptídica, en dirección N-terminal a C-terminal:

- (i) un dominio variable de inmunoglobulina complementario al dominio variable del polipéptido de fusión y un dominio constante complementario al dominio constante del polipéptido de fusión,
- 5 (ii) un polipéptido de región bisagra de cadena pesada de anticuerpo, y
- (iii) un segundo (CH2) y tercer dominios constantes de cadena pesada (CH3) de inmunoglobulina,
- y
- 10 - una segunda cadena polipeptídica que comprende, en dirección N-terminal a C-terminal:
- (i) un dominio variable de cadena ligera (VL) de inmunoglobulina y un dominio constante seleccionado de entre un dominio constante de cadena ligera (CL) de inmunoglobulina y un
- 15 primer dominio constante de cadena pesada (CH1) de inmunoglobulina, o
- un dominio variable de cadena pesada (VH) de inmunoglobulina y un dominio constante seleccionado de entre un primer dominio constante de cadena pesada (CH1) de
- 20 inmunoglobulina y un dominio constante de cadena ligera (CL) de inmunoglobulina,
- (ii) un polipéptido de región bisagra de cadena pesada de anticuerpo, y
- (iii) un segundo (CH2) y tercer dominios constantes de cadena
- 25 pesada (CH3) de inmunoglobulina,
- y
- una tercera cadena polipeptídica que comprende, en dirección N-terminal a C-terminal, un dominio variable de inmunoglobulina complementario al dominio variable en la segunda cadena
- 30 polipeptídica y un dominio constante complementario al dominio constante de la segunda cadena polipeptídica,
- en el que el dominio variable de cadena ligera o pesada del polipéptido de fusión y/o la segunda cadena polipeptídica sola o en combinación con el dominio variable de cadena pesada o ligera complementario
- 35 respectivo se une específicamente a un antígeno, y
- en el que la primera cadena polipeptídica y la segunda cadena polipeptídica se encuentran unidos mediante disulfuro.

En una realización, el péptido inductor de respuesta de células T es un péptido derivado de un virus. En una realización, el virus se selecciona de entre adenovirus, virus herpes humano 1, virus herpes humano 2, virus herpes humano 4 (virus de Epstein-Barr), virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, citomegalovirus humano, virus de la inmunodeficiencia humana, virus del papiloma humano tipo 16, virus del papiloma humano tipo 18, virus del papiloma humano tipo 31, virus del papiloma humano tipo 33, virus del papiloma humano tipo 35, virus del papiloma humano tipo 39, - virus del papiloma humano tipo 45, virus del papiloma humano tipo 51, virus del papiloma humano tipo 52, virus del papiloma humano tipo 56, virus del papiloma humano tipo 58, virus del papiloma humano tipo 59, virus del papiloma humano tipo 68, virus del papiloma humano tipo 73, virus del papiloma humano tipo 82, virus linfotrópico de células T humanas de tipo I, virus de la influenza A humano, virus de la influenza B humano, o virus Vaccinia.

En una realización, el péptido derivado de un virus se selecciona de entre NLVPMVATV (SEC ID nº 01), SLYNTVATL (SEC ID nº 02), GLCTLVAML (SEC ID nº 03), GILGFVFTL (SEC ID nº 04), STNRQSGRQ (SEC ID nº 5), LLFGYPVYV (SEC ID nº 06), FAEGFVRAL (SEC ID nº 07), LIVIGILIL (SEC ID nº 08) o ILHTPGCV (SEC ID nº 09).

En una realización, la β 2-microglobulina es la β 2-microglobulina humana. En una realización, la β 2-microglobulina consiste de la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 10.

En una realización, la molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de 10% o superior es la HLA-A*0201 humana. En una realización, los dominios extracelulares α 1, α 2 y α 3 de una molécula de MHC de clase I consisten de la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 11.

En una realización, el péptido derivado de un virus se fusiona con la β 2-microglobulina mediante un primer péptido conector.

En una realización, la β 2-microglobulina se fusiona con el dominio extracelular α 1 de una molécula de MHC de clase I mediante un segundo péptido conector.

En una realización, los dominios extracelulares $\alpha 3$ de una molécula de MHC de clase I se fusionan con el polipéptido (unido o no mediante disulfuro) mediante un tercer péptido conector.

5 En una realización, el primer, segundo y tercer péptidos conectores son iguales o diferentes.

En una realización, el primer péptido conector, el segundo péptido conector y el tercer péptido conector se seleccionan, independientemente, de entre las secuencias de aminoácidos GS (SEC ID nº 12), GGS (SEC ID nº 13), GGGs (SEC ID nº 14), GGGSGGGS (SEC ID nº 15), GGGSGGGSGGGS (SEC ID nº 16), GGGSGGGSGGGSGGGS (SEC ID nº 17), GGGSGGGSGGGSGGGSGGGS (SEC ID nº 18), GGGGS (SEC ID nº 19), GGGGS (SEC ID nº 20), GGGGS (SEC ID nº 21), GGGGS (SEC ID nº 22), and GGGGS (SEC ID nº 23).

15 En una realización, el primer péptido conector comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 21.

En una realización, el segundo péptido conector comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 22.

20 En una realización, el tercer péptido conector comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 12.

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

25 En una realización, el polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de anticuerpo se selecciona de entre un polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de un anticuerpo humano de la subclase IgG1, IgG2, IgG3 ó IgG4.

30 En una realización, el polipéptido de la región bisagra de la cadena pesada de un anticuerpo comprende, o consiste de la secuencia de aminoácidos EPKSCDKTHTCPPCP (SEC ID nº 24), EPKSADKTHTCPPCP (SEC ID nº 25), ERKCCVECP (SEC ID nº 26), ERKCAVECP (SEC ID nº 27), ERKACVECP (SEC ID nº 28), ELKTPLGDTTHTCPRCP

(EPKSCDTPPPCPRCP)₃ (SEC ID nº 29), o ESKYGPPCPSCP (SEC ID nº 30).

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

En una realización, el primer péptido unido mediante disulfuro comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 35 y el segundo polipéptido unido mediante disulfuro comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 36.

En una realización, el primer y segundo péptidos unidos mediante disulfuro comprenden la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 37 ó a la secuencia SEC ID nº 38.

En una realización, el primer polipéptido unido mediante disulfuro o el segundo polipéptido unido mediante disulfuro consiste de la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 37 ó a la secuencia SEC ID nº 38.

En una realización, el primer péptido unido mediante disulfuro comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 39 y el segundo polipéptido unido mediante disulfuro comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 40.

En una realización, las cadenas polipeptídicas, unidas mediante uno o más enlaces disulfuro, se unen mediante dos, tres o cuatro enlaces disulfuro.

En una realización, el complejo se caracteriza porque comprende:

- 5 - un polipéptido de fusión que comprende, en dirección N-terminal a C-terminal:
 - (i) un péptido derivado de virus que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 01,
 - (ii) un primer péptido conector que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID nº
 - 10 (iii) una β 2-microglobulina que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 10,
 - (iv) un segundo péptido conector que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 22,
 - (v) los dominios extracelulares α 1, α 2 y α 3 de una molécula de
 - 15 MHC de clase I que presenta una secuencia de aminoácidos SEC ID nº 11, y
 - (vi) un tercer péptido conector que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID nº
- y
- 20 - dos cadenas polipeptídicas, que se encuentran unidas mediante uno o más enlaces disulfuro, en las que la primera cadena polipeptídica unida mediante disulfuro comprende, en dirección N-terminal a C-terminal,
 - (i) un dominio variable de cadena ligera o pesada de
 - 25 inmunoglobulina,
 - (ii) un dominio constante de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina,
 - (iii) un polipéptido de región bisagra de cadena pesada de anticuerpo,
 - 30 (iv) un dominio CH2 de IgG1 humana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEC ID nº 32 y 33, y
 - (v) un dominio CH3 de IgG1 humana que comprende una secuencia de aminoácidos SEC ID nº 35 ó 36,

y el segundo polipéptido unido mediante disulfuro comprende, en dirección N-terminal a C-terminal:

- (i) un polipéptido de región bisagra de cadena pesada de anticuerpo,
- 5 (ii) un dominio CH2 de IgG1 humana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEC ID nº 32 y 33, y
- (iii) un dominio CH3 de IgG1 humana que comprende una secuencia de aminoácidos SEC ID nº 36 ó 35,

10 en el que el polipéptido de fusión:

- se encuentra unido covalentemente al extremo C-terminal o N-terminal de una segunda cadena polipeptídica unida mediante disulfuro.

En una realización, el complejo se caracteriza porque comprende:

- 15 - un polipéptido de fusión que comprende, en dirección N-terminal a C-terminal:
 - (i) un péptido derivado de virus que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 01,
 - (ii) un primer péptido conector que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID nº
 - 20 (iii) una β 2-microglobulina que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 10,
 - (iv) un segundo péptido conector que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 22.
 - 25 (v) los dominios extracelulares α 1, α 2 y α 3 de una molécula de MHC de clase I que presenta una secuencia de aminoácidos SEC ID nº 11, y
 - (vi) un tercer péptido conector que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID nº

30 y

- dos cadenas polipeptídicas, que se encuentran unidas mediante uno o más enlaces disulfuro, en las que la primera cadena polipeptídica unida mediante disulfuro comprende, en dirección N-terminal a C-terminal,

- (i) un dominio variable de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina,
(ii) un dominio constante de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina,
5 (iii) un polipéptido de región bisagra de cadena pesada de anticuerpo,
(iv) un dominio CH2 de IgG1 humana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEC ID nº 32 y 33, y
10 (v) un dominio CH3 de IgG1 humana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEC ID nº 35 ó 36,
y la segunda cadena polipeptídica unida mediante disulfuro comprende un polipéptido de región bisagra de cadena pesada de
15 anticuerpo,

en el que el polipéptido de fusión:

- se encuentra unido covalentemente al extremo C-terminal o N-terminal de la primera cadena polipeptídica unida mediante disulfuro, o
- 20 - se encuentra unido covalentemente al extremo N-terminal de un dominio variable de anticuerpo que es el dominio variable de cadena pesada o ligera complementario al comprendido en la primera cadena polipeptídica unida mediante disulfuro, o
- se encuentra unido covalentemente al extremo C-terminal de un
- 25 dominio variable de anticuerpo que es el dominio variable de cadena pesada o ligera complementario al comprendido en la primera cadena polipeptídica unida mediante disulfuro.

En una realización, el complejo se caracteriza porque comprende:

- un polipéptido de fusión que comprende, en dirección N-terminal a C-terminal:
30 (i) un péptido derivado de virus que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 01,
(ii) un primer péptido conector que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID nº
35 (iii) una β 2-microglobulina que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 10,

(iv) un segundo péptido conector que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 22.

(v) los dominios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de una molécula de MHC de clase I que presenta una secuencia de aminoácidos SEC ID nº 11, y

(vi) un tercer péptido conector que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID nº

y

- dos cadenas polipeptídicas, que se encuentran unidas mediante uno o más enlaces disulfuro, en las que la primera y segunda cadenas polipeptídicas unidas mediante disulfuro comprenden, en dirección N-terminal a C-terminal:

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

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

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

(iv) un dominio CH2 de IgG1 humana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEC ID nº 32 y 33, y

(v) un dominio CH3 de IgG1 humana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEC ID nº 35 y 36,

en el que el polipéptido de fusión:

- se encuentra unido covalentemente al extremo C-terminal o N-terminal de la segunda cadena polipeptídica unida mediante disulfuro, o

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

- se encuentra unido covalentemente al extremo C-terminal de un dominio variable de anticuerpo que es el dominio variable de

cadena pesada o ligera complementario al comprendido en la primera cadena polipeptídica unida mediante disulfuro.

5 A partir de la figura 14 puede observarse que el complejo indicado en la presente memoria mantiene las propiedades de unión del anticuerpo con el que se encuentra fusionado (figura 14b) y c)).

En las figuras 15 y 17 se muestra la eficacia y especificidad *in vitro* del complejo indicado en la presente memoria.

10 Se llevó a cabo el ensayo de citotoxicidad en presencia de células T CD8⁺ específicas del CMV. Puede observarse que los complejos que comprenden un péptido vírico derivado del CMV inducen la lisis/eliminación/desintegración de las células diana (ver la figura 15a) para el anticuerpo monovalente y la figura 15b) para el anticuerpo bivalente). Puede observarse además que la lisis de las células diana es altamente específica, ya que la incubación con complejos que comprenden un
15 péptido vírico derivado del EBV (figura 15b)) y anticuerpos de control (figura 15d) y e)) no resulta en lisis celular extensiva (la lisis espontánea es de aproximadamente 3,5%).

En la figura 17 se muestra la lisis de la línea celular de adenocarcinoma pulmonar H460M2 positiva para IGF-1R.

20 El valor de EC₅₀ de un complejo que comprende un péptido derivado de CMV y un anticuerpo bivalente es de aproximadamente 10 ng/ml, que corresponde a aproximadamente 50 pM. El valor de EC₅₀ determinado es independiente de la proporción células diana a células efectoras (ver la figura 16; la proporción de células diana a células efectoras es de entre 1:3
25 y 1:1, que corresponde a una proporción efectiva de entre 1:0,44 y 1:0,14 (76% de las células efectoras son positivas para CD8 y 19% son específicas del CMV)).

De esta manera, en una realización, el complejo indicado en la presente memoria presenta un valor de EC₅₀ de aproximadamente 50 pM.

30 1. Afinidad

En determinadas realizaciones, un complejo proporcionado en la presente memoria comprende una pareja de dominios variables de anticuerpo ligantes de antígeno. En determinadas realizaciones, el dominio variable

presenta una constante de disociación (K_d) ≤ 10 nM, ≤ 1 nM, $\leq 0,1$ nM, $\leq 0,01$ nM o $\leq 0,001$ nM (por ejemplo de 10^{-8} M o inferior, por ejemplo de entre 10^{-8} M y 10^{-13} M, por ejemplo de entre 10^{-9} M y 10^{-13} M) con respecto a su antígeno.

- 5 En una realización, se mide K_d utilizando ensayos de resonancia de plasmón superficial.

Por ejemplo, lo anterior puede llevarse a cabo mediante la utilización de un instrumento BIACORE®-2000 ó BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25°C con chips CM5 con antígeno inmovilizado a razón de ~10 unidades de respuesta (UR). Brevemente, se activaron chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore, Inc.) con hidrocloreuro de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) siguiendo las instrucciones del proveedor. Se diluyó el antígeno con acetato sódico 10 mM, pH 4,8, a 5 µg/ml (~0,2 µM) antes de la inyección a un caudal de 5 µl/minuto, alcanzado aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Tras la inyección del antígeno, se inyectó etanolamina 1 M para bloquear los grupos no reaccionados. Para las mediciones cinéticas, se inyectaron diluciones en serie de dos veces de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con surfactante de polisorbato-20 al 0,05% (TWEEN-20™) (PBST) a 25°C a un caudal de aproximadamente 25 µl/min. Se calcularon las tasas de asociación (k_{on}) y de disociación (k_{off}) utilizando un modelo de unión de Langmuir simple uno a uno (software de evaluación de BIACORE® versión 3.2) mediante ajuste simultáneo de los sensogramas de asociación y disociación. La constante de equilibrio de disociación (K_d) se calculó como la proporción k_{off}/k_{on} . Ver, por ejemplo, Chen Y. *et al.*, J. Mol. Biol. 293:865-881, 1999.

2. Expresión

La expresión de formatos específicos del complejo indicados en la presente memoria (diferente conector, diferentes combinaciones de HLA y β2-microglobulina) en HEK 293 y CHO condujo a la acumulación del complejo, en caso de ser detectable, dentro del retículo endoplasmático, es decir, el aislamiento y la secreción del complejo resultaron fuertemente reducidos.

No pudo detectarse secreción del complejo al medio de cultivo en el caso de que el complejo comprendiese uno de los polipéptidos indicados de manera general en las tablas a continuación.

Tabla.

Péptido de señal	Péptido derivado del CMV	conector $G_4S(G_3S)_2$	β 2-microglobulina	conector $(G_4S)_3$	Cadenas $\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3$	conector $(G_4S)_2$	Cadena ligera de anticuerpo
Péptido de señal	β -microglobulina	conector $(G_4S)_3$	Cadenas $\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3$	conector $(G_4S)_2$	Cadena ligera de anticuerpo	conector $(G_4S)_2$	Cadena ligera de anticuerpo
Péptido de señal	Péptido derivado del CMV	Conector $(G_3S)_2GG$	Cadenas $\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3$	conector $(G_4S)_3$	β -microglobulina	conector $(G_4S)_2$	Cadena ligera de anticuerpo
Péptido de señal	Péptido derivado del CMV	Conector GGPGGGS	Cadenas $\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3$	conector $(G_4S)_3$	β -microglobulina	conector $(G_4S)_2$	Cadena ligera de anticuerpo
Péptido de señal	Cadenas $\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3$	conector $(G_4S)_3$	β -microglobulina	conector $(G_4S)_2$	Cadena ligera de anticuerpo	conector $(G_4S)_2$	Cadena ligera de anticuerpo
Péptido de señal	Péptido derivado del CMV	Conector $(G_3S)_2GG$	Cadenas $\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3$	conector $(G_4S)_3$	Cadena ligera de anticuerpo	conector $(G_4S)_2$	Cadena ligera de anticuerpo
Péptido de señal	Péptido derivado del CMV	Conector GGPGGGS	Cadenas $\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3$	conector $(G_4S)_3$	Cadena ligera de anticuerpo	conector $(G_4S)_2$	Cadena ligera de anticuerpo
Péptido de señal	Péptido derivado del CMV	Conector $(G_3S)_2GG$	Cadenas $\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3$	conector $(G_4S)_3$	β -microglobulina	conector $(G_4S)_2$	Cadena pesada de anticuerpo

Tabla.

Péptido de señal	Péptido derivado del CMV	β 2-microglobulina	Cadenas α 1, α 2, α 3	Región de Fc de IgG	scFv
Péptido de señal	Péptido derivado del CMV	β 2-microglobulina	Cadenas α 1, α 2, α 3	Cadena pesada de anticuerpo	

Se ha encontrado que la expresión, y especialmente la secreción, de complejos que comprenden dos partes de un péptido derivado de un virus unido a un complejo de proteínas del MHC de clase I y por lo menos un dominio variable y un dominio constante de un anticuerpo no resulta posible en las células eucarióticas.

Además, se ha encontrado que la expresión, y especialmente la secreción, de complejos que comprenden dos polipéptidos de fusión que comprenden un péptido derivado de un virus unido a un complejo de proteínas del MHC de clase I, por lo menos un dominio variable y un par de polipéptidos derivados de la región bisagra unidos mediante disulfuro no resulta posible en las células eucarióticas.

De esta manera, en un complejo indicado en la presente memoria, no puede encontrarse presente en más de una copia un polipéptido de fusión que comprenda un péptido vírico unido a una proteína del MHC de clase I y debe encontrarse presente por lo menos un dominio variable de anticuerpo y un dominio constante de anticuerpo para permitir la producción y secreción del complejo utilizando células eucarióticas.

De esta manera, un complejo que comprenda exactamente un polipéptido de fusión de un péptido vírico unido a una proteína del MHC de clase I, una región bisagra de cadena pesada de anticuerpo y por lo menos un dominio variable de anticuerpo y un dominio constante de anticuerpo pueden producirse recombinantemente en células eucarióticas y ser secretadas a partir de las mismas. En una realización, el dominio o dominios constantes son un dominio constante 1 de cadena pesada de anticuerpo (CH1) o un dominio constante de cadena ligera (CL) de anticuerpo.

De esta manera, un complejo que comprenda una región bisagra de cadena pesada de anticuerpo, por lo menos un par de dominios variables

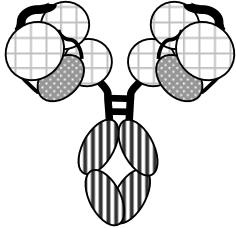
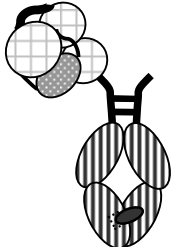
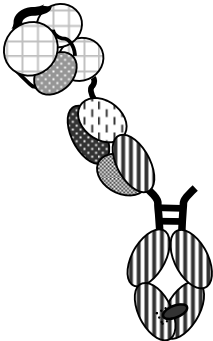
de anticuerpo, opcionalmente un dominio constante de anticuerpo y exactamente un polipéptido de fusión de un péptido vírico unido a una proteína del MHC de clase I pueden producirse recombinantemente en células eucarióticas y ser secretadas a partir de las mismas. En una
5 realización, el dominio o dominios constantes son un dominio constante 1 de cadena pesada de anticuerpo (CH1) o un dominio constante de cadena ligera (CL) de anticuerpo.

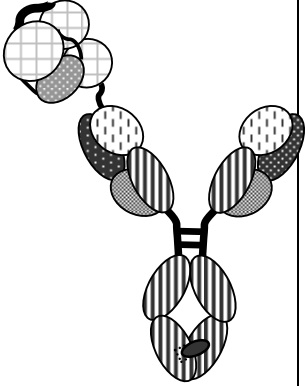
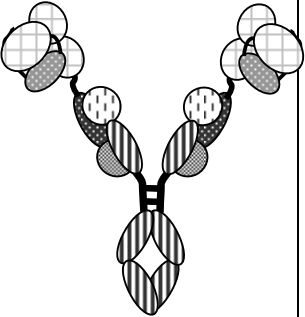
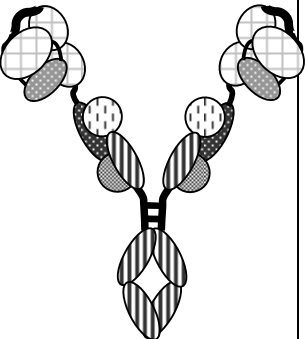
Se sometieron a ensayo diversas combinaciones de diferentes polipéptidos. La expresión secretada puede conseguirse mediante, por
10 ejemplo, la fusión N-terminal de un péptido de señal derivado de inmunoglobulina en el que el péptido derivado de un virus se fusiona N-terminalmente con la molécula de MHC de clase I. Puede modificarse el orden de las cadenas pesada ($\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$ que no presenta el dominio transmembrana y el dominio citoplasmático) y ligera ($\beta 2$ -microglobulina) de
15 la molécula de MHC de clase I. Los diferentes polipéptidos de fusión se fusionaron N-terminalmente con un polipéptido que comprendía una región bisagra de cadena ligera o de cadena pesada de anticuerpo. Se muestran las combinaciones ejemplares en la figura 2.

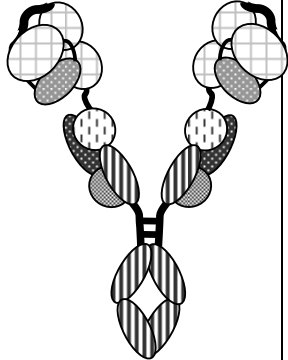
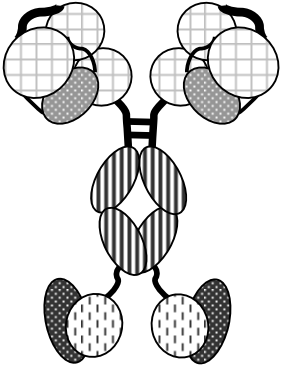
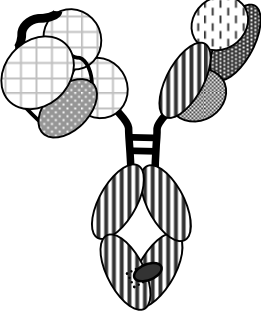
Tal como puede observarse a partir de la tabla a continuación, los
20 complejos que comprenden polipéptidos de fusión únicamente pueden expresarse con dominio variable de anticuerpo y polipéptidos derivados de la región bisagra de cadena pesada de anticuerpo en el caso de que se encuentre presente un único polipéptido de fusión de péptido vírico-microglobulina-HLA.

25 **Tabla.**

	Número de polipéptidos de fusión de péptido vírico-MHC de clase I	Número de dominios variables	número de dominios CH1	¿contiene polipéptido que comprende región bisagrada de cadena pesada de anticuerpo?	Nivel de expresión	Carril en la figura 3

	Número de polipéptidos de fusión de péptido vírico-MHC de clase I	Número de dominios variables	número de dominios CH1	¿contiene polipéptido que comprende región bisagrada de cadena pesada de anticuerpo?	Nivel de expresión	Carril en la figura 3
	2	0	0	sí	alt o	1
	1	0	0	sí	alt o	2
	1	1	1	sí	alt o	3

	Número de polipéptidos de fusión de péptido vírico-MHC de clase I	Número de dominios variables	número de dominios CH1	¿contiene polipéptido que comprende región bisagrada de cadena pesada de anticuerpo?	Nivel de expresión	Carril en la figura 3
	1	2	2	sí	alt o	4
	2	2	2	sí	Nu lo	5
	2	2	2	sí	nu lo	6

	Número de polipéptidos de fusión de péptido vírico-MHC de clase I	Número de dominios variables	número de dominios CH1	¿contiene polipéptido que comprende región bisagrada de cadena pesada de anticuerpo?	Nivel de expresión	Carril en la figura 3
	2	2	2	sí	nu lo	7
	2	2	0	sí	nu lo	8
	1	1	1	sí	alt o	9

En algunas realizaciones, el complejo indicado en la presente memoria comprende diferentes parejas de polipéptidos. Con el fin de realizar un apareamiento correcto de los polipéptidos puede utilizarse la tecnología de botón-en-ojal o la tecnología de reacción de mAb cruzados para reducir la cantidad de complejos incorrectamente asociados.

La modificación de botón se refiere a la mutación T366W en el dominio CH3 de un anticuerpo (numeración según el índice EU de Kabat).

La modificación de ojal se refiere a las mutaciones T366S, L368A e Y407V en el dominio CH3 de un anticuerpo (numeración según el índice EU de Kabat).

Además de la modificación de botón y ojal, pueden encontrarse presentes la mutación S354C en el dominio CH3 y la mutación Y349C en el otro dominio CH3.

Se informa de la tecnología de reacción de mAb en, por ejemplo, las patentes WO n° 2009/080251, n° 2009/080252, n° 2009/080254, n° 2009/080253, n° 2010/112193, n° 2010/115589, n° 2010/136172, n° 2010/145792 y n° 2010/145793.

3. Variantes

En determinadas realizaciones se encuentran contempladas variantes de secuencia de aminoácidos del complejo proporcionado en la presente memoria. Por ejemplo, puede resultar deseable mejorar la afinidad de unión y/o otras propiedades biológicas del complejo. Pueden prepararse variantes de la secuencia de aminoácidos del complejo mediante la introducción de modificaciones apropiadas en la secuencia de nucleótidos codificante de las cadenas polipeptídicas del complejo, o mediante síntesis peptídica. Entre dichas modificaciones se incluyen, por ejemplo, deleciones y/o inserciones y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos del complejo. Puede realizarse cualquier combinación de delección, inserción y sustitución para conseguir el constructo final, con la condición de que el constructo final presente las características deseadas, por ejemplo de unión a antígeno.

a) Variantes por sustitución, inserción y delección

En determinadas realizaciones se proporcionan variantes del complejo que presentan una o más sustituciones de aminoácidos en las cadenas polipeptídicas. Se muestran sustituciones conservadoras en la Tabla, posteriormente, bajo el título de "sustituciones preferentes". Se proporcionan cambios más sustanciales en la tabla, posteriormente, bajo el título de "sustituciones ejemplares", y tal como se describe adicionalmente después en referencia a las clases de cadena lateral de aminoácidos. Pueden introducirse sustituciones de aminoácidos en un complejo de interés y cribarse los productos para una actividad deseada, por ejemplo la unión conservada/mejorada a antígenos, una inmunogenicidad reducida o una ADCC o CDC mejoradas.

Tabla.

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

Residu o original	Sustituciones ejemplares	Sustitucion es preferentes
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

Los aminoácidos pueden clasificarse según propiedades de cadena lateral comunes:

- (1) hidrofóbicos: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile,
- (2) neutros hidrofílicos: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln,
- (3) ácidos: Asp, Glu,
- (4) básicos: His, Lys, Arg,
- (5) residuos que influyen sobre la orientación de la cadena: Gly, Pro,
- (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservadoras implican intercambiar un miembro de una de dichas clases por uno de otra clase.

Entre las inserciones de secuencia de aminoácidos se incluyen las fusiones amino-terminales y/o carboxilo-terminales de longitud comprendida entre un residuo y polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones dentro de una secuencia de un solo residuo o múltiples residuos aminoácidos. Entre los ejemplos de inserciones terminales se incluyen un complejo que comprende un polipéptido con un residuo metionilo N-terminal. Entre otras variantes por inserción se incluyen la fusión con el extremo N-terminal o C-terminal de las cadenas polipeptídicas del complejo con un enzima.

b) Variantes por glucosilación

En determinadas realizaciones, un polipéptido del complejo proporcionado en la presente memoria se altera para incrementar o reducir el grado en el que se encuentra glucosilado el polipéptido. La adición o delección de sitios de glucosilación a un polipéptido puede llevarse a cabo convenientemente mediante la alteración de la secuencia de aminoácidos de manera que se creen o se eliminen uno o más sitios de glucosilación.

En el caso de que el complejo comprenda una región Fc de anticuerpo, el carbohidrato unido a la misma puede alterarse. Las regiones Fc nativas producidas por las células de mamífero típicamente comprenden un oligosacárido biantenarico ramificado que generalmente se une mediante un
5 enlace del nitrógeno a Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Ver, por ejemplo, Wright A. y Morrison, S.L., TIBTECH 15:26-32, 1997. El oligosacárido puede incluir diversos carbohidratos, por ejemplo manosa, N-acetil-glucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como una fucosa unida a GlNAc en el "tallo" de la estructura del oligosacárido
10 biantenarico. En algunas realizaciones, pueden realizarse modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo de la invención con el fin de crear variantes de anticuerpo con determinadas propiedades mejoradas.

En una realización, se proporciona un complejo que comprende variantes de polipéptido que presentan una estructura de carbohidrato sin fucosa
15 unida (directa o indirectamente) a una región Fc. Por ejemplo, la cantidad de fucosa en dicha región Fc puede ser de entre 1% y 80%, de entre 1% y 65%, de entre 5% y 65% o de entre 20% y 40%. La cantidad de fucosa se determina calculando la cantidad media de fucosa en la cadena sacárida en Asn297, respecto a la suma de todas las glucoestructuras unidas a
20 Asn297 (por ejemplo estructuras complejas, híbridas y ricas en manosa), medida mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, tal como se describe en la patente WO nº 2008/077546, por ejemplo. Asn297 se refiere al residuo de asparagina situado en aproximadamente la posición 297 en la región Fc (numeración EU de los residuos de la región Fc); sin embargo,
25 Asn297 también puede estar situado aproximadamente ± 3 aminoácidos cadena arriba o abajo de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300, debido a variaciones menores de la secuencia en los anticuerpos. Dichas variantes por fucosilación pueden presentar una función ADCC mejorada. Ver, por ejemplo, las patentes US nº 2003/0157108 y nº
30 2004/0093621. Entre los ejemplos de publicaciones relacionadas con variantes de anticuerpo "desfucosiladas" o "deficientes en fucosa" se incluyen: las patentes US nº 2003/0157108, WO nº 2000/61739, WO nº 2001/29246, US nº 2003/0115614, US nº 2002/0164328, US nº 2004/0093621, US nº 2004/0132140, US nº 2004/0110704, US nº
35 2004/0110282, US nº 2004/0109865, WO nº 2003/085119, WO nº 2003/084570, WO nº 2005/035586, WO nº 2005/035778, WO nº 2005/053742, WO nº 2002/031140; Okazaki A. *et al.*, J. Mol. Biol.

336:1239-1249, 2004; Yamane-Ohnuki N. *et al.*, Biotech. Bioeng. 87:614-622, 2004. Entre los ejemplos de líneas celulares capaces de producir anticuerpos defucosilados se incluyen las células CHO Lec13 deficientes en fucosilación de las proteínas (Ripka J. *et al.*, Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545, 1986; patente US nº 2003/0157108 y WO nº 2004/056312, especialmente en el Ejemplo 11), y líneas celulares inactivadas, tales como el gen alfa-1,6-fucosiltransferasa, FUT8, células CHO inactivadas (ver, por ejemplo, Yamane-Ohnuki N. *et al.*, Biotech. Bioeng. 87:614-622, 2004; Kanda Y. *et al.*, Biotechnol. Bioeng. 94:680-688, 2006, y la patente WO nº 2003/085107).

Se proporcionan adicionalmente complejos que comprenden variantes de la región Fc con oligosacáridos bisectados, por ejemplo en los que un oligosacárido biantenarico unido a la región Fc se encuentra bisectado por GlcNAc. Dichas variantes pueden presentar una fucosilación reducida o una función ADCC mejorada o ambos. Se describen ejemplos de dichas variantes de anticuerpo en, por ejemplo, las patentes WO nº 2003/011878, US nº 6.602.684 y US nº 2005/0123546. También se proporcionan variantes de la región Fc con por lo menos un residuo de galactosa en el oligosacárido unido a la región Fc. Dichas variantes de región Fc pueden presentar una función CDC mejorada. Se describen variantes de anticuerpo correspondientes en, por ejemplo, las patentes WO nº 97/30087, nº 98/58964 y nº 99/22764.

c) Variantes de la región Fc

En determinadas realizaciones, pueden introducirse una o más modificaciones de aminoácidos en la región Fc de un polipéptido comprendido en el complejo proporcionado en la presente memoria, generando de esta manera una variante de región Fc. La variante de región Fc puede comprender una secuencia de región Fc humana (por ejemplo una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 ó IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácido (por ejemplo una sustitución) en una o más posiciones aminoácidas. En determinadas realizaciones, la invención contempla una variante de región Fc que presenta algunas, aunque no todas, las funciones efectoras, lo que la convierte en un candidato deseable para aplicaciones en la que la vida media del complejo *in vivo* resulta importante pero determinadas funciones efectoras (tales como el complemento y la ADCC) resultan innecesarias o perjudiciales.

Pueden llevarse a cabo ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/agotamiento de las actividades de CDC y/o ADCC. Por ejemplo, pueden llevarse a cabo ensayos de unión de receptor de Fc (FcR) con el fin de determinar que el complejo no presenta unión a FcγR (por lo tanto probablemente no presenta actividad de ADCC), aunque conserva la capacidad de unión a FcRn. Las células primarias para mediar en la ADCC, las células NK, únicamente expresan FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. Se resume la expresión de FcR sobre las células hematopoyéticas en la Tabla 3, en la página 464 de Ravetch J.V. y Kinet J.P., Annu. Rev. Immunol. 9:457-492, 1991. Se describen ejemplos no limitativos de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés en la patente US nº 5.500.362 (ver, por ejemplo, Hellstrom I. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:7059-7063, 1986; y Hellstrom I. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:1499-1502, 1985; patente US nº 5.821.337 (ver Bruggemann M. *et al.*, J. Exp. Med. 166:1351-1361, 1987). Alternativamente, pueden utilizarse métodos de ensayo no radioactivo (ver, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radioactivo ACTI™ para la citometría de flujo (CellTechnology, Inc., Mountain View, CA, y el ensayo de citotoxicidad no radioactivo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI)). Entre las células efectoras útiles para dichos ensayos se incluyen las células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMCs) y las células asesinas naturales (NK). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo en un modelo animal, tal como el dado a conocer en Clynes R. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:652-656, 1998. También pueden llevarse a cabo ensayos de unión de C1q para confirmar que el anticuerpo no puede unirse a C1q y que por lo tanto no presenta actividad de CDC. Ver, por ejemplo, el ELISA de unión de C1q y C3c en las patentes WO nº 2006/029879 y nº 2005/100402. Para evaluar la activación del complemento, puede llevarse a cabo un ensayo de CDC (ver, por ejemplo, Gazzano-Santoro H. *et al.*, J. Immunol. Methods 202:163-171, 1996; Cragg M.S. *et al.*, Blood 101:1045-1052, 2003; y Cragg M.S. y Glennie M.J., Blood 103:2738-2743, 2004). La unión de FcRn y las determinaciones de eliminación/vida media *in vivo* también pueden llevarse a cabo utilizando métodos conocidos de la técnica (ver, por ejemplo, Petkova S.B. *et al.*, Int. Immunol. 18:1759-1769, 2006).

Entre las regiones de Fc con una función efectora reducida se incluyen aquéllas con sustitución de uno o más de los residuos de la región Fc siguientes: 234, 235, 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (ver, por ejemplo, la patente US nº 6.737.056). Entre dichos mutantes de Fc se incluyen mutantes de Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones aminoácidas siguientes: 265, 269, 270, 297 y 327, incluyendo el mutante de Fc denominado "DANA", con sustitución de los residuos 265 y 297 por alanina (patente US nº 7.332.581).

Se describen determinadas variantes de región Fc con unión mejorada o reducida a FcRs. (ver, por ejemplo, las patentes US nº 6.737.056 y WO nº 2004/056312, y Shields R.L. *et al.*, J. Biol. Chem. 276:6591-6604, 2001).

En determinadas realizaciones, un polipéptido variante comprende una región Fc con una o más sustituciones de aminoácidos que mejoran la ADCC, por ejemplo sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración EU de los residuos).

En algunas realizaciones, se llevan a cabo alteraciones en la región Fc que resultan en una alteración (una mejora o una reducción) de la unión de Cq1 y/o de la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), por ejemplo tal como se describe en las patentes US nº 6.194.551 y WO nº 99/51642, y en Idusogie E.E. *et al.*, J. Immunol. 164:4178-4184, 2000.

Los anticuerpos con vidas medias incrementadas y unión mejorada al receptor de Fc neonatal (FcRn), el cual es responsable de la transferencia de las IgGs maternas al feto (Guyer R.L. *et al.*, J. Immunol. 117:587-593, 1976, y Kim J.K. *et al.*, J. Immunol. 24:2429-2434, 1994) se describen en la patente US nº 2005/0014934. Dichos anticuerpos comprende una región Fc con una o más sustituciones en la misma que mejoran la unión de la región Fc a FcRn. Entre dichas variantes de la región Fc se incluyen aquéllas con sustituciones en uno o más residuos de la región Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 ó 434, por ejemplo una sustitución del residuo 434 de la región Fc (patente US nº 7.371.826).

Ver también Duncan A.R. y Winter G., Nature 322:738-740, 1988; patentes US nº 5.648.260 y nº 5.624.821, y WO nº 94/29351, referentes a otros ejemplos de variantes de la región Fc.

d) Derivados

En determinadas realizaciones, un complejo proporcionado en la presente memoria puede modificarse adicionalmente para que contenga fracciones no proteicas adicionales que son conocidas de la técnica y que se encuentran fácilmente disponibles. Entre las fracciones adecuadas para la derivatización del complejo se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, los polímeros solubles en agua. Entre los ejemplos no limitativos de polímeros solubles en agua se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(n-vinilpirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de poli-óxido de propileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados (por ejemplo glicerol), alcohol polivinílico y mezclas de los mismos. El propionaldehído de polietilenglicol puede presentar ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular, y puede ser ramificado o no ramificado. El número de polímeros unidos al anticuerpo puede variar, y en el caso de que se una más de un polímero, pueden ser moléculas iguales o diferentes. En general, el número y/o tipo de polímeros utilizados para la derivatización puede determinarse basándose en varias consideraciones, entre ellas, aunque sin limitarse a ellas, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo que debe mejorarse, si el derivado de anticuerpo se utilizará en una terapia bajo condiciones definidas, etc.

En otra realización, se proporcionan conjugados de un complejo y una fracción no proteica que pueden calentarse selectivamente mediante exposición a radiación. En una realización, la fracción no proteica es un nanotubo de carbono (Kam N.W. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:11600-11605, 2005). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda e incluye, aunque sin limitarse a ellas, longitudes de onda que no dañan las células ordinarias, pero que calientan la fracción no proteica hasta una temperatura a la que las células próximas al anticuerpo-fracción no proteica resultan eliminadas.

B. Métodos y composiciones recombinantes

Pueden producirse complejos utilizando métodos y composiciones recombinantes, por ejemplo tal como se describe en la patente US nº 4.816.567. En una realización, se proporcionan en la presente memoria
5 ácidos nucleicos aislados codificantes de los polipéptidos del complejo. En una realización adicional, se proporcionan uno o más vectores (por ejemplo vectores de expresión) que comprenden dichos ácidos nucleicos. En una realización adicional, se proporciona una célula hésped que comprende dichos ácidos nucleicos. En una de dichas realizaciones, una célula
10 huésped comprende (por ejemplo ha sido transformada): (1) un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la VL del anticuerpo y una secuencia de aminoácidos que comprende la VH del anticuerpo, o (2) un primer vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende
15 la VL del anticuerpo y un segundo vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la VH del anticuerpo. En una realización, la célula huésped es eucariótica, por ejemplo una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula linfóide (por ejemplo una célula Y0, NS0 ó Sp2/0). En una realización, se
20 proporciona un método de preparación de un complejo indicado en la presente memoria, en la que el método comprende cultivar una célula huésped que comprende un ácido nucleico codificante de los polipéptidos del complejo, tal como se proporciona anteriormente, bajo condiciones adecuadas para la expresión de los polipéptidos y la formación del
25 complejo, y opcionalmente recuperar el complejo a partir de la célula huésped (o medio de cultivo de la célula huésped).

Para la producción recombinante de un complejo, se aísla el ácido nucleico codificante de los polipéptidos del complejo, por ejemplo tal como se ha
30 indicado anteriormente, y se inserta en uno o más vectores para la clonación y/o expresión adicionales en una célula huésped. Dicho ácido nucleico puede aislarse y secuenciarse fácilmente utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo mediante la utilización de sondas que son capaces de unirse específicamente a genes codificantes de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo).

35 Entre las células huésped adecuadas para vectores de clonación o expresión se incluyen células procarióticas o eucarióticas indicadas en la

presente memoria. Por ejemplo, pueden producirse complejos en bacterias, en particular en el caso de que no resulten necesarias funciones de glucosilación y efectora de Fc. Para la expresión de fragmentos de anticuerpo y polipéptidos en bacterias ver, por ejemplo, las patentes US nº 5.648.237, nº 5.789.199 y nº 5.840.523 (ver también Charlton K.A., en: Methods in Molecular Biology, vol. 248, Lo, B.K.C. (editor), Humana Press, Totowa, NJ, 2003, páginas 245 a 254, que describen la expresión de fragmentos de anticuerpos en *E. coli*). Tras la expresión, el complejo puede aislarse a partir de la pasta celular bacteriana en una fracción soluble y puede purificarse adicionalmente.

Además de los procariotas, los microbios eucarióticos, tales como hongos filamentosos o levaduras, son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores codificantes de polipéptidos, incluyendo cepas de hongos y levaduras cuyas rutas de glucosilación han sido "humanizadas", resultando en la producción de un anticuerpo con un patrón de glucosilación parcial o totalmente humano. Ver Gerngross T.U., Nat. Biotech. 22:1409-1414, 2004, y Li H. *et al.*, Nat. Biotech. 24:210-215, 2006.

También se derivan células huésped adecuadas para la expresión de complejos glucosilados a partir de organismos multicelulares (invertebrados y vertebrados). Entre los ejemplos de células de invertebrado se incluyen las células vegetales y de insecto. Se han identificado numerosas cepas baculovíricas que pueden utilizarse conjuntamente con las células de insecto, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

También pueden utilizarse cultivos de células vegetales como huéspedes. Ver, por ejemplo, las patentes US nº 5.959.177, nº 6.040.498, nº 6.420.548, nº 7.125.978 y nº 6.417.429 (que describen la tecnología PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas).

También pueden utilizarse las células de vertebrado como huéspedes. Por ejemplo, pueden resultar útiles líneas celulares de mamífero adaptadas para crecer en suspensión. Otros ejemplos de líneas celulares huésped de mamífero útiles son la línea renal de mono CV1 transformada por SV40 (COS-7), la línea renal embrionaria humana (células HEK 293 ó 293, tal como se describe en, por ejemplo, Graham F.L. *et al.*, J. Gen. Virol. 36:59-74, 1977), las células renales de hámster neonato (BHK), las células de

Sertoli de ratón (células TM4, tal como se describen en, por ejemplo, Mather J.P., Biol. Reprod. 23:243-252, 1980), las células renales de mono (CV1), las células renales de mono verde africano (VERO-76), las células de carcinoma cervical humano (HELA), las células renales caninas (MDCK; células hepáticas de rata búfalo (BRL 3A), las células pulmonares humanas (W138), las células hepáticas humanas (Hep G2), el tumor mamario de ratón (MMT 060562), las células TRI, tal como se describe en, por ejemplo, Mather J.P. *et al.*, Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68, 1982, las células MRC 5 y las células FS4. Entre otras líneas celulares huésped de mamífero útiles se incluyen las células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo las células CHO DHFR- (Urlaub G. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, 1980) y las líneas celulares de mieloma, tales como Y0, NS0 y Sp2/0. Para una revisión de determinadas líneas celulares huésped de mamífero adecuadas para la producción de anticuerpos ver, por ejemplo, Yazaki P. y Wu A.M., Methods in Molecular Biology, vol. 248, Lo, B.K.C. (editor), Humana Press, Totowa, NJ, 2004, páginas 255-268.

C. Formulaciones farmacéuticas

Se preparan formulaciones farmacéuticas de un complejo indicado en la presente memoria mediante la mezcla de dicho complejo que presenta el grado de pureza deseado con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16a edición, Osol A. (editor), 1980), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores farmacéuticamente aceptables son generalmente no tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones utilizadas, e incluyen, aunque sin limitarse a ellos: tampones, tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos, tales como metilparabén o propilparabén, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos, incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol,

trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo complejos de Zn-proteína) y/o surfactantes no iónicos, tales como polietilenglicol (PEG). Entre los portadores farmacéuticamente aceptables ejemplares en la presente memoria se incluyen además agentes de dispersión de fármaco intersticial, tales como glucoproteínas hialuronidasa solubles activas a pH neutro (sHASEGP), por ejemplo las glucoproteínas hialuronidasa PH-20 solubles humanas, tales como rhuPH20 (HYLENEX[®], Baxter International, Inc.). Determinadas sHASEGPs ejemplares y métodos de utilización, incluyendo rhuPH20, se describen en las patentes US nº 2005/0260186 y nº 2006/0104968. En un aspecto, se combina un sHASEGP con una o más glucosaminoglicanasas adicionales, tales como condroitinasas.

Se describen formulaciones de anticuerpo liofilizadas ejemplares en la patente US nº 6.267.958. Entre las formulaciones acuosas de anticuerpos se incluyen las descritas en las patentes US nº 6.171.586 y WO nº 2006/044908, incluyendo las últimas formulaciones un tampón de histidina-acetato.

La formulación en la presente memoria también puede contener más de un ingrediente activo, según resulte necesario para la indicación particular bajo tratamiento, preferentemente aquellos que presenten actividades complementarias que no interfieran mutuamente. Dichos ingrediente activos se encuentran presentes convenientemente en combinación en cantidades que resultan eficaces para el propósito pretendido.

Los ingredientes activos también pueden encapsularse en microcápsulas preparadas mediante, por ejemplo, técnicas de coacervado o mediante polimerización interfacial, por ejemplo hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármaco coloidal (por ejemplo liposomas, microesferas de albumina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se dan a conocer en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16a edición, Osol A., editor, 1980.

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Entre los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida se incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos, en las que las

matrices se encuentran en forma de artículos conformados, por ejemplo de película o microcápsula.

5 Las formulaciones que deben utilizarse para la administración *in vivo* generalmente son estériles. La esterilidad se consigue fácilmente, por ejemplo mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

D. Métodos y composiciones terapéuticos

Puede utilizarse cualquiera de los complejos proporcionados en la presente memoria en los métodos terapéuticos.

10 En un aspecto, se proporciona un complejo indicado en la presente memoria, para la utilización a modo de medicamento.

En aspectos adicionales, se proporciona un complejo indicado en la presente memoria, para la utilización en el tratamiento del cáncer o de una infección vírica.

15 En determinadas realizaciones se proporciona un complejo indicado en la presente memoria para la utilización en un método de tratamiento.

20 En determinadas realizaciones la invención proporciona un complejo indicado en la presente memoria para la utilización en un método de tratamiento de un individuo que presenta cáncer o una infección vírica, que comprende administrar en el individuo una cantidad efectiva del complejo indicado en la presente memoria. En una de dichas realizaciones, el método comprende además administrar en el individuo una cantidad efectiva de por lo menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo tal como se indica posteriormente.

25 En realizaciones adicionales, la invención proporciona un complejo indicado en la presente memoria, para la utilización en la eliminación de células cancerosas o para la eliminación de células infectadas por virus. En determinadas realizaciones, la invención proporciona un complejo indicado en la presente memoria, para la utilización en un método de eliminación de células cancerosas o de eliminación de células infectadas por virus en un individuo, que comprende administrar en el individuo una cantidad del complejo indicada en la presente memoria efectiva para eliminar las células cancerosas o para eliminar las células infectadas por virus. Un "individuo"

30

según cualquiera de las realizaciones anteriormente indicadas puede ser un ser humano.

5 En un aspecto adicional, la invención proporciona la utilización de un complejo indicado en la presente memoria, en la fabricación o preparación de un medicamento. En una realización, el medicamento está destinado al tratamiento del cáncer o de infecciones víricas. En una realización adicional, el medicamento está destinado a la utilización en un método de tratamiento del cáncer o de infecciones víricas, que comprende administrar en un individuo que presenta un cáncer o una infección vírica crónica, una cantidad efectiva del medicamento. En una de dichas realizaciones, el método comprende además administrar en el individuo una cantidad efectiva de por lo menos un agente terapéutico adicional. En una realización adicional, el medicamento está destinado a la eliminación de células cancerosas o a la eliminación de células infectadas por virus. En 10 una realización adicional, el medicamento está destinado a la utilización en un método de eliminación de células cancerosas o de eliminación de células infectadas por virus en un individuo, que comprende administrar en el individuo una cantidad del medicamento efectiva para eliminar células cancerosas o para eliminar células infectadas por virus. Un "individuo" según cualquiera de las realizaciones anteriormente indicadas puede ser un ser humano. 15 20

25 En un aspecto adicional, la invención proporciona un método de tratamiento del cáncer o de una infección vírica. En una realización, el método comprende administrar en un individuo que presenta dicho cáncer o infección vírica, una cantidad efectiva de un complejo indicado en la presente memoria. En una de dichas realizaciones, el método comprende además administrar en el individuo una cantidad efectiva de por lo menos un agente terapéutico adicional. Un "individuo" según cualquiera de las realizaciones anteriormente indicadas puede ser un ser humano.

30 En un aspecto adicional, la invención proporciona un método de eliminación de células cancerosas o células infectadas por virus en un individuo. En una realización, el método comprende administrar en el individuo una cantidad efectiva de un complejo indicado en la presente memoria, con el fin de eliminar células cancerosas o células infectadas por virus. En una realización, un "individuo" es un ser humano. 35

En un aspecto adicional, la invención proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los complejos indicados en la presente memoria, por ejemplo para la utilización en cualquiera de los métodos terapéuticos anteriormente indicados. En una realización, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de los complejos indicados en la presente memoria y un portador farmacéuticamente aceptable. En otra realización, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de los complejos indicados en la presente memoria y por lo menos un portador terapéutico adicional.

Los complejos de la invención pueden utilizarse solos o en combinación con otros agentes en una terapia. Por ejemplo, un complejo de la invención puede coadministrarse con por lo menos un agente terapéutico adicional.

Dichas terapias de combinación, indicadas anteriormente, comprenden la administración combinada (en la que se incluyen dos o más agentes terapéuticos en la misma formulación o en formulaciones separadas) y la administración separada, en cuyo caso la administración del complejo de la invención puede producirse antes, simultáneamente y/o después de la administración del agente terapéutico y/o adyuvante adicional. También pueden utilizarse complejos de la invención en combinación con terapia de radiación.

Puede administrarse un complejo de la invención (y cualquier agente terapéutico adicional) mediante cualquier medio adecuado, incluyendo las administraciones por vías parenteral, intrapulmonar e intranasal y, si se desea para el tratamiento local, intralesional. Entre las infusiones parenterales se incluyen la administración por vías intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. La dosificación puede realizarse mediante cualquier vía adecuada, por ejemplo mediante inyecciones, tales como las inyecciones intravenosa o subcutánea, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica. Se encuentran contempladas en la presente memoria diversos regímenes de administración, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, las administraciones individuales o múltiples en diversos puntos temporales, la administración de bolo y la infusión pulsada.

Los complejos de la invención se formulan, dosifican y administran de un modo consistente con las buenas prácticas médicas. Entre los factores a

considerar en el presente contexto se incluyen el trastorno particular bajo tratamiento, el mamífero particular bajo tratamiento, la condición clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el método de administración, el programa de administración y otros factores conocidos por el médico. Aunque no necesariamente, el complejo puede formularse opcionalmente con uno o más agentes utilizados actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad efectiva de dichos otros agentes depende de la cantidad de complejo presente en la formulación, del tipo de trastorno o tratamiento y de otros factores comentados anteriormente. Estos se utilizan generalmente a las mismas dosis y por vías de administración indicadas en la presente memoria, o con aproximadamente 1% a 99% de las dosis indicadas en la presente memoria, o en cualquier dosis y mediante cualquier vía que se determine empírica/clínicamente que resulta apropiada.

Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosis apropiada de un complejo de la invención (utilizado solo o en combinación con otro u otros agentes terapéuticos adicionales) dependerá de: el tipo de enfermedad que debe tratarse, el tipo de complejo, la severidad y el curso de la enfermedad, si el complejo se ha administrado con fines preventivos o terapéuticos, la terapia anterior, la historia clínica del paciente y la respuesta al complejo, y el criterio del médico responsable. El complejo se administra convenientemente en el paciente de una vez o en una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y severidad de la enfermedad, entre aproximadamente 1 µg/kg y 15 mg/kg (por ejemplo entre 0,5 mg/kg y 10 mg/kg) de complejo puede ser una dosis candidata inicial para la administración en el paciente, mediante, por ejemplo, una o más administraciones individuales o mediante infusión continua. Una dosis diaria típica puede encontrarse comprendida entre aproximadamente 1 µg/kg y 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores indicados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la condición, el tratamiento generalmente se prolongaría hasta producirse la supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Una dosis ejemplar del anticuerpo se encontraría comprendida en el intervalo de entre aproximadamente 0,05 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg. De esta manera, pueden administrarse en el paciente una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg ó 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas). Dichas dosis pueden administrarse

intermitentemente, por ejemplo cada semana o cada tres semanas (por ejemplo de manera que el paciente reciba entre aproximadamente dos y aproximadamente veinte, o por ejemplo aproximadamente seis, dosis del anticuerpo). Puede administrarse una dosis inicial de carga más elevada, seguido de una o más dosis más bajas. Sin embargo, otros regímenes de administración pueden resultar útiles. El seguimiento del progreso de esta terapia puede llevarse a cabo fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

Se entiende que cualquiera de las formulaciones o métodos terapéuticos anteriormente indicados puede llevarse a cabo utilizando un inmunoconjugado de la invención en sustitución o adicionalmente a un complejo indicado en la presente memoria.

Un aspecto indicado en la presente memoria es el complejo indicado en la presente memoria para la utilización en un método de tratamiento de un cáncer o de una infección vírica en un paciente, en el que el complejo debe administrarse antes, simultáneamente o después de la inmunización del paciente con el péptido vírico comprendido en el complejo.

Un aspecto indicado en la presente memoria es la utilización de un complejo indicado en la presente memoria para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de un cáncer o de una infección vírica en combinación con la inmunización contra el péptido vírico comprendido en el complejo.

En la primera etapa, el péptido vírico contenido en el complejo se administra en primer lugar al individuo que debe tratarse. Después de un determinado periodo de tiempo, de 4 a 28 días, el complejo indicado en la presente memoria se administra en el individuo.

Mediante dicha aplicación sucesiva e independiente del polipéptido derivado de un virus, en una primera etapa solo y en la segunda etapa en el complejo indicado en la presente memoria, resulta posible incrementar el número de células T específicas del péptido vírico y, de esta manera, incrementar la eficacia del tratamiento.

III. Artículos fabricados

En otro aspecto de la invención, se proporciona un artículo fabricado que contiene materiales útiles para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El artículo fabricado comprende un recipiente y una etiqueta o impreso para el paquete sobre el recipiente o asociado al mismo. Entre los recipientes adecuados se incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, bolsas de solución I.V., etc. Los recipientes pueden formarse a partir de una diversidad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que resulta efectiva, por sí misma o combinada con otra composición, para tratar, prevenir y/o diagnosticar la condición y puede presentar una abertura de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial con un tapón perforable con una aguja de inyección hipodérmica). Por lo menos un agente activo en la composición es un complejo de la invención. La etiqueta o impreso en el paquete indica que la composición se utiliza para el tratamiento de la condición seleccionada. Además, el artículo fabricado puede comprender: (a) un primer recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un complejo de la invención, y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un agente adicional citotóxico o de otro modo terapéutico. El artículo fabricado en la presente realización de la invención puede comprender además un impreso en el paquete que indique que las composiciones pueden utilizarse para tratar una condición particular. Alternativamente, o adicionalmente, el artículo fabricado puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprenda un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y para el usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

Se entiende que cualquiera de los artículos fabricados puede incluir un inmunoconjugado de la invención en sustitución o adicionalmente a un complejo indicado en la presente memoria.

IV. EJEMPLOS

5 A continuación se proporcionan ejemplos de métodos y composiciones de la invención. Se entiende que pueden ponerse en práctica una diversidad de otras realizaciones, dada la descripción general proporcionada anteriormente.

Ejemplo 1

Procedimiento de aislamiento y estimulación de células T CD8-positivas específicas del CMV procedentes de donantes humanos

Aislamiento de PBLs

10 Se aislaron PBLs mediante centrifugación en un gradiente Ficoll a partir de sangre de donantes humanos (Greiner bio-one, nº de cat. 227290). Se cultivaron PBLs en RPMI suplementado con suero humano al 5% (Sigma, nº de cat. H2520), L-glutamina 2 mM (PAN Biotech, nº de cat. P04-80100), penicilina/estreptomicina 100 µg/ml (Roche, nº de cat. 14001100).

Estimulación de las PBLs

15 Se cultivaron células (2×10^7 células/ml) en medio de cultivo celular suplementado con 50 µg/ml de péptido derivado de pp65 de CMV (SEC ID nº 01) durante dos horas bajo condiciones de cultivo celular (37°C, 5% de CO₂, 80% de humedad). A continuación, la suspensión celular se diluyó 20
20 veces con medio de cultivo y se cultivó adicionalmente en placas de 96 pocillos de fondo plano a una densidad de siembra de 2×10^5 células en cada pocillo. Tras 4 a 5 días, se añadieron 20 U/ml de IL-2 (Roche, nº de cat. 11011456001), 25 ng/ml de IL-7 (Preprotech, nº de cat. 200-01) y 25 ng/ml de IL-15 (Preprotech, nº de cat. 200-15) y las células se cultivaron
25 durante otros 7 a 8 días. La estimulación de las células T es visible bajo el microscopio en forma de agrupamientos celulares.

Re-estimulación de las PBLs

30 Las células T se cocultivaron con células estimuladoras, que son PBLs primarias autólogas del mismo donante pulsadas con péptido (recién preparadas o derivadas de reservas congeladas). Las células estimuladoras se pulsaron con el péptido tal como se ha indicado anteriormente. Tras las dos horas de incubación con péptido, las PBLs se irradiaron (4.000 rad; STS GmbH OB29 nº 9510-5) y se lavaron dos veces

5 en medio de cultivo sin péptido. La re-estimulación se llevó a cabo en placas de 96 pocillos de fondo plano. Se utilizaron 8×10^4 a 1×10^5 células estimuladoras por pocillo. Las células procedentes del cultivo primario se lavaron dos veces con medio de cultivo, se resuspendieron en 200 μ l de medio de cultivo y se transfirieron 80 μ l a cada pocillo con las células estimuladoras. Tras 3 días, se añadieron 20 U/ml de IL-2, 25 ng/ml de IL-7 y 25 ng/ml de IL-15. Las células proliferaron y se expandieron cada 2 a 3 días en pocillos nuevos con medio fresco.

Análisis de las células T

10 Las células se tiñeron para la expresión de CD8 (BD, nº de cat. 345772) y receptores de células T específicas del CMV (ProlImmune, nº de cat. F008-4A-E) y se analizaron mediante FACS.

Medio de cultivo celular

15 RPMI1640 (Pan Biotech, nº de cat. P04-17500), suero humano al 5% (HS; Sigma nº de cat. H2520), L-glutamina 2 mM (PAN Biotech, nº de cat. P04-80100), 100 μ g/ml de penicilina/estreptomicina (Roche, nº de cat. 14001100).

Resultados

20 Se llevó a cabo el análisis FACS de linfocitos sanguíneos periféricos (PBLs) derivados de cuatro donantes humanos. Las células se marcaron con un anticuerpo anti-CD8 conjugado con FITC (BD, nº de cat. 345772) combinado con pentámero Pro5 conjugado con APC (ProlImmune, nº de cat. F008-4A-E) para teñir las células T que portan un receptor de células T (TCR) que reconoce el MHC de clase I (HLA-A*0201) cargado con péptido derivado del CMV (NLVPMVATV (SEC ID nº 01)). Para los resultados ver la figura 4. El día 0 los donantes 1 y 4 portaban un número bajo de células T CD8 específicas del CMV (0,08% y 0,1%, respectivamente). Los donantes 2 y 3 portaban un número más alto de células T CD8 específicas del CMV en su sangre periférica (0,25% y 3,12%, respectivamente).

25

30 Catorce días después de la estimulación con células autólogas pulsadas con péptido derivado del CMV, únicamente los donantes 2 y 3 mostraron un incremento significativo de las células T CD8 específicas del CMV (6,2% y 71,2%, respectivamente), mientras que los donantes 1 y 4 no mostraron números incrementados de células T CD8 específicas del CMV

(0,01% y 0,05%, respectivamente). Otros 14 días después, tras una segunda estimulación con células autólogas pulsadas con péptido derivado del CMV los donantes 2 y 3 mostraron un incremento adicional de las células T CD8 específicas del CMV (15,1% y 96,6%, respectivamente).

5 **Ejemplo 2**

Ensayo de citotoxicidad

Las células de leucemia linfoblástica aguda MN60 portan el alelo A*0201 HLA-A. Las células MN60 (1×10^6 células/ml) se incubaron con 50 µg/ml de péptido pp65 de CMV (SEC ID nº 01) durante 45 minutos bajo condiciones de cultivo celular (37°C, 5% de CO₂, 80% de humedad). La incubación resultó en un intercambio de péptido en el surco de unión de péptidos de HLA-A*0201. Las células MN60 con intercambio de péptido se centrifugaron y se diluyeron hasta una densidad de 1×10^6 células/ml con PBS (PanBiotech, nº de cat. P04-36500) y se tiñeron con 1 µM del trazador celular succinimidil-éster de carboxifluoresceína (CFSE, Invitrogen, nº de cat. 34554) durante 15 minutos a temperatura ambiente (RT). Las células se lavaron seguidamente una vez con PBS y se diluyeron hasta 1×10^5 células/ml con medio AIM-V (Gibco, nº de cat. 0870112DK). Para el ensayo, se cocultivaron células MN60 (células diana) en placas de 96 pocillos de fondo redondo con células T CD8⁺ específicas de CMV derivadas del donante humano 3 (células efectoras, ver el Ejemplo 1) durante cuatro horas bajo condiciones de cultivo celular. La proporción de células efectoras a células diana era de 4:1. Las células muertas se tiñeron con 1 µl/100 µl de yoduro de propidio (PI, Sigma, nº de cat. P-4864) y se analizaron mediante FACS.

Resultados

Se realizó un análisis de citometría de flujo para analizar la capacidad citolítica de las CTLs estimuladas mediante lisis de células tumorales MN60 cargadas con péptido de CMV.

30 En la figura 5a se muestra el análisis de FACS de un cocultivo de células MN60 no cargadas con el péptido derivado de CMV. Las células MN60 son positivas para FITC. Las células efectoras son negativas para FITC. Las células muertas son positivas para PI, las células vivas son negativas para PI. Puede observarse que más de 85% de las células MN60 se encuentran

vivas en el caso de que no se encuentren cargadas con el péptido derivado del CMV (Q2 y Q4).

5 En la figura 5 se muestra el análisis de FACS de las células MN60 cargadas con péptido derivado de CMV. Puede observarse que más de 80% de las células MN60 se encuentran muertas (Q2 y Q4), mientras que la proporción de células efectoras vivas a muertas no resulta notablemente alterado entre los análisis de FACS mostrados en las figuras 5a y 5b (comparar Q1 y Q3 en las figuras 5a y 5b), indicando que se ha producido una lisis específica de las células diana cargadas con péptido de CMV.

10 Análisis de citometría de flujo para analizar la capacidad citolítica de las CTLs estimuladas mediante lisis de células tumorales MN60 cargadas con péptido de CMV según la proporción de células efectoras a células diana:

15 Se llevó a cabo el análisis citotóxico tal como se ha indicado anteriormente. Se aplicaron diferentes proporciones de células efectoras a células diana, comprendidas entre 0,5 células efectoras por célula diana y cuatro células efectoras por célula diana (ver la figura 6). El tiempo de incubación fue de cuatro horas. Las células MN60 que no se encontraban cargadas con el péptido derivado del CMV no mostraron un número incrementado de células muertas con una proporción de efectoras a diana incrementada, es decir, comprendida entre 8% y 13% con una proporción de 0,5:1 a 4:1.

20 Prácticamente el 20% de las células MN60 cargadas con péptido derivado del CMV ya se encontraban muertas con una proporción de efectoras a diana baja, de 0,5:1, en cuatro horas. El número de células muertas se incrementó acusadamente al incrementar la proporción de efectoras a diana hasta el 83% a una proporción de células efectoras por célula diana de 4:1.

Ejemplo 3

Preparación, transfección, expresión, purificación y análisis de ADN

Preparación del ADN

30 Se recolectaron 250 ml de cultivo bacteriano en LB de la incubación durante la noche y se extrajo el ADN plasmídico siguiendo el protocolo del fabricante (kit High Speed Maxi, Qiagen, nº de cat. 12663). El ADN plasmídico resultante se eluyó en 1 ml de tampón TE y se determinó la

concentración de ADN mediante una medición espectrofotométrica (Epoch, BioTek).

El vector de expresión final comprendía los elementos siguientes:

- sitios de restricción endonucleolítica HindIII, NheI,
- un promotor de CMV,
- un 5'UTR 1 (derivado del CMV humano),
- Intrón A,
- un 5'UTR 2,
- un gen de resistencia a la ampicilina,
- un sitio poliA de la BGH (señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina)
- Ori de pUC.

Secuencias de aminoácidos de los elementos del complejo

Péptido pp65 del CMV: SEC ID nº 01
15 NLVPMVATV

Conector 1: SEC ID nº 21
GGGGSGGGSGGGGS

β2-microglobulina: SEC ID n° 10

20 IQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEV
DLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWFSFYLLYYTEFTPTE
KDEYACRVNHVTLSPKIVKWDRDM

Conector 2: SEC ID nº 22
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

HLA-A*0201 α 1 - α 3: SEC ID n° 11

25 GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRFIAVGYVDDTQFVRF
DSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDGETRKYKAHS
QTHRVDLGTLRGYYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGSD
WRFLRGYHQYAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQ
TTKHKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRYLENGKE
30 TLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFPYAEIT
LTWQRDGEDQTQDTELVETRPAGDGTFFQKWAAVVV
PSGQEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRW

Conector 3: SEC ID nº 12
GS

Conector 4: SEC ID nº 22
GGGSGGGSGGGSGGGGS

5 **cadena ligera de Ig:** SEC ID nº 41
 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQ
 QKPGQAPRLLIYDASKRATGIPARFSGSGSGTDFTLT
 SSLEPEDFAVYYCQQRSKWPPWTFGQGTKVESKRT
 VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV
10 QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLS
 KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

cadena pesada de Ig (IgG1-mutante L234A, L235A):

SEC ID nº 42
 QVELVESGGGVVQPGRSQRLSCAASGFTFSSYGMH
15 WVRQAPGKGLEWVAIIWFDGSSTYYADSVRGRFTIS
 RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARELGRRYFDL
 WGRGTLVSVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL
 GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
 LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV
20 EPKSCDKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTL
 MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
 KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
 SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN
 QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
25 LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALH
 NHYTQKSLSLSPGK

**cadena pesada de Ig (IgG1-mutante L234A, L235A con variación de
botón): SEC ID nº 43**

 QVELVESGGGVVQPGRSQRLSCAASGFTFSSYGMH
30 WVRQAPGKGLEWVAIIWFDGSSTYYADSVRGRFTIS
 RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARELGRRYFDL
 WGRGTLVSVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL
 GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
 LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV
35 EPKSCDKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTL

5 MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTK
NQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPP
VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK

cadena pesada de Ig (IgG1-mutante L234A, L235A con variación de ojal):SEC ID nº 44

10 QVELVESGGGVVQPGRSQRLSCAASGFTFSSYGMH
WVRQAPGKGLEWVAIIWFDGSSTYYADSVRGRFTIS
RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARELGRRYFDL
WGRGTLVSVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL
GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
15 LYSLSSTVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV
EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTK
NQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPP
20 VLDSGDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK

región Fc de cadena pesada de Ig (IgG1-mutante L234A, L235A variante mutante de botón de región Fc):

SEC ID nº 45
25 EPKSADKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTK
NQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPP
30 VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK

scFv: SEC ID nº 46

35 QVELVESGGGVVQPGRSQRLSCAASGFTFSSYGMH
WVRQAPGKCLEWVAIIWFDGSSTYYADSVRGRFTIS
RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARELGRRYFDL

WGRGTLVSVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIV
LTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQK
PGQAPRLLIYDASKRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISS
LEPEDFAVYYCQQRSKWPPWTFGCGTKVESK

5 Transfección

Se diluyeron células HEK 293 hasta 8×10^5 células/ml el día antes de la transfección. Se transfectaron aproximadamente 1 a $1,6 \times 10^6$ células/ml siguiendo el protocolo del fabricante. Para un volumen de transfección final de 30 ml, se diluyeron 30 µg de ADN hasta un volumen final de 1 ml con medio sérico reducido Opti-MEM® (Gibco, nº de cat. 31985070). Se diluyeron igualmente 2 µl de reactivo 293fectin™ (Invitrogen, nº de cat. 12347019) por cada 1 µg de ADN hasta un volumen final de 1 ml con medio Opti-MEM® y se incubaron durante 5 minutos. Tras la incubación, el ADN diluido se añadió al reactivo diluido 293fectin™, se mezcló suavemente, se incubó durante 20 a 30 minutos adicionales y seguidamente se pipeteó gota a gota a 28 ml de las células HEK 293, obteniendo un volumen final de 30 ml. Las células se incubaron bajo condiciones de cultivo celular (37°C, 8% de CO₂, humedad del 80%) en un agitador orbital girando a 125 rpm y se recolectaron tras 72 horas. Lo recolectado se centrifugó durante 10 minutos a 1.000 rpm, durante 10 minutos a 3.000 rpm y se filtró a través de un filtro estéril de 22 µm (Millipore, nº de cat. SCGPU05RE).

Transferencia western

Se concentraron 500 µl de sobrenadante de cultivo celular con un dispositivo de centrifugación Pall Nanosep Omega-Membran 30KD (Pall, nº de cat. OD030C33) hasta un volumen de 50 µl. Se diluyeron 17,5 µl de cada concentrado hasta un volumen final de 25 µl con 4x tampón para muestras XT (BioRad, nº de cat. 161-0791) y 20x agente reductor XT (BioRad, nº de cat. 161-0792), se calentó durante 8 minutos a 96°C y se aplicó en un gel premoldeado Criterion XT al 4-12% (nº de cat. 345-0124). Se llevó a cabo la transferencia con una celda de transferencia semiseca Trans-Blot SD (BioRad) a 20 V durante 30 minutos en una membrana de nitrocelulosa pura Trans-blot (0,45 µm) (BioRad, nº de cat. 162-0117). El bloqueo de la membrana se llevó a cabo con 1x reactivo de bloqueo Western (Roche, nº de cat. 11921681001) durante una hora a temperatura

ambiente. La tinción se llevó a cabo con anticuerpo policlonal de conejo anti-cadena ligera κ humana conjugado con peroxidasa (DAKO, nº de cat. P0129, diluido 1:3.000) y conjugado de anticuerpo policlonal de conejo anti-IgG humana-HRP (DAKO, nº de cat. P0214, diluido 1:5.000) durante una hora a temperatura ambiente. Se llevó a cabo la detección de luminiscencia con un LUMI-Imager F1 (Roche).

Purificación

Se separaron las células del medio de cultivo mediante centrifugación. Los complejos se purificaron de los sobrenadantes mediante cromatografía de afinidad a proteína A (MabSelect-sefarosa en un sistema ÄKTA-Avant). Los complejos eluidos se concentraron con tubos de centrifugación Amicon hasta una concentración de proteínas de 3 mg/ml. Se analizó una alícuota en una columna de cromatografía de exclusión por tamaño (HPLC TSKgel GFC300 Sys89). Se llevó a cabo una SEC preparativa en un Superdex 200 para separar los agregados y tamponar las proteínas de fusión en histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0. Los complejos eluidos se concentraron con un tubo de centrifugación Amicon hasta una concentración de proteínas de 1 mg/ml y se esterilizaron mediante filtración (0,2 μ m de tamaño de poro).

Análisis

Se analizaron muestras complejas a partir de la DO280 utilizando un espectrofotómetro de UV para determinar la concentración de las proteínas en solución. Se calculó el coeficiente de extinción requerido para ello a partir de la secuencia de aminoácidos según Pace (Pace *et al.*, Protein Science 4:2411-2423, 1995). Se llevó a cabo una cromatografía de exclusión por tamaño (SE-HPLC) en columnas TSK-Gel300SWXL o Superdex 200 con un tampón de fosfato potásico 0,2 M que comprendía KCl 0,25 M, pH 7,0, a modo de fase móvil con el fin de determinar el contenido de especies monoméricas, agregadas y degradadas en las muestras. Se llevó a cabo electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato sódico (SDS) (condiciones reductoras y no reductoras) con el fin de analizar la pureza de las preparaciones de complejo con respecto a los productos de degradación relacionados con el producto y las impurezas no relacionadas. Se llevó a cabo una espectrometría de masas de ionización por electropulverización (ESI-MS) con muestras reducidas (TCEP) y desglucosiladas (N-glucosidasa F) para confirmar la

5 masa/identidad correctas de cada cadena y detectar modificaciones químicas. Se llevó a cabo la ESI-MS de las muestras desglucosiladas para analizar la naturaleza y calidad de la proteína totalmente ensamblada y detectar los productos secundarios relacionados con el producto potenciales.

Método SDS-PAGE y tinción de Coomassie

Dispositivo: Invitrogen XCell Sure Lock Mini-Cell
Gel: Gel Tris-glicina al 4-20%, Invitrogen EC6025BOX
10 Tampón: Tampón de migración Tris-glicina SDS (10x),
Invitrogen LC2675-5
Tampón para muestras: Tampón para muestras Tris-glicina SDS (2x),
Invitrogen LC2676
Tampón reductor: Agente reductor de muestras NuPAGE (10x),
Invitrogen NP0004
15 Marcador de peso molecular: Mark 12, estándar de PM, Invitrogen
LC5677

Preparación de muestras de proteínas

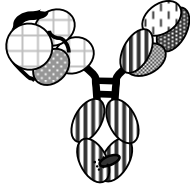
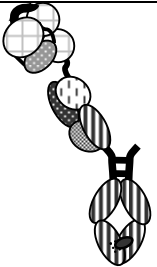
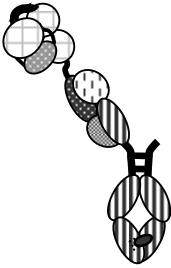
La muestra se ajustó a una concentración de proteínas de 1 mg/ml con tampón. Para la reducción de las muestras, se llevó a cabo el
20 procedimiento siguiente:

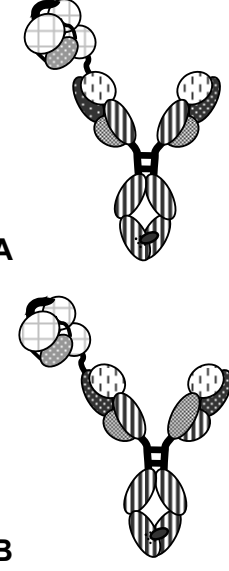
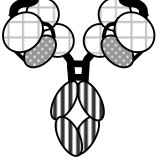
- Tampón reductor: 4 ml de tampón para muestras (2x) y 1 ml de tampón reductor (10x)
- dilución de las muestras 1:1 con tampón reductor
- incubación durante 5 minutos a 70°C

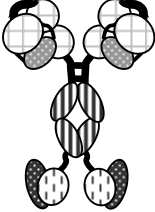
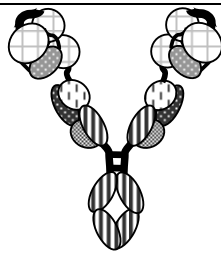
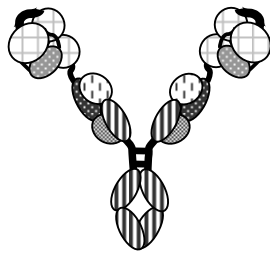
25 Se llevó a cabo una electroforesis en gel a 125 V durante 90 minutos. Los geles se tiñeron con tinción Simply Blue Safe Stain (Invitrogen, nº de cat. LC6065).

Resultados

Tabla.

Nº	Polipéptidos comprendidos en el complejo	esquema	rendimiento
1	1. [péptido pp65 de CMV]-[conector 1]-[β2-microglobulina]-[conector 2]-[HLA-A-α1-α2-α3]-[conector 3]-[IgG1-L234A, L235A mutante con variación de botón] 2. cadena pesada de Ig (IgG1-L234A, L235A con variación de botón) 3. cadena ligera de Ig		5 mg/l
2	A: 1. [péptido pp65 de CMV]-[conector 1]-[β2-microglobulina]-[conector 2]-[HLA-A-α1-α2-α3]-[conector 3]-[IgG1-L234A, L235A mutante con variación de botón] 2. IgG1-región Fc mutante L234A, L235A-variante de botón 3. cadena ligera de Ig B: Fusión con la cadena ligera de Ig	A  B 	A: 5 -18 mg/l

Nº	Polipéptidos comprendidos en el complejo	esquema	rendimiento
3	A: 1. [péptido pp65 de CMV]-[conector 1]-[β2-microglobulina]-[conector 2]-[HLA-A-α1-α2-α3]-[conector 3]-[IgG1-L234A, L235A mutante con variación de botón] 2. IgG1-mutante L234A, L235A-con variante de botón 3. cadena ligera de Ig B: Fusión con la cadena ligera de Ig	 A B	A: 4 - 23 mg/l
4	1. [péptido pp65 de CMV]-[conector 1]-[β2-microglobulina]-[conector 2]-[HLA-A-α1-α2-α3]-[conector 3]-[IgG1-L234A, L235A mutante con variación de ojal] 2. IgG1-mutante L234A, L235A-con variante de botón		4 mg/l
5	1. [péptido pp65 de CMV]-[conector 1]-[β2-microglobulina]-[conector 2]-[HLA-A-α1-α2-α3]-[conector 3]-[IgG1-L234A, L235A región Fc]		4 mg/l

Nº	Polipéptidos comprendidos en el complejo	esquema	rendimiento
6	1. [péptido pp65 de CMV]-[conector 1]-[β2-microglobulina]-[conector 2]-[HLA-A-α1-α2-α3]-[conector 3]-[IgG1-mutante L234A, L235A región Fc]-[conector 4]-[scFv]		< 1 µg/l
7	A: 1. [péptido pp65 de CMV]-[conector 1]-[β2-microglobulina]-[conector 2]-[HLA-A-α1-α2-α3]-[conector 3]-[IgG1-mutante L234A, L235A] 2. cadena ligera de Ig B: Fusión con la cadena ligera de Ig	A  B 	< 1 µg/l

El gel SDS con tinción de Coomassie y los cromatogramas de SEC correspondientes de los complejos seleccionados números 1 y 2a según la tabla anteriormente proporcionada se muestran en las figuras 7 y 8. Puede observarse que pueden obtenerse los complejos definidos.

5

Ejemplo 4

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

10

Se diluyeron células H460M2 hasta 8×10^5 células/ml en medio AIM-V (Gibco, nº de cat. 0870112DK). Se tiñeron 500 µl de la suspensión celular con 10 µg de un complejo tal como se indica en la presente memoria a 4°C o a 37°C durante una hora. A continuación, las células se lavaron con medio AIM-V helado y se tiñeron con un segundo anticuerpo, que era un

anticuerpo F(ab')₂ de cabra anti-IgG (H+L) humano conjugado con R-PE (Dianova, n° de cat. 109-116-088, dilución 1:50) durante 30 minutos a 4°C. A continuación, las células se lavaron una vez con medio AIM-V helado y se midió la fluorescencia mediante FACS Canto II (BD Bioscience) con selección para las células vivas. Un anticuerpo biespecífico sirvió como control de isotipo y un anticuerpo anti-IGF-1R (ver, por ejemplo, las patentes WO n° 2004/087756 y n° 2007/115814) como control positivo.

Resultados

Se muestran los resultados en la figura 9. Al considerar el desplazamiento en la medición de la fluorescencia de PE (eje X), el complejo indicado en la presente memoria no mostraba ninguna diferencia visible de unión a las células H460M2 diana (figura 9-2) en comparación con el anticuerpo de control (figura 9-6). Tampoco se observaba ninguna diferencia al incubar con el complejo indicado en la presente memoria a 4°C o a 37°C (comparar la figura 9-2 con la figura 9-3). Ni la incubación con el isotipo de control (figura 9-4) ni con el anticuerpo secundario marcado fluorescentemente solo (figura 9-5) mostraron ningún desplazamiento en la medición de la fluorescencia de PE. A pesar de la fusión de la molécula de MHC de clase I, el dominio variable de anticuerpo del complejo indicado en la presente memoria todavía se unía a las células H460M2 diana.

Aunque la presente invención ha sido descrita en cierto detalle mediante ilustraciones y ejemplos en aras de la claridad de comprensión, las descripciones y ejemplos no deben interpretarse como limitativos del alcance de la invención. Las descripciones de todas las patentes y literatura científica citados en la presente memoria se incorporan expresamente en su totalidad como referencias.

Ejemplo 5

Eliminación in vitro de células expresantes de antígenos

Se sembraron células diana I24 (1x10⁵ células/ml) en medio de cultivo celular (RPMI 1640 suplementado con L-glutamina 2 mM, piruvato sódico 1 mM, NEAA 0,1 mM y FCS al 10% (v/p)) en placas de fondo de vidrio WillCo (FA. WillCo Wells BV, REF GWST-3522) durante 24 a 48 horas. Se pre-recubrieron placas de fondo de vidrio WillCo con 50 µg/ml de hidrocloreuro de poli-L-lisina (Sigma Aldrich, n° de cat. P2658) en cada placa durante 30

minutos. Tras recubrir las placas, se enjuagaron completamente con agua estéril de grado cultivo de tejidos y se secaron durante dos horas.

- Tras el cultivo, se eliminó el medio de cultivo celular y se añadió el complejo de unión a antígeno que comprendía un polipéptido de fusión [péptido pp65 de CMV]-[conector 1]-[β 2-microglobulina]-[conector 2]-[HLA-A- α 1- α 2- α 3]-[conector 3]-[Ig1 con región Fc mutante L234A, L235A con variación de ojal], un polipéptido IgG1 con región Fc mutante L234A, L235A variante de botón unido con disulfuro y una cadena ligera de Ig, en el que el complejo se une específicamente a IGF-1R humana indicada en la presente memoria (ver, por ejemplo, el Ejemplo 3), a una concentración final de 5 μ g/ml en tampón K⁺ Krebs Ringer HEPES 3 mM, pH 7,3 (suplementado con DL-ditiotreitol 0,5 mM, ácido ascórbico 1 mM y glutatión 4 mM).
- Se añadieron células T en una proporción de células diana a células efectoras de 1:10. Se llevó a cabo la obtención de las imágenes durante 4 horas utilizando un microscopio Zeiss Axiovert 135.

Resultados

- En la figura 10, se muestran imágenes de la incubación del complejo de unión a antígeno que comprendía polipéptido de fusión [péptido pp65 de CMV]-[conector 1]-[β 2-microglobulina]-[conector 2]-[HLA-A- α 1- α 2- α 3]-[conector 3]-[Ig1 con región Fc mutante L234A, L235A con variación de ojal], un polipéptido IgG1 con región Fc mutante L234A, L235A variante de botón unido con disulfuro y una cadena ligera de Ig, en el que el complejo se une específicamente a IGF-1R humana. Puede observarse que el complejo medió en la lisis de células 3T3 I24 expresantes de IGF-1R humano (células grandes de crecimiento adherente, punta de flecha blanca). La lisis se encuentra mediada por células T humanas específicas del CMV (células pequeñas de forma redondeada, flecha blanca, o células migratorias ameboides, flecha negra). Se incubaron las células I24 con el complejo a una concentración de 5 μ g/ml y con células T específicas de CMV humano (APCs preactivadas con HLA-A0201⁺/pulsadas con péptido de CMV). Se indica el periodo de tiempo en la parte inferior de cada dibujo. Observar la interacción de las células I24 con las células T a los 56 minutos y a los 76 minutos y posteriormente el colapso de las células I24 tras 125 minutos.

En la figura 11, las imágenes de microscopía de un control que mostraba la ausencia de lisis de las células 3T3 I24 (células de crecimiento adherente grandes, punta de flecha blanca), hasta las células T específicas de CMV humano (células pequeñas de forma redondeada, flecha blanca, o células migratorias ameboides, flecha negra) en ausencia de un complejo de unión a antígeno indicado en la presente memoria. Se incubaron las células I24 con células T citotóxicas específicas (APCs preactivadas con HLA-A0201⁺/pulsadas con péptido de CMV). Se indica el periodo de tiempo en la parte inferior de cada dibujo.

10 **Ejemplo 6**

Ensayo de citotoxicidad

Se pipeteó medio de cultivo celular (50 µl) en cada pocillo de una placa E de 96 pocillos Xcelligence (Roche, nº de cat. 05232368001) para llevar a cabo mediciones de fondo.

15 Se diluyeron las células I24 hasta 1×10^6 células/ml en medio de cultivo celular (RPMI 1640, L-glutamina 2 mM, piruvato sódico 1 mM, NEAA 0,1 mM, FCS al 10% (v/p)) y se pipetearon 50 µl (2×10^4 células/pocillo) en cada pocillo de una placa de 96 pocillos Xcelligence hasta un volumen final de 100 µl y se cultivaron durante 24 horas (a 37°C, 8% de CO₂, humedad del 80%). Tras 24 horas, se eliminó el medio y las células se lavaron con 200 µl de AIM-V (medio para células T sin suero (Invitrogen) (nº de cat. 12055-083). Se añadió el complejo de unión a antígeno que comprendía polipéptido de fusión [péptido pp65 de CMV]-[conector 1]-[β2-microglobulina]-[conector 2]-[HLA-A-α1-α2-α3]-[conector 3]-[Ig1 con región Fc mutante L234A, L235A con variación de ojal], un polipéptido IgG1 con región Fc mutante L234A, L235A variante de botón unido con disulfuro y una cadena ligera de Ig, en el que el complejo se une específicamente a IGF-1R humana, a las células diana lavadas a una concentración final de 1 µg/ml en medio AIM-V. Se añadieron células efectoras en la proporción respectiva en medio AIM-V hasta un volumen final de 150 µl. Se utilizó anticuerpo monoclonal IgG1 afucosilado dirigido contra IGF-1R humano (anticuerpo anti-IGF-1R afucosilado) y anticuerpo anti-digoxigenina humano no ligante (anticuerpo anti-digoxigenina) a modo de control de isotipo y control de anticuerpo específico, respectivamente. Las mediciones se llevaron a cabo durante 6 a 9 horas, respectivamente, utilizando el sistema Xcelligence (Roche).

Resultados

El complejo indicado en la presente memoria induce la lisis de las células tumorales H460M2 mediante células T específicas del CMV humano.

5 Se incubaron células tumorales durante 4 horas con 1 µg/ml del complejo que comprendía polipéptido de fusión [péptido pp65 de CMV]-[conector 1]-[β2-microglobulina]-[conector 2]-[HLA-A-α1-α2-α3]-[conector 3]-[Ig1 con región Fc mutante L234A, L235A con variación de ojal], un polipéptido IgG1 con región Fc mutante L234A, L235A variante de botón unido con disulfuro y una cadena ligera de Ig, en el que el complejo se une
10 específicamente a IGF-1R humana, y células T específicas en la proporción respectiva (1:1,5 a 1:0,5) (ver la figura 12). Se indica el porcentaje de lisis en la parte superior de las columnas correspondientes. El anticuerpo monoclonal IgG1 afucosilado dirigido contra IGF-1R humano (MAB IGF-1R-afu) no indujo una lisis significativa de las células tumorales.

15 El complejo indicado en la presente memoria indujo la lisis de las células diana 3T3 I24 mediante células T específicas del CMV humano.

Se incubaron las células diana durante 4 horas con 1 µg/ml de un complejo de unión a antígeno que comprendía polipéptido de fusión [péptido pp65 de CMV]-[conector 1]-[β2-microglobulina]-[conector 2]-[HLA-A-α1-α2-α3]-
20 [conector 3]-[Ig1 con región Fc mutante L234A, L235A con variación de ojal], un polipéptido IgG1 con región Fc mutante L234A, L235A variante de botón unido con disulfuro y una cadena ligera de Ig, en el que el complejo se une específicamente a IGF-1R humana, y células T específicas en la proporción respectiva (1:1,5 a 1:0,5) (ver la figura 13). Se indica el
25 porcentaje de lisis en la parte superior de las columnas correspondientes. El anticuerpo monoclonal IgG1 afucosilado dirigido contra IGF-1R humano (anticuerpo anti-IGF-1R afucosilado) y el anticuerpo anti-digoxigenina humano no ligante (anticuerpo anti-digoxigenina) no indujeron una lisis significativa de las células diana.

30 Ejemplo 7

Eficacia *in vitro*

Se incubó la línea celular H460M2 de adenocarcinoma pulmonar positivo para IGF-1R con 1 µg/ml de un complejo que comprendía un péptido derivado del CMVh y un anticuerpo anti-IGF-1R y células T CD8-positivas

específicas del CMV humano a una proporción baja de células efectoras a células diana (1,5 a 0,5 células T específicas por cada célula tumoral). Se manipuló mediante glucosilación el anticuerpo de control anti-IGF-1R. El tiempo de incubación fue de 6 horas. La incubación con complejo resultó en una potente eliminación de las células tumorales H460M2.

REIVINDICACIONES

1. Método para la producción recombinante de un complejo que comprende: i) un polipéptido de fusión de $\beta 2$ -microglobulina y los dominios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de una molécula de MHC de clase I, ii) un par de cadenas polipeptídicas unidas mediante disulfuro derivadas de una región bisagra de anticuerpo, e iii) por lo menos un par formado por un dominio variable de cadena ligera de anticuerpo y un dominio variable de cadena pesada de anticuerpo, en una célula eucariótica, que comprendía las etapas siguientes:
 - cultivar una célula eucariótica que comprende uno o más ácidos nucleicos codificantes del complejo, y
 - recuperar el complejo a partir de la célula o del medio de cultivo.en el que el complejo comprende exactamente un polipéptido de fusión de $\beta 2$ -microglobulina y los dominios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de una molécula de MHC de clase I.
2. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque se obtiene el complejo a una concentración de 1 mg/ml o superior en el medio de cultivo.
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la célula eucariótica es una célula de mamífero.
4. Método según la reivindicación 3, caracterizado porque la célula de mamífero es una célula renal embrionaria humana o una célula de ovario de hámster chino o una célula renal de hámster neonato o una célula de mieloma de ratón.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el polipéptido de fusión comprende, en dirección N-terminal a C-terminal, una $\beta 2$ -microglobulina y los dominios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de una molécula de MHC de clase I que presenta una frecuencia relativa inferior al 1%.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque el polipéptido de fusión comprende un péptido inductor de respuesta de células T, una $\beta 2$ -microglobulina y los dominios

extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de una molécula de MHC de clase I que presenta una frecuencia relativa inferior al 1%.

- 5 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque las cadenas polipeptídicas unidas mediante enlaces disulfuro derivadas de una región bisagra de anticuerpo i) se encuentran unidas mediante uno o más enlaces disulfuro, ii) la primera cadena polipeptídica unida mediante disulfuro comprende, en dirección N-terminal a C-terminal, un dominio variable de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina, un dominio constante de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina, y un polipéptido de región bisagra de cadena pesada de anticuerpo, y la segunda cadena polipeptídica unida mediante disulfuro comprende un polipéptido de región bisagra de cadena pesada de anticuerpo.
- 10
- 15 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el polipéptido de fusión i) se encuentra unido covalentemente al extremo C-terminal o N-terminal de una de las cadenas polipeptídicas unidas mediante disulfuro, o ii) se encuentra unido covalentemente al extremo N-terminal de un dominio variable de anticuerpo que es el dominio variable de cadena pesada o ligera correspondiente complementario al comprendido en la primera cadena polipeptídica unida mediante disulfuro, o iii) se encuentra unido covalentemente al extremo C-terminal de un dominio constante de anticuerpo que es el dominio constante de cadena pesada o ligera complementario al comprendido en la primera cadena polipeptídica unida mediante disulfuro.
- 20
- 25
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, caracterizado porque el péptido inductor de respuesta de células T es un péptido derivado de un virus.
- 30 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, caracterizado porque el polipéptido de fusión comprende, en dirección N-terminal a C-terminal:
- (i) un péptido derivado de virus que presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEC ID nº 01 y SEC ID nº 09,

- (ii) un primer péptido conector que presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEC ID nº 16, 17, 18, 21, 22 y 23,
- (iii) una β 2-microglobulina que presenta la secuencia de aminoácidos 10,
- (iv) un segundo péptido conector que presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEC ID nº 16, 17, 18, 21, 22 y 23,
- (v) los dominios extracelulares α 1, α 2 y α 3 de una molécula de MHC de clase I que presenta una secuencia de aminoácidos SEC ID nº 11, y
- (vi) un tercer péptido conector que presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEC ID nº 12, 16, 17, 18, 21, 22 y 23.
11. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la primera cadena polipeptídica unida mediante disulfuro y la segunda cadena polipeptídica unida mediante disulfuro comprenden: i) un dominio CH2 de IgG1 humana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEC ID nº 31, 32 y 33, y un dominio CH3 de IgG1 humana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEC ID nº 34, 35 y 36.
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11, caracterizado porque el complejo comprende: i) un primer péptido conector que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 21 y/o ii) un segundo péptido conector que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 22, y/o iii) un tercer péptido conector que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 12, y/o iv) un dominio CH2 de IgG1 humana que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 32 ó 33, y/o v) en el primer polipéptido unido mediante disulfuro, un dominio CH3 de IgG1 humana que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 35 y en el segundo polipéptido unido mediante disulfuro, un dominio CH3 de IgG1 humana que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 36.
13. Complejo, caracterizado porque comprende:

- un polipéptido de fusión que comprende, en dirección N-terminal a C-terminal:
 - o bien
 - (i) una β 2-microglobulina, y
 - 5 (ii) los dominios extracelulares α 1, α 2 y α 3 de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa inferior al 1 %,
 - o
 - (i) un péptido inductor de respuesta de células T,
 - (ii) una β 2-microglobulina, y
 - 10 (iii) los dominios extracelulares α 1, α 2 y α 3 de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de 1 % o superior,
- y
 - dos cadenas polipeptídicas, que se encuentran unidas mediante
 - 15 uno o más enlaces disulfuro, en las que la primera cadena polipeptídica unida mediante disulfuro comprende, en dirección N-terminal a C-terminal,
 - (i) un dominio variable de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina,
 - 20 (ii) un dominio constante de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina, y
 - (iii) un polipéptido de región bisagra de cadena pesada de anticuerpo,
 - y en la que la segunda cadena polipeptídica unida mediante
 - 25 disulfuro comprende un polipéptido de región bisagra de cadena pesada de anticuerpo,
- en el que el polipéptido de fusión:
 - se encuentra unido covalentemente al extremo C-terminal o N-terminal de una de las cadenas polipeptídicas unidas mediante
 - 30 disulfuro, o
 - se encuentra unido covalentemente al extremo N-terminal de un dominio variable de anticuerpo que es el dominio variable de cadena pesada o ligera complementario al comprendido en la primera cadena polipeptídica unida mediante disulfuro, o
 - 35 - se encuentra unido covalentemente al extremo C-terminal de un dominio constante de anticuerpo que es el dominio constante de

cadena pesada o ligera complementario al comprendido en la primera cadena polipeptídica unida mediante disulfuro.

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

- 5 14. Complejo según la reivindicación 13, caracterizado porque el péptido inductor de respuesta de células T es un péptido derivado de un virus.
15. Complejo según cualquiera de las reivindicaciones 13 ó 14, caracterizado porque el polipéptido de fusión comprende, en dirección N-terminal a C-terminal:
- 10 (i) un péptido derivado de virus que presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEC ID nº 01 y SEC ID nº 09,
- 15 (ii) un primer péptido conector que presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEC ID nº 16, 17, 18, 21, 22 y 23.
- 20 (iii) una β 2-microglobulina que presenta la secuencia de aminoácidos 10,
- 25 (iv) un segundo péptido conector que presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEC ID nº 16, 17, 18, 21, 22 y 23.
- 30 (v) los dominios extracelulares α 1, α 2 y α 3 de una molécula de MHC de clase I que presenta una secuencia de aminoácidos SEC ID nº 11, y
- 35 (vi) un tercer péptido conector que presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEC ID nº 12, 16, 17, 18, 21, 22 y 23.
16. Complejo según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, caracterizado porque el primer polipéptido unido mediante disulfuro y el segundo polipéptido unido mediante disulfuro comprenden además:
- 30 - un dominio CH2 de IgG1 humana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEC ID nº 31, 32 y 33, y
- 35 - un dominio CH3 de IgG1 humana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEC ID nº 34, 35 y 36.

17. Complejo según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 16, caracterizado porque:
- el primer péptido conector presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 21, y/o
 - 5 - el segundo péptido conector comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 22, y/o
 - el tercer péptido conector presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 12, y/o
 - 10 - el dominio CH2 de la IgG1 humana presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 32 ó 33, y/o
 - el dominio CH3 de la IgG1 humana de un polipéptido unido mediante disulfuro presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 35 y el dominio CH3 de la IgG1 humana del otro polipéptido unido mediante disulfuro comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 36.
 - 15
18. Ácido nucleico codificante del complejo según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17.
19. Célula huésped que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 18.
- 20 20. Formulación farmacéutica que comprende el complejo según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17 y opcionalmente un portador farmacéuticamente aceptable.
21. Complejo según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17 para la utilización a modo de medicamento.
- 25 22. Complejo según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17 para la utilización en el tratamiento del cáncer o de una infección vírica crónica.
23. Complejo según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17 para la utilización en la atracción de células T citotóxicas específicas de virus de un individuo a una diana.
- 30 24. Complejo según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17 para la utilización en la eliminación de células cancerosas o de células infectadas por virus.

25. Utilización del complejo según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17 en la preparación de un medicamento.
26. Utilización según la reivindicación 25, en la que el medicamento está destinado al tratamiento del cáncer o de una infección vírica crónica.
- 5 27. Utilización según la reivindicación 25, en la que el medicamento está destinado a la atracción de células T citotóxicas específicas de virus de un individuo a una diana.
28. Utilización según la reivindicación 25, en la que el medicamento está destinado a la eliminación de células cancerosas o de células infectadas por virus.
- 10
29. Método para la atracción de células T citotóxicas específicas de virus de un individuo a una diana en el individuo, que comprende administrar en el mismo una cantidad efectiva del complejo según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17 para atraer las células T citotóxicas específicas de virus de un individuo a una diana.
- 15
30. Método de eliminación de células cancerosas o de células infectadas por virus en un individuo, que comprende administrar en el individuo una cantidad efectiva del complejo según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17 para eliminar células cancerosas o células infectadas por virus.
- 20

Fig. 1

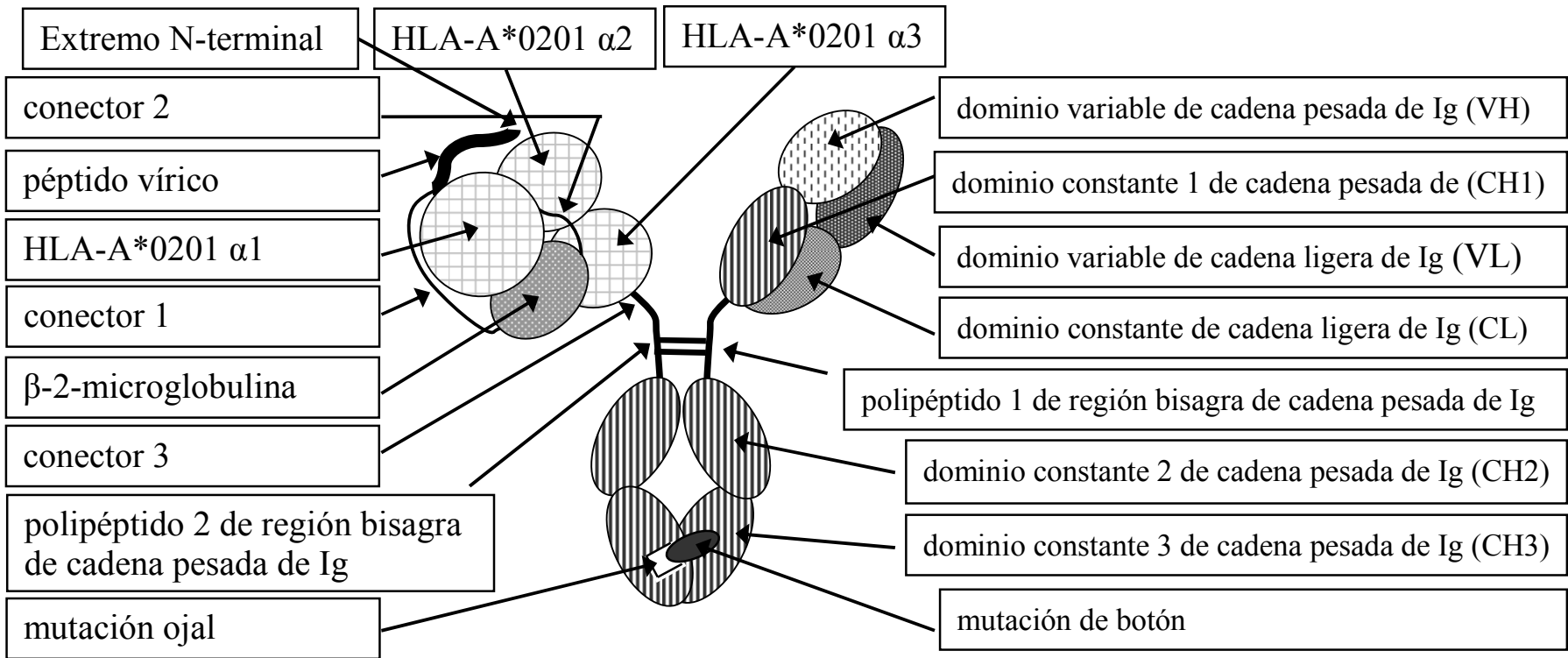
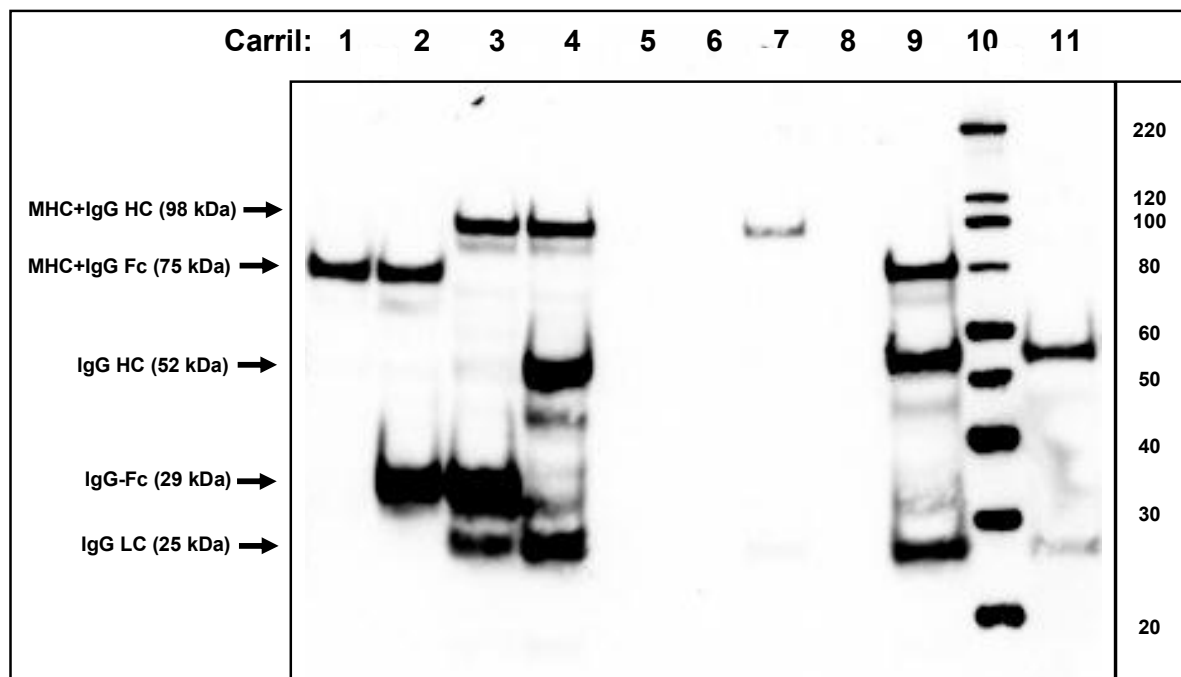


Fig. 2

péptido de señal	péptido vírico	$\beta 2$ -microglobulina	MHCI $\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$	polipéptido que comprende región bisagra de cadena ligera / cadena pesada de anticuerpo
	péptido de señal	$\beta 2$ -microglobulina	MHCI $\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$	polipéptido que comprende región bisagra de cadena ligera / cadena pesada de anticuerpo
péptido de señal	péptido vírico	MHCI $\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$	$\beta 2$ -microglobulina	polipéptido que comprende región bisagra de cadena ligera / cadena pesada de anticuerpo
	péptido de señal	MHCI $\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$	$\beta 2$ -microglobulina	polipéptido que comprende región bisagra de cadena ligera / cadena pesada de anticuerpo

Fig. 3



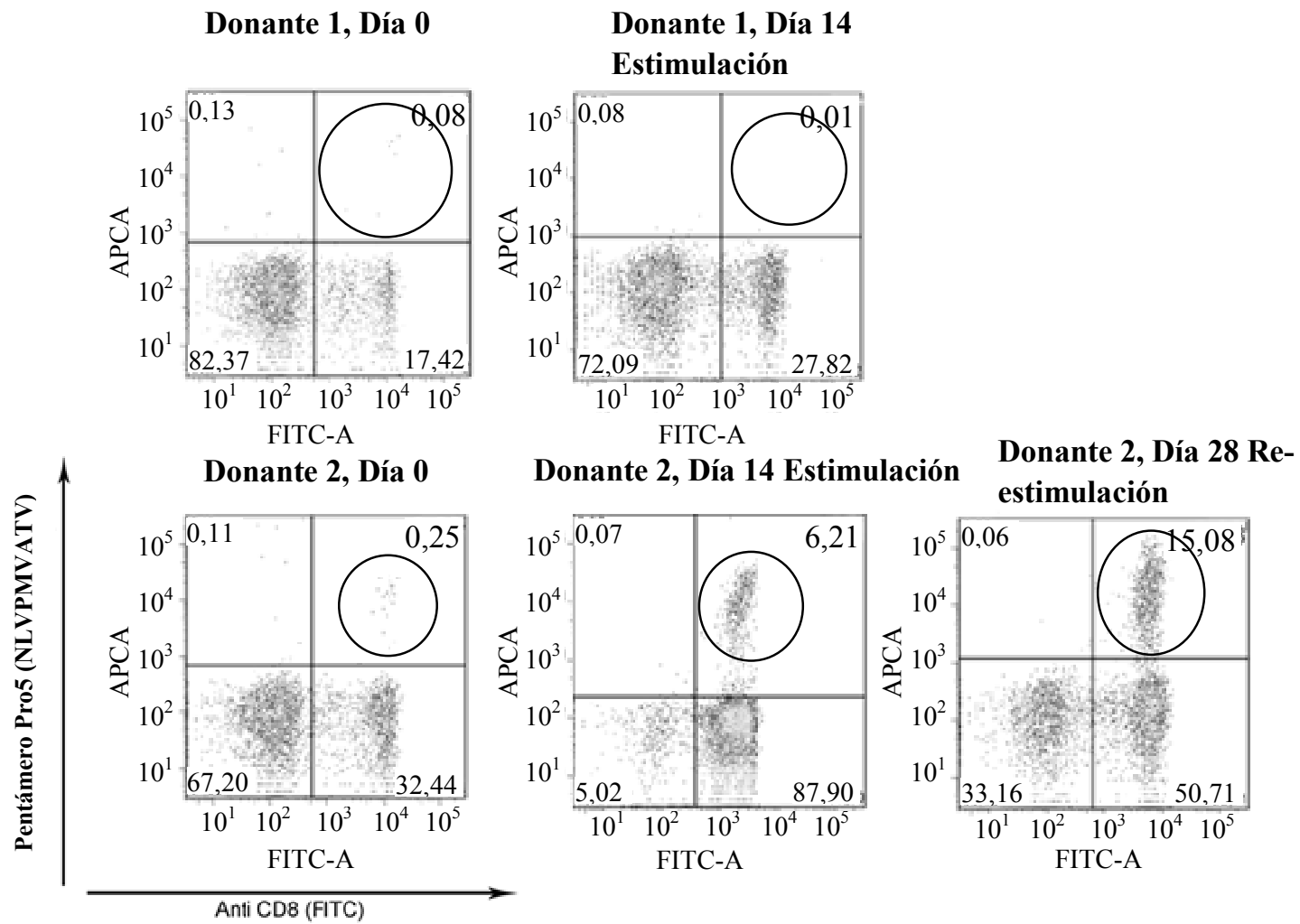


Fig. 4a

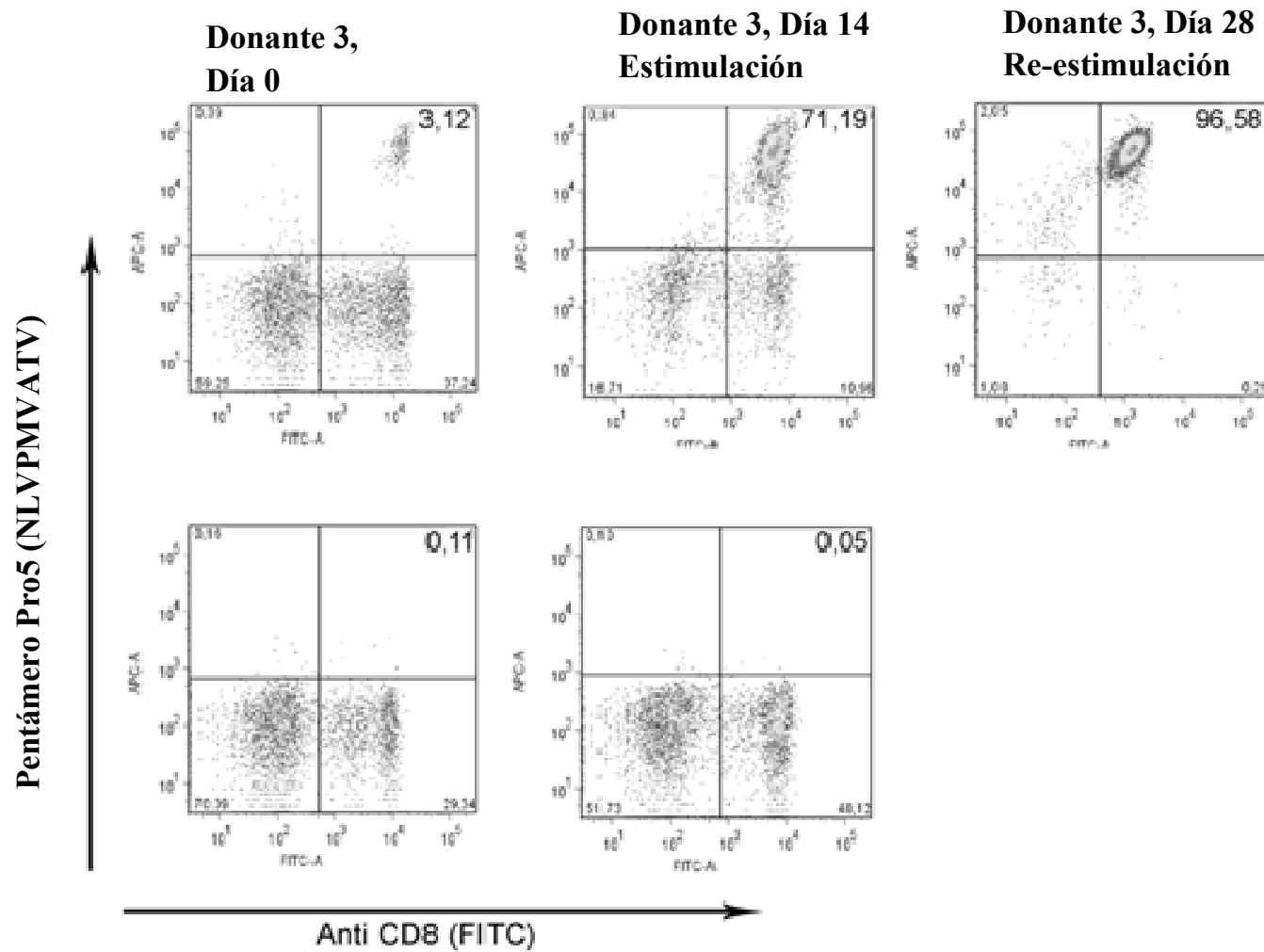


Fig. 4b

Fig. 5a

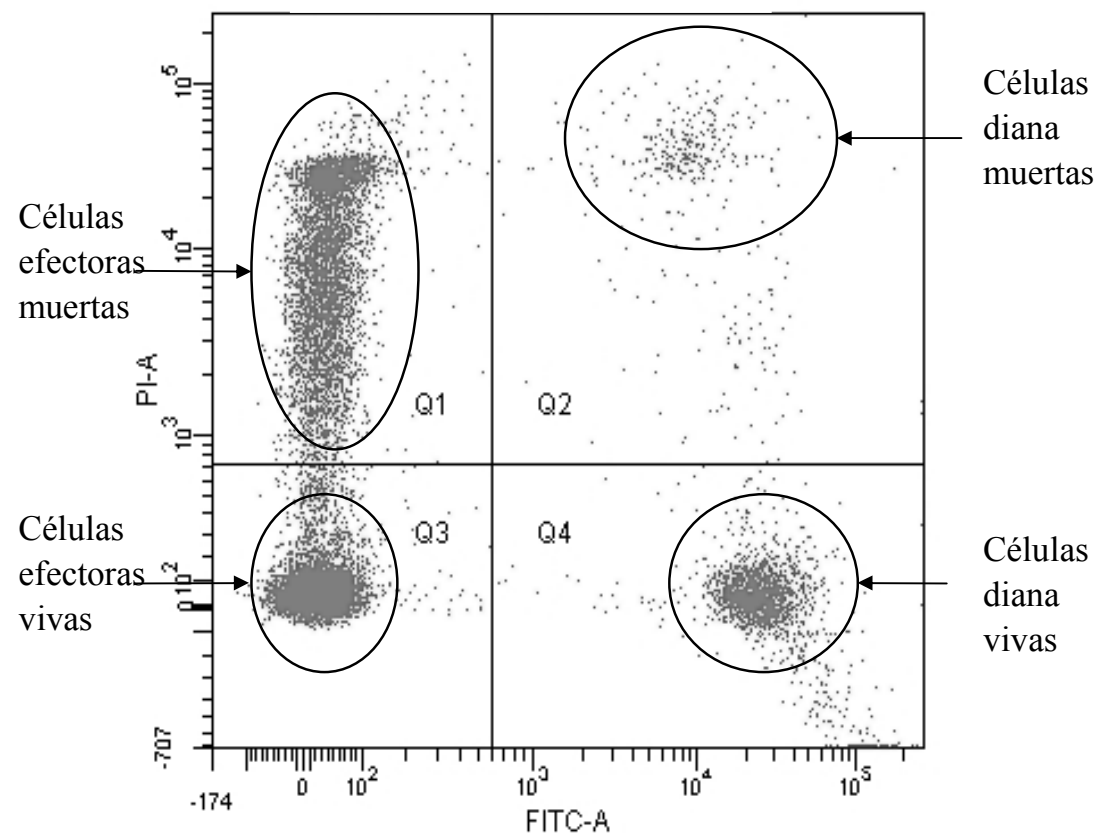


Fig. 5b

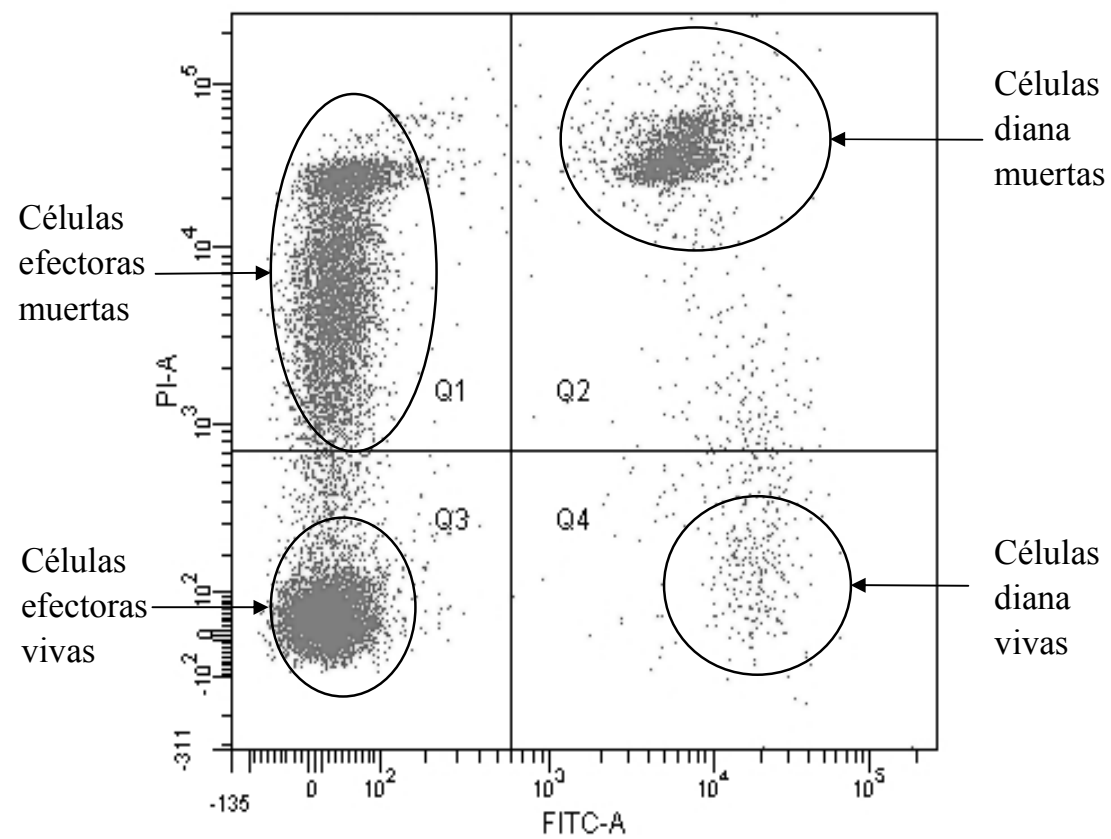


Fig. 6

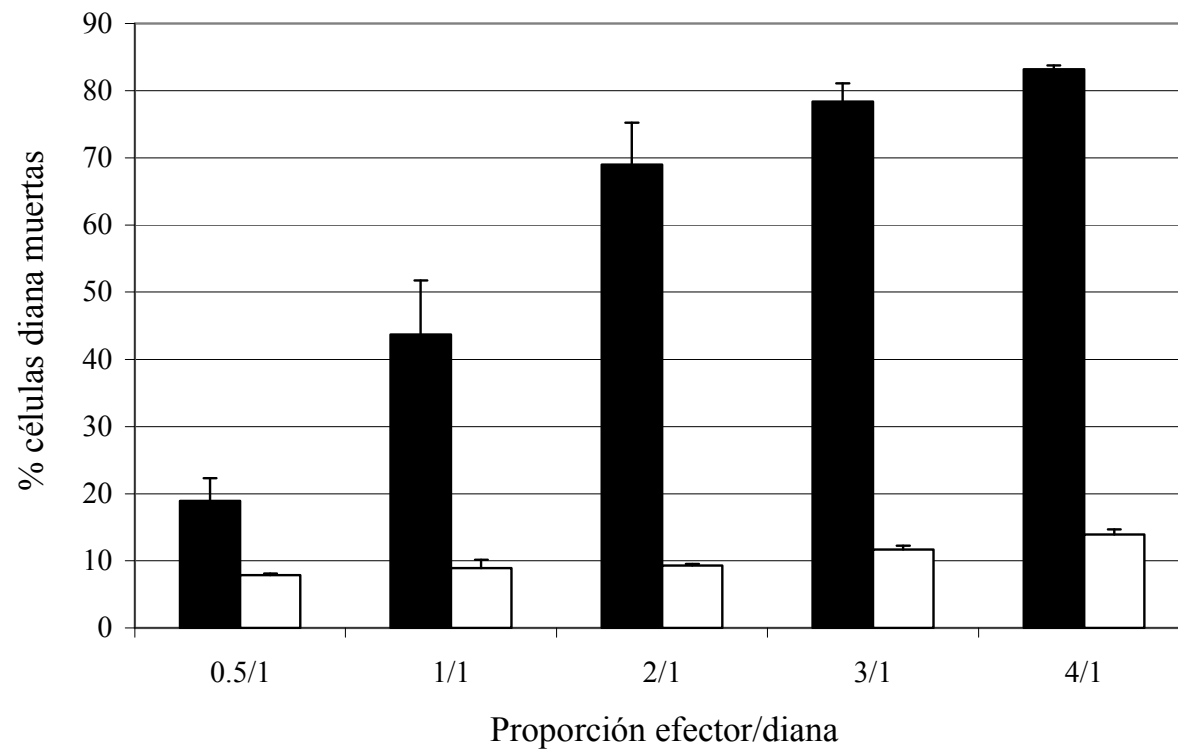


Fig. 7

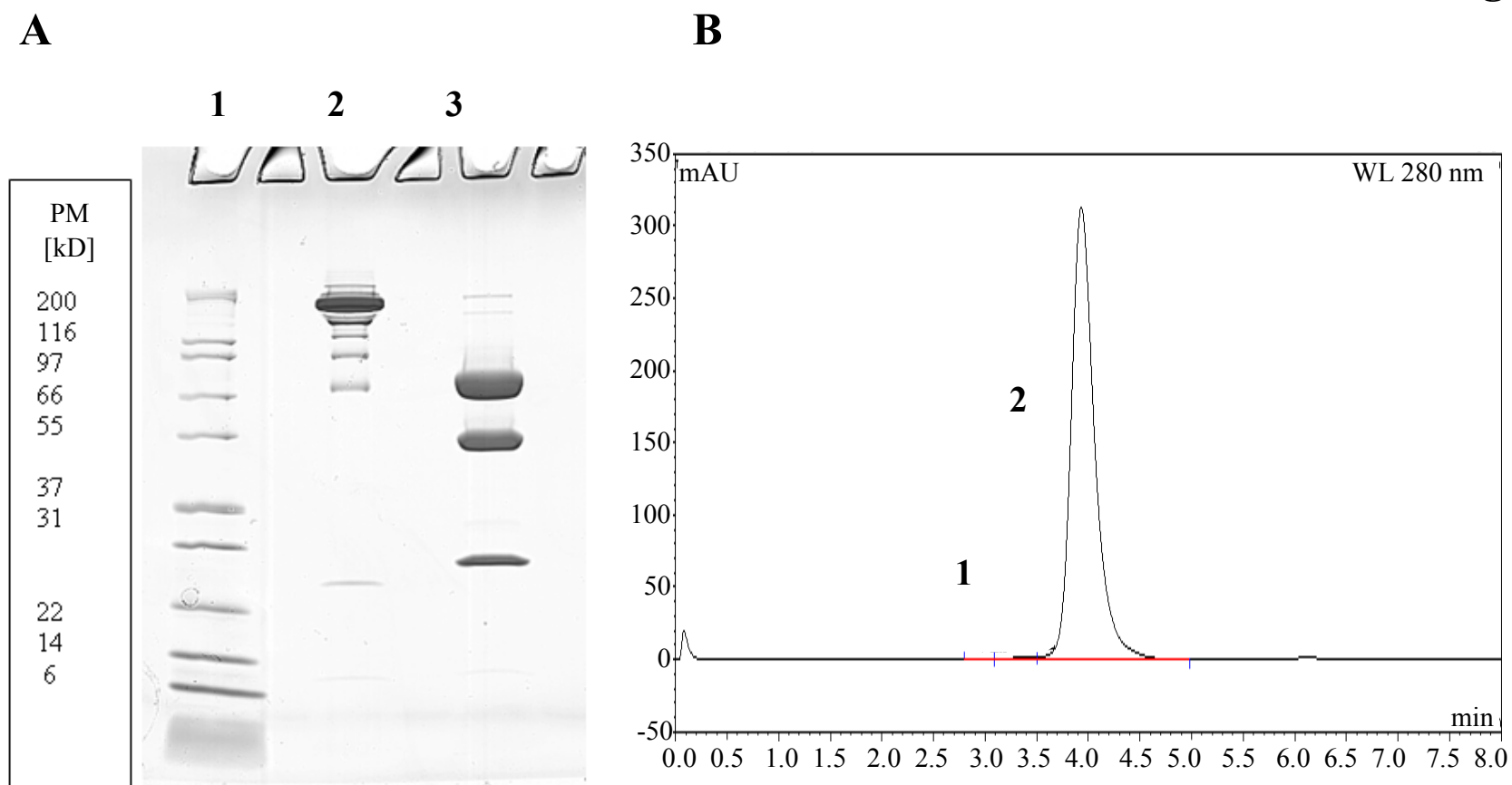
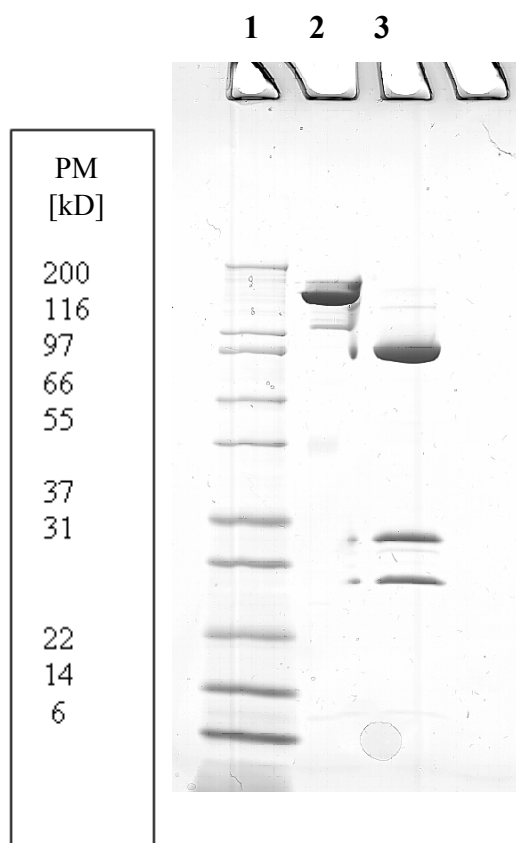


Fig. 8

A



B

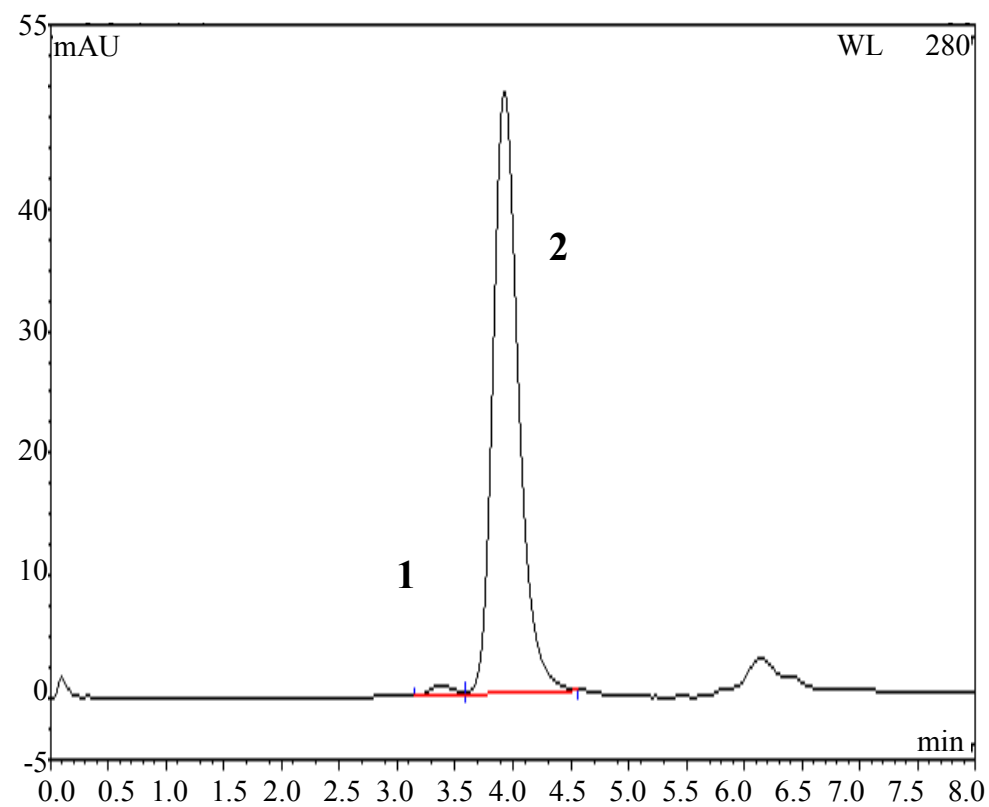


Fig. 9a

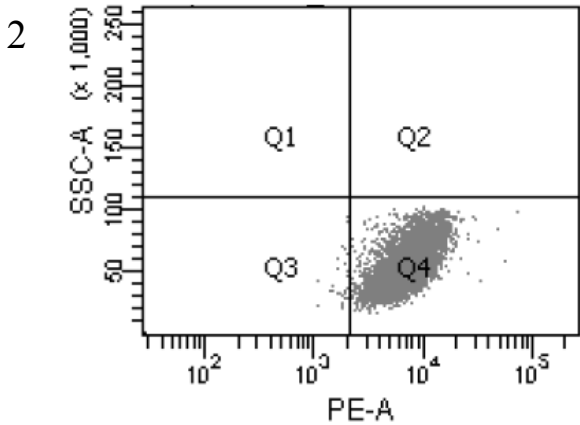
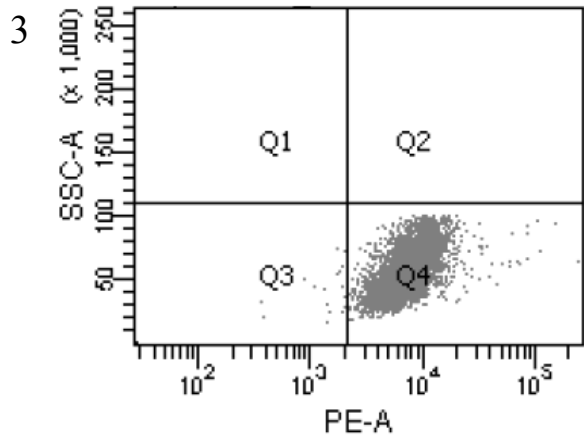
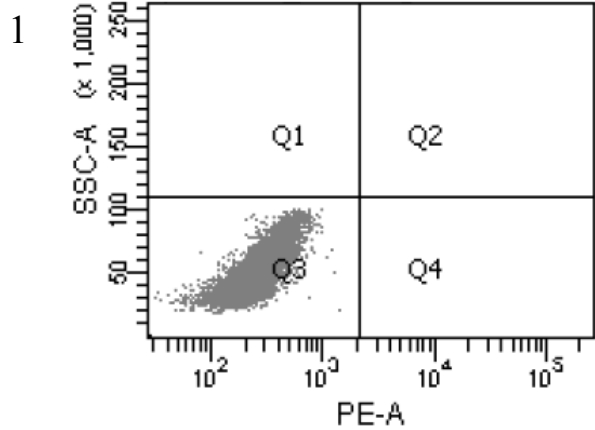


Fig. 9b

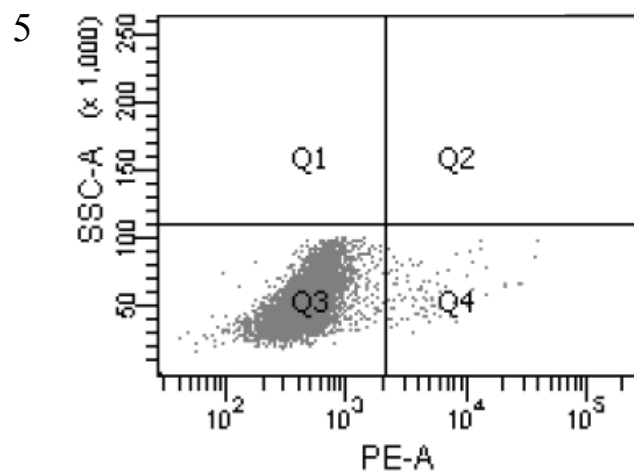
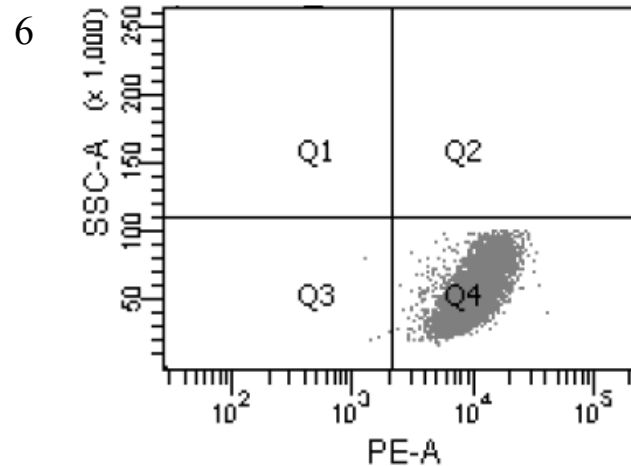
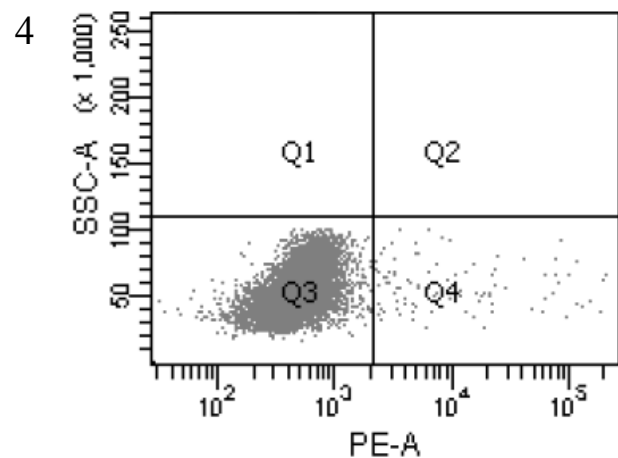


Fig. 10

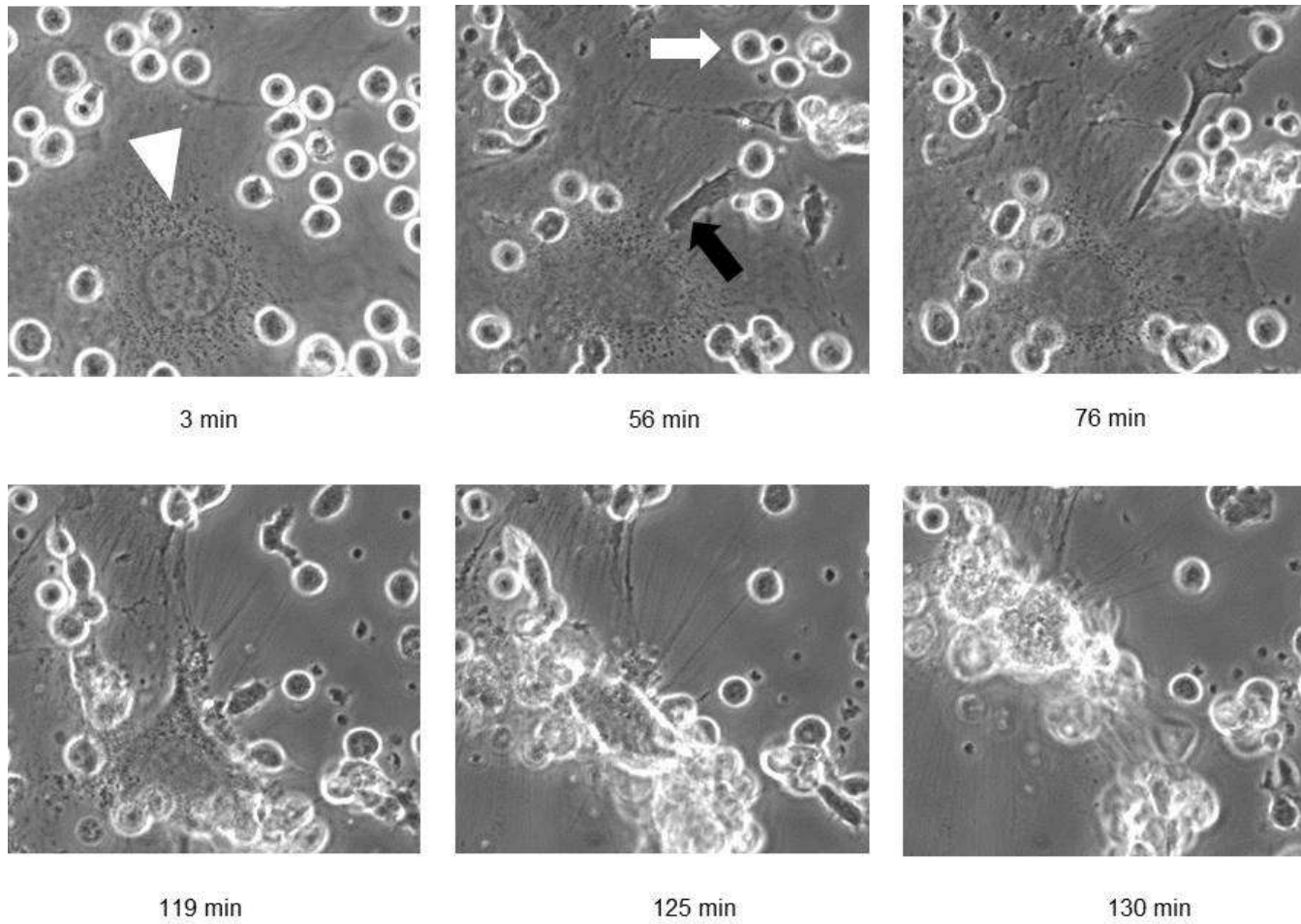


Fig. 11

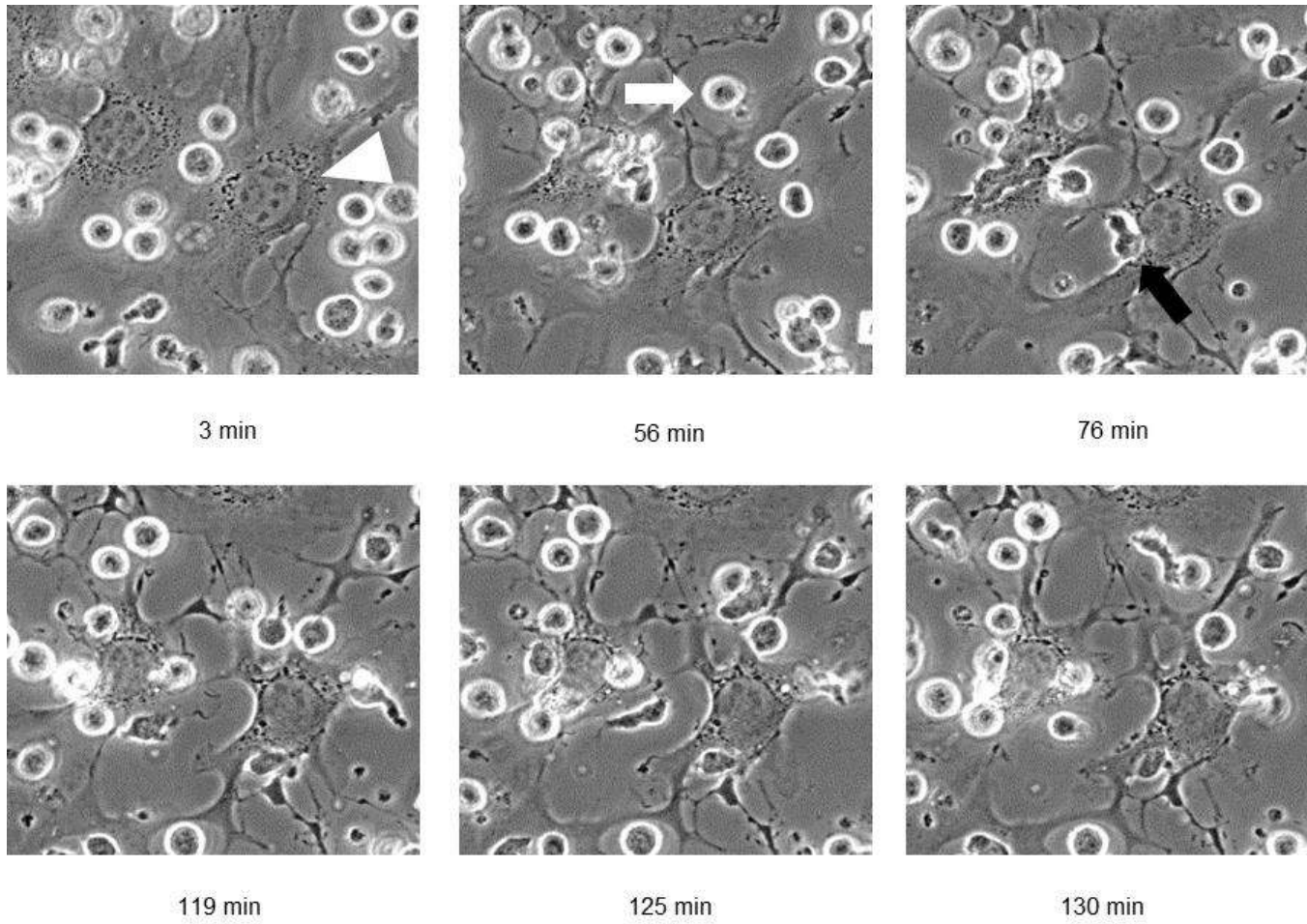


Fig. 12

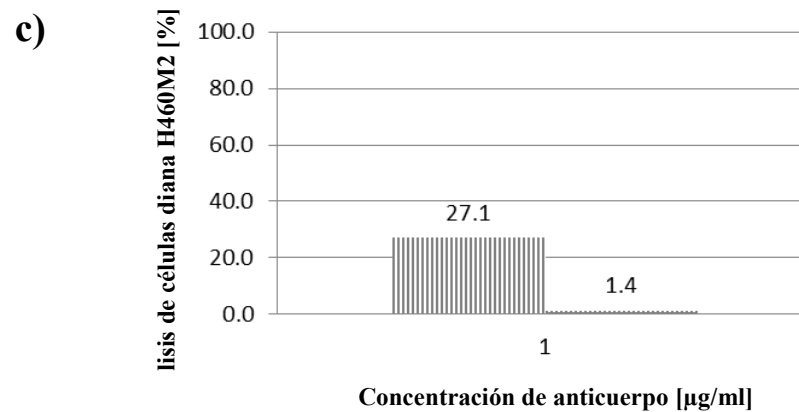
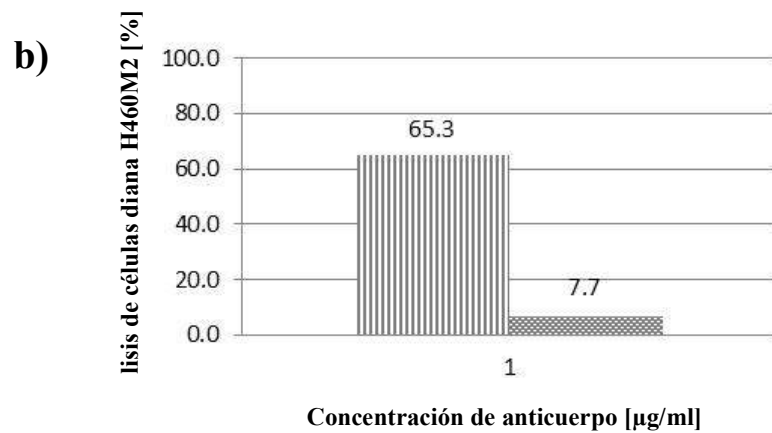
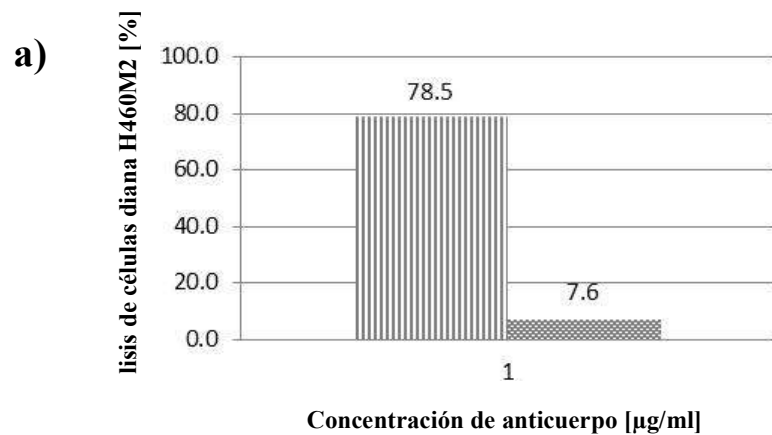


Fig. 13

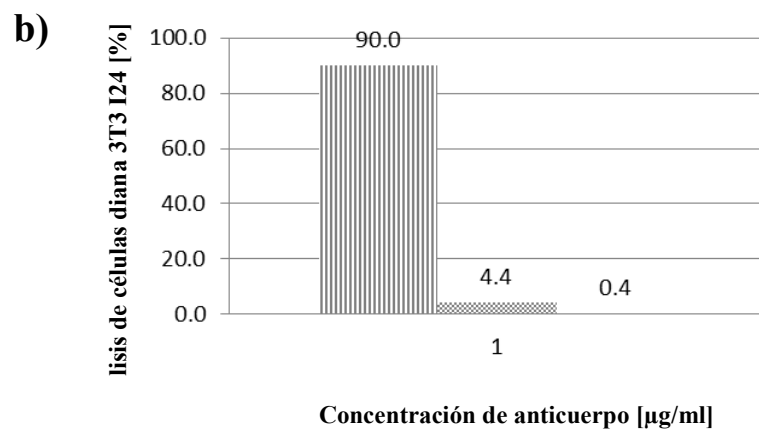
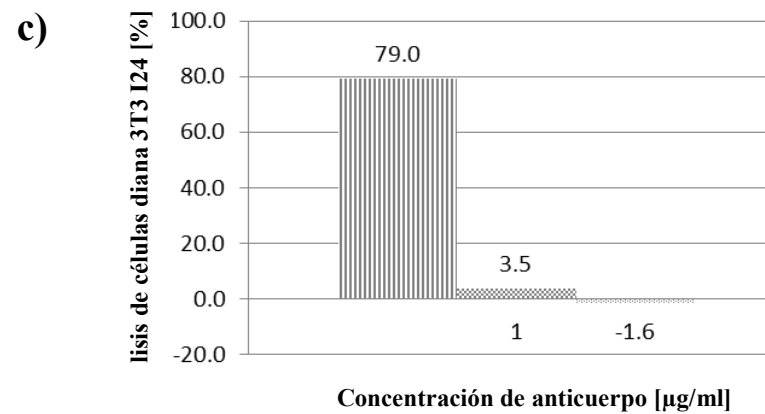
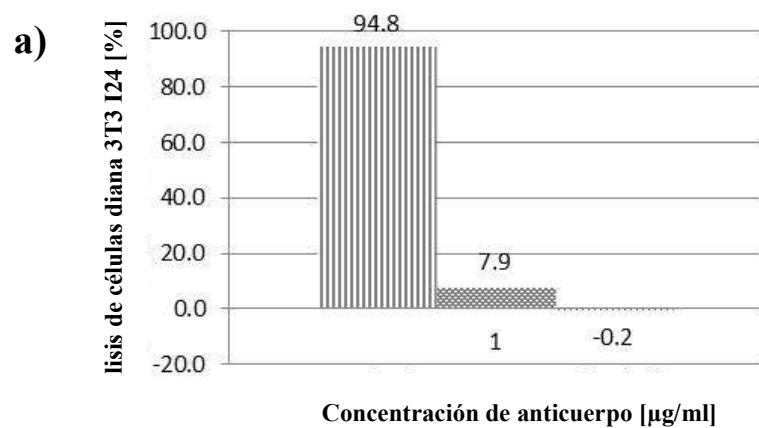


Fig. 14

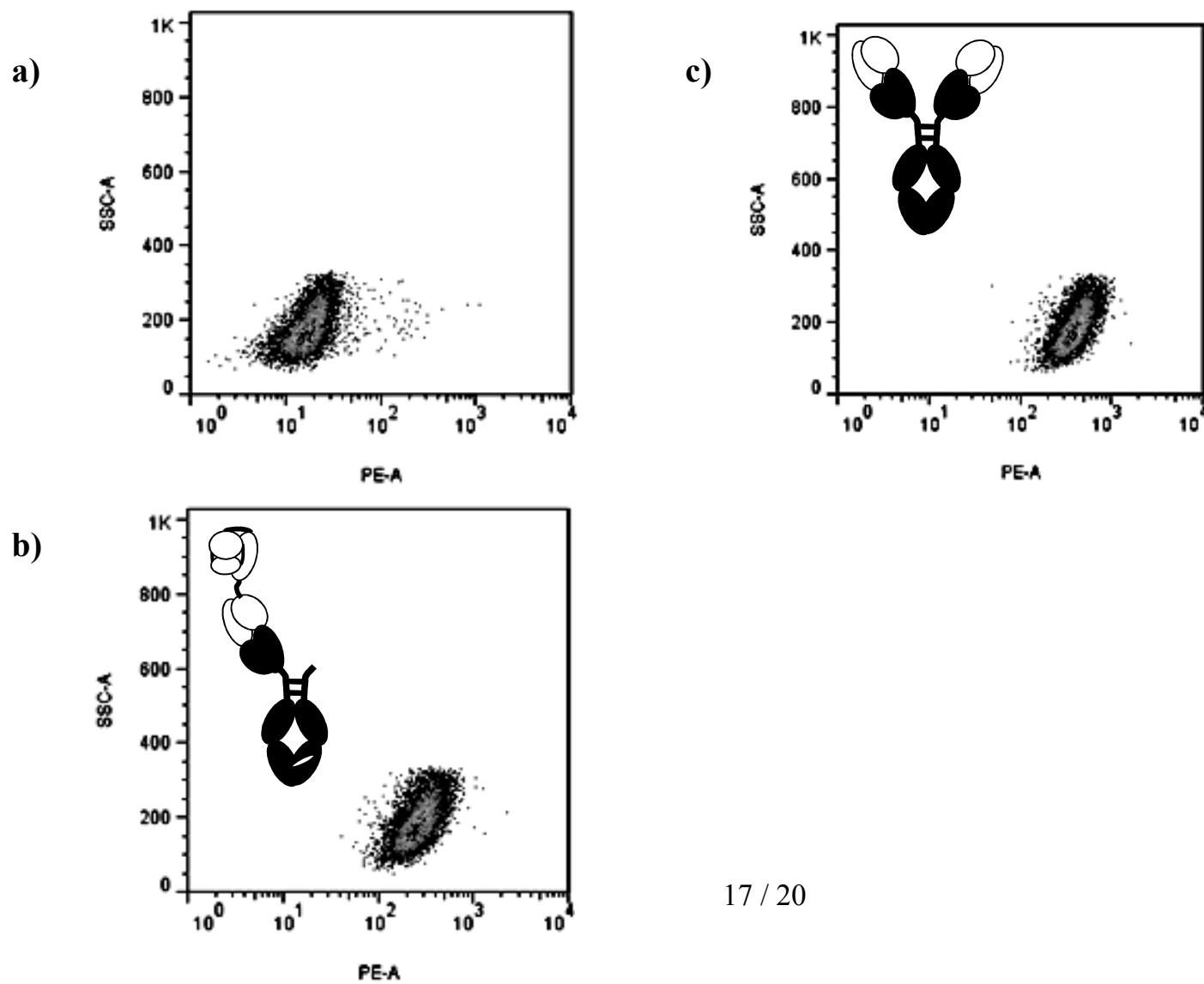


Fig. 15

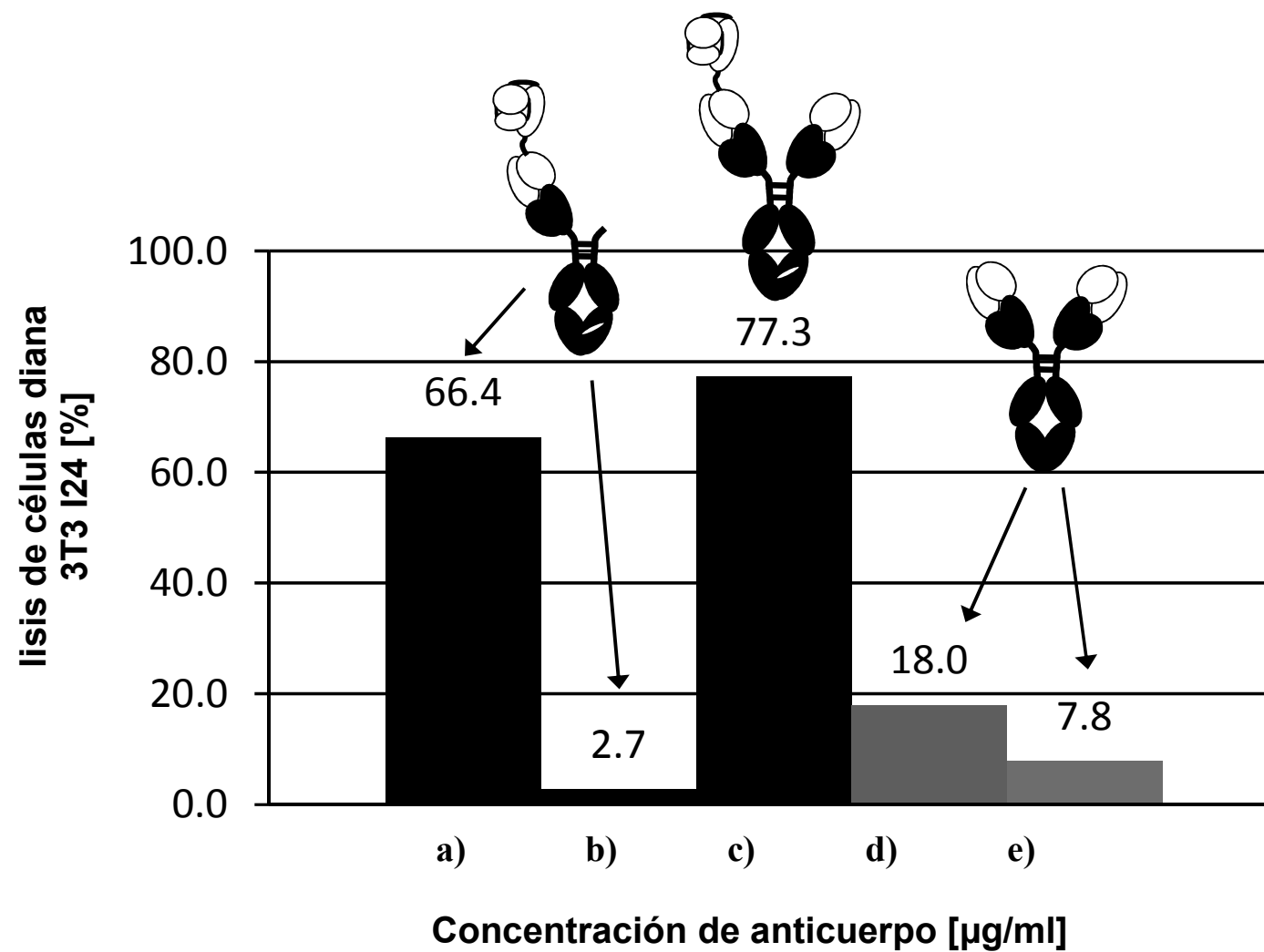


Fig. 16

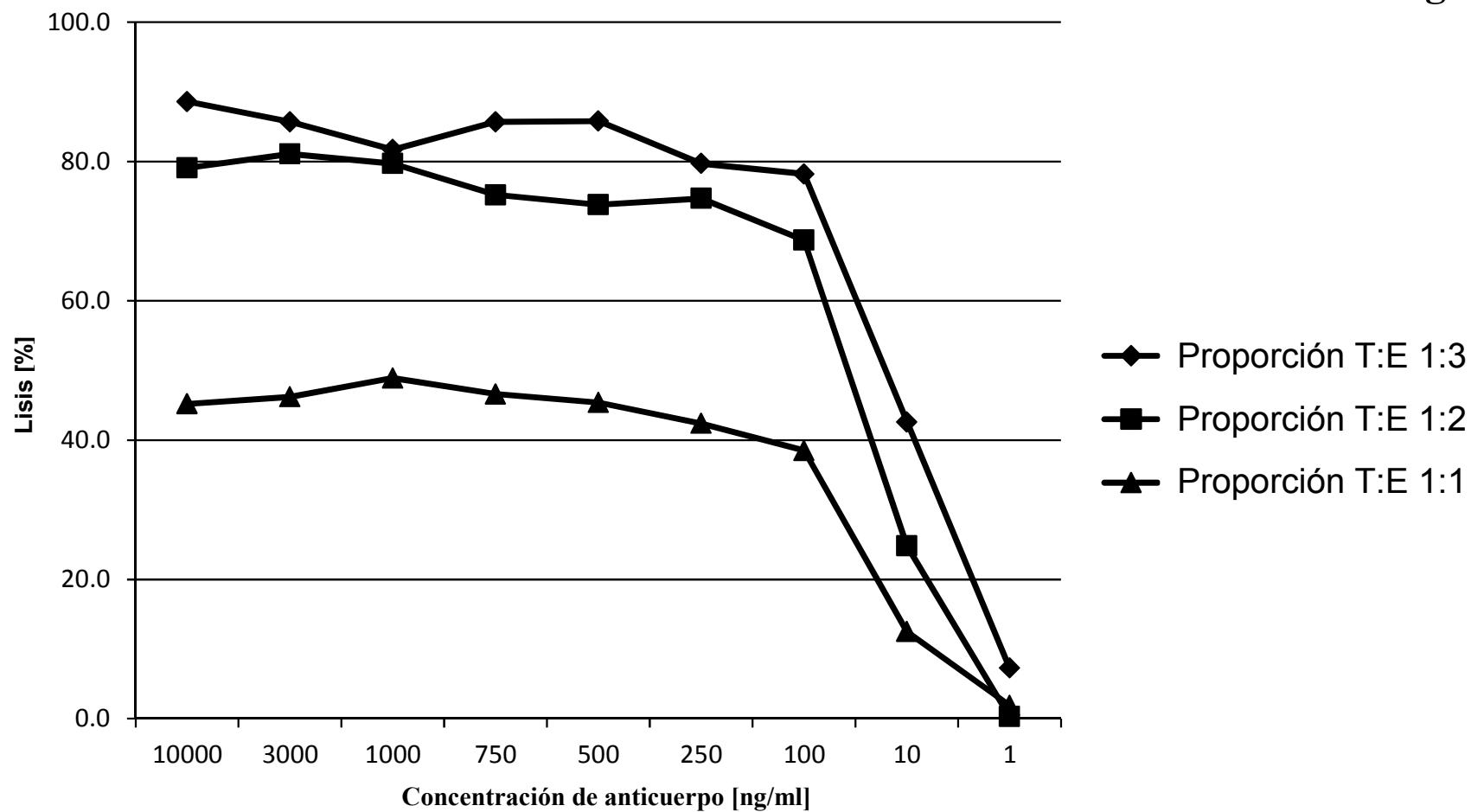
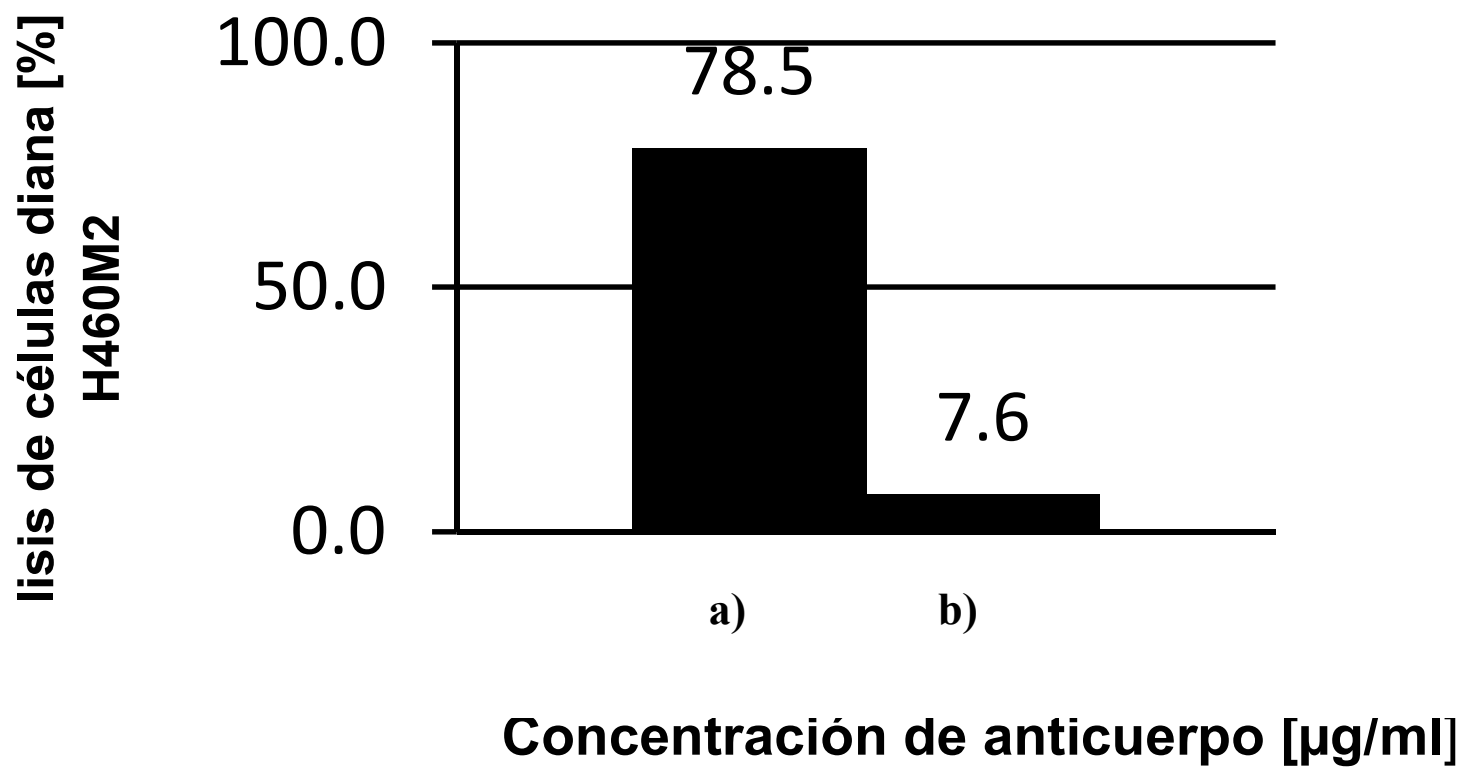


Fig. 17



		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) No. de solicitud:		(51) Int Cl: C07K 16/46	
(22) Fecha de solicitud: 01-11-13		(71) Solicitante(s): F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.	
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad 11171027.3	(32) Fecha 22-06-11	(33) País EP
		(72) Inventor(es): KNOETGEN, Hendrik.	
		(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE	
(85)	Fecha límite inicio fase nacional: 22-01-14	(87) Publicación internacional	
(86)	Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT	Fecha: 27-12-12	
	Fecha de presentación de la solicitud: 19-06-12	No. publicación: WO 2012/175508 A1	
	No. de solicitud: PCT/EP2012/061734		
(54) Título: “ELIMINACIÓN DE CÉLULAS DIANA POR PARTE DE CÉLULAS T CITOTÓXICAS ESPECÍFICAS DE VIRUS UTILIZANDO COMPLEJOS QUE COMPRENDEN MHC DE CLASE I”			

Resumen - Reivindicación(es):

Resumen.-

En la presente memoria se informa de un complejo que comprende como primer componente una parte derivada de un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno diana, y como segundo componente un péptido derivado de un virus unido a un complejo de proteína de MHC de clase I. Con el complejo indicado en la presente memoria pueden dirigirse células T citotóxicas circulantes específicas de virus existentes (células T de memoria o células T efectoras) de un individuo a células que expresan el antígeno diana, a las que se une específicamente la parte del complejo covalente derivada de un anticuerpo, mediante la cobertura de dichas células con un complejo MHC de clase I imitando una infección vírica aguda. De esta manera, un aspecto indicado en la presente memoria es un complejo, caracterizado porque comprende un polipéptido de fusión que comprende, en dirección N-terminal a C-terminal, (i) una β 2-microglobulina, e (ii) los dominios extracelulares α 1, α 2 y α 3 de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de 1% o superior, y dos cadenas polipeptídicas, que se encuentran unidas mediante uno o más enlaces disulfuro, en el que la primera cadena polipeptídica unida mediante disulfuro comprende, en dirección N-terminal a C-terminal, (i) un dominio variable de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina, (ii) un dominio constante de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina, e (iii) un polipéptido de región bisagra de cadena pesada de anticuerpo, y la segunda cadena polipeptídica unida mediante disulfuro comprende un polipéptido de región bisagra de cadena pesada de anticuerpo, en el que el polipéptido de fusión se encuentra unido covalentemente al extremo C-terminal o al extremo N-terminal de una de las cadenas polipeptídicas unidas mediante disulfuro, o se encuentra unida covalentemente al extremo N-terminal de un dominio variable de anticuerpo que es el dominio variable de cadena pesada o ligera complementario al comprendido en la primera cadena polipeptídica unida mediante disulfuro.

Sector: Biotecnología. Inmunoglobulinas hídricas en las que el ingrediente activo esté unido químicamente a los ingredientes no activos.

484720.TXT
LISTADO DE SECUENCIAS

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> Eliminación de células diana por parte de células T citotóxicas específicas de virus utilizando complejos que comprenden MHC de clase I

<130> 27493

<150> EP11171027.3

<151> 2011-06-22

<160> 112

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Citomegalovirus humano

<400> 1

Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val
1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana

<400> 2

Ser Leu Tyr Asn Thr Val Ala Thr Leu
1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Virus herpes humano 4

<400> 3

Gly Leu Cys Thr Leu Val Ala Met Leu
1 5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Virus influenza A

<400> 4

Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu
1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT
 <213> Virus de la hepatitis B

<400> 5

Ser Thr Asn Arg Gln Ser Gly Arg Gln
 1 5

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Virus linfotrópico humano de células Tipo 1

<400> 6

Leu Leu Phe Gly Tyr Pro Val Tyr Val
 1 5

<210> 7
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido derivado del homólogo del oncogén (JUN) del virus 17 del sarcoma V-jun.

<400> 7

Phe Ala Glu Gly Phe Val Arg Ala Leu
 1 5

<210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Adenovirus humano tipo 3

<400> 8

Leu Ile Val Ile Gly Ile Leu Ile Leu
 1 5

<210> 9
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Virus de la hepatitis C

<400> 9

Ile Leu His Thr Pro Gly Cys Val
 1 5

<210> 10
 <211> 99
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10

484720.TXT

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

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

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

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

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

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

Arg Asp Met

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

<400> 11

Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Phe Thr Ser Val Ser Arg Pro Gly
1 5 10 15

Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln
20 25 30

Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Ala Ser Gln Arg Met Glu Pro Arg
35 40 45

Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Asp Gly Glu Thr
50 55 60

Arg Lys Val Lys Ala His Ser Gln Thr His Arg Val Asp Leu Gly Thr
65 70 75 80

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

Arg Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly Ser Asp Trp Arg Phe Leu Arg Gly
100 105 110

484720.TXT

Tyr His Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Lys Glu
115 120 125

Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Met Ala Ala Gln Thr Thr Lys
130 135 140

His Lys Trp Glu Ala Ala His Val Ala Glu Gln Leu Arg Ala Tyr Leu
145 150 155 160

Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys
165 170 175

Glu Thr Leu Gln Arg Thr Asp Ala Pro Lys Thr His Met Thr His His
180 185 190

Ala Val Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Ser Phe
195 200 205

Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln
210 215 220

Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr
225 230 235 240

Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Gln Glu Gln Arg
245 250 255

Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Lys Pro Leu Thr Leu
260 265 270

Arg Trp

<210> 12
<211> 2
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido conector 1

<400> 12

Gly Ser
1

<210> 13
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> péptido conector 2
 <400> 13

Gly Gly Ser
 1

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

<220>
 <223> péptido conector 3
 <400> 14

Gly Gly Gly Ser
 1

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

<220>
 <223> péptido conector 4
 <400> 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 1 5

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

<220>
 <223> péptido conector 5
 <400> 16

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

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

<220>
 <223> péptido conector 6
 <400> 17

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

1 5 484720.TXT 15

10

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

<220>
 <223> péptido conector 7

<400> 18

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

Gly Gly Gly Ser
 20

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

<220>
 <223> péptido conector 8

<400> 19

Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5

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

<220>
 <223> péptido conector 9

<400> 20

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

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

<220>
 <223> péptido conector 10

<400> 21

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

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

<220>
 <223> péptido conector 11

<400> 22

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

Gly Gly Gly Ser
 20

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

<220>
 <223> péptido conector 12

<400> 23

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 20 25

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

<400> 24

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

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

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

<400> 25

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

<210> 26
 <211> 12

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 26

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

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

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

<400> 27

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

<210> 28
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> variante de polipéptido región bisagra de cadena pesada de IgG2 humana 2

<400> 28

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

<210> 29
 <211> 62
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 29

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

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

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

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

<210> 30
 <211> 12
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

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

<210> 31

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

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

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

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

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

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

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

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

<210> 32

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

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

<400> 32

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

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

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

484720.TXT

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

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

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

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

<210> 33

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> dominio CH2 de IgG2 humana con las mutaciones L234A, L235A y P329G

<400> 33

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

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

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

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

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

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

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

<210> 34

<211> 105

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

484720.TXT

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

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

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

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

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

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
100 105

<210> 35

<211> 105

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> variante de botón de dominio CH3 de IgG1 humana

<400> 35

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

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

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

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

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

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

100

105

<210> 36
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> variante de ojal de dominio CH3 de IgG1 humana

<400> 36

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

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

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

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

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

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 100 105

<210> 37
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 37

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

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

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

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

484720.TXT

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 38

<211> 232

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> región Fc de cadena pesada de IgG1 humana con las mutaciones L234A y L235A

<400> 38

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

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

484720.TXT

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 39

<211> 232

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

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

<400> 39

484720.TXT

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 40
<211> 232
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

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

<400> 40

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

484720.TXT

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

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

<220>
<223> Cadena ligera de Ig

<400> 41

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 42

<211> 448

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

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

<400> 42

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 Página 18

180

185

190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350
 Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 43

<211> 448

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

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

<400> 43

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 Página 20

```

195                               200                               205

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435                               440                               445

```

<210> 44
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

 <400> 44

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

 Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr

210

215

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

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

<220>

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

<400> 45

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

225

230

<210> 46
 <211> 246
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> scFv
 <400> 46

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

484720.TXT

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

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

Thr Lys Val Glu Ser Lys
 245

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

<400> 47

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

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

<400> 48

Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5

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

<400> 49

Ala Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5

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

<400> 50

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

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

<400> 51

Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro
1 5

<210> 52
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Dengue

<400> 52

Trp Tyr Ala Gln Ile Gln Pro His Trp
1 5

<210> 53
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Dengue

<400> 53

Ala Phe Ser Gly Val Ser Trp Thr Met
1 5

<210> 54
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Dengue

<400> 54

Ile Leu Ile Gly Val Val Ile Thr Trp
1 5

<210> 55
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Dengue

<400> 55

Met Met Ile Pro Thr Val Val Ala Phe
1 5

<210> 56
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Dengue

<400> 56

Pro Phe Pro Gln Ser Asn Ala Pro Ile
1 5

<210> 57
<211> 9
<212> PRT

<213> Virus Dengue

<400> 57

Leu Leu Leu Thr Leu Leu Ala Thr Val
1 5

<210> 58

<211> 9

<212> PRT

<213> Virus Dengue

<400> 58

Ile Val Leu Glu His Gly Ser Cys Val
1 5

<210> 59

<211> 9

<212> PRT

<213> Virus Dengue

<400> 59

Leu Leu Phe Lys Thr Glu Asn Gly Val
1 5

<210> 60

<211> 9

<212> PRT

<213> Virus Dengue

<400> 60

Pro Leu Asn Glu Ala Ile Met Ala Val
1 5

<210> 61

<211> 9

<212> PRT

<213> Virus Dengue

<400> 61

Asn Leu Val Arg Leu Gln Ser Gly Val
1 5

<210> 62

<211> 9

<212> PRT

<213> Virus Dengue

<400> 62

Leu Val Ile Ser Gly Leu Phe Pro Val
1 5

<210> 63
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Virus Dengue

<400> 63

Leu Leu Leu Val Ala His Tyr Ala Ile
 1 5

<210> 64
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Virus Dengue

<400> 64

Leu Ala Leu Leu Ala Ala Phe Lys Val
 1 5

<210> 65
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Virus Dengue

<400> 65

Val Ile Leu Ala Gly Pro Met Pro Val
 1 5

<210> 66
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Virus Dengue

<400> 66

His Val Leu Gly Arg Leu Ile Thr Val
 1 5

<210> 67
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Citomegalovirus humano

<400> 67

Val Thr Glu His Asp Thr Leu Leu Tyr
 1 5

<210> 68
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Citomegalovirus humano

<400> 68

Asn Thr Asp Phe Arg Val Leu Glu Leu

1

5

<210> 69
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Citomegalovirus humano

<400> 69

Cys Val Glu Thr Met Cys Asn Glu Tyr
 1 5

<210> 70
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Citomegalovirus humano

<400> 70

Val Leu Glu Glu Thr Ser Val Met Leu
 1 5

<210> 71
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Citomegalovirus humano

<400> 71

Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val
 1 5

<210> 72
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Citomegalovirus humano

<400> 72

Arg Ile Phe Ala Glu Leu Glu Gly Val
 1 5

<210> 73
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Citomegalovirus humano

<400> 73

Ile Ile Tyr Thr Arg Asn His Glu Val
 1 5

<210> 74
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Citomegalovirus humano

<400> 74

Val Leu Ala Glu Leu Val Lys Gln Ile
 1 5

<210> 75

<211> 9

<212> PRT

<213> Citomegalovirus humano

<400> 75

Ala Val Gly Gly Ala Val Ala Ser Val
 1 5

<210> 76

<211> 9

<212> PRT

<213> Citomegalovirus humano

<400> 76

Thr Val Arg Ser His Cys Val Ser Lys
 1 5

<210> 77

<211> 9

<212> PRT

<213> Citomegalovirus humano

<400> 77

Ile Met Arg Glu Phe Asn Ser Tyr Lys
 1 5

<210> 78

<211> 10

<212> PRT

<213> Citomegalovirus humano

<400> 78

Gly Pro Ile Ser His Gly His Val Leu Lys
 1 5 10

<210> 79

<211> 9

<212> PRT

<213> Citomegalovirus humano

<400> 79

Ala Thr Val Gln Gly Gln Asn Leu Lys
 1 5

<210> 80

<211> 9

<212> PRT
 <213> Citomegalovirus humano

<400> 80

Val Tyr Ala Leu Pro Leu Lys Met Leu
 1 5

<210> 81
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Citomegalovirus humano

<400> 81

Ala Tyr Ala Gln Lys Ile Phe Lys Ile Leu
 1 5 10

<210> 82
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Citomegalovirus humano

<400> 82

Gln Tyr Asp Pro Val Ala Ala Leu Phe
 1 5

<210> 83
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Citomegalovirus humano

<400> 83

Tyr Val Lys Val Tyr Leu Glu Ser Phe
 1 5

<210> 84
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Citomegalovirus humano

<400> 84

Asp Ile Tyr Arg Ile Phe Ala Glu Leu
 1 5

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

<400> 85

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

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

<400> 86

Lys Ala Arg Asp His Leu Ala Val Leu
 1 5

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

<400> 87

Gln Ala Arg Leu Thr Val Ser Gly Leu
 1 5

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

<400> 88

Lys Ala Arg Ala Lys Lys Asp Glu Leu
 1 5

<210> 89
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Citomegalovirus humano

<400> 89

Gln Ile Lys Val Arg Val Asp Met Val
 1 5

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

<400> 90

Arg Arg Arg His Arg Gln Asp Ala Leu
 1 5

<210> 91
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Citomegalovirus humano

<400> 91

Ala Arg Val Tyr Glu Ile Lys Cys Arg
1 5

<210> 92
<211> 9
<212> PRT
<213> Citomegalovirus humano

<400> 92

Lys Met Gln Val Ile Gly Asp Gln Tyr
1 5

<210> 93
<211> 9
<212> PRT
<213> Citomegalovirus humano

<400> 93

Asn Val Arg Arg Ser Trp Glu Glu Leu
1 5

<210> 94
<211> 12
<212> PRT
<213> Citomegalovirus humano

<400> 94

Cys Pro Ser Gln Glu Pro Met Ser Ile Tyr Val Tyr
1 5 10

<210> 95
<211> 13
<212> PRT
<213> Citomegalovirus humano

<400> 95

Lys Pro Gly Lys Ile Ser His Ile Met Leu Asp Val Ala
1 5 10

<210> 96
<211> 9
<212> PRT
<213> Citomegalovirus humano

<400> 96

Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met
1 5

<210> 97
<211> 9
<212> PRT
<213> Citomegalovirus humano

<400> 97

Ile Pro Ser Ile Asn Val His His Tyr
 1 5

<210> 98

<211> 9

<212> PRT

<213> Citomegalovirus humano

<400> 98

Phe Glu Gln Pro Thr Glu Thr Pro Pro
 1 5

<210> 99

<211> 9

<212> PRT

<213> Citomegalovirus humano

<400> 99

Tyr Ala Tyr Ile Tyr Thr Thr Tyr Leu
 1 5

<210> 100

<211> 11

<212> PRT

<213> Citomegalovirus humano

<400> 100

Gln Glu Phe Phe Trp Asp Ala Asn Asp Ile Tyr
 1 5 10

<210> 101

<211> 9

<212> PRT

<213> Citomegalovirus humano

<400> 101

Tyr Glu Gln His Lys Ile Thr Ser Tyr
 1 5

<210> 102

<211> 9

<212> PRT

<213> Citomegalovirus humano

<400> 102

Gln Glu Pro Met Ser Ile Tyr Val Tyr
 1 5

<210> 103

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Citomegalovirus humano

<400> 103

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

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

<400> 104

Gln Ala Ile Arg Glu Thr Val Glu Leu
 1 5

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

<400> 105

Thr Arg Ala Thr Lys Met Gln Val Ile
 1 5

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

<400> 106

Asp Ala Leu Pro Gly Pro Cys Ile
 1 5

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

<400> 107

Cys Glu Asp Val Pro Ser Gly Lys Leu
 1 5

<210> 108
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Citomegalovirus humano

<400> 108

His Glu Arg Asn Gly Phe Thr Val Leu
 1 5

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

<400> 109

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

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

<400> 110

Gln Met Trp Gln Ala Arg Leu Thr Val
 1 5

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

<400> 111

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

<210> 112
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Citomegalovirus humano

<400> 112

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

PATENT COOPERATION TREATY

ASK	Roche Diagnostics GmbH Patent Department Penzberg						
DI	U 4. Okt. 2012						
BUR	WN						
FB	GF	GH	HIL	MI	TH	UE	

W

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

Termin

see form PCT/ISA/220

22.04.2013 not -

(12.03.13)

PCT

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY (PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference

see form PCT/ISA/220 27493 WO-ASK

FOR FURTHER ACTION

See paragraph 2 below

International application No.

PCT/EP2012/061734

International filing date (day/month/year)

19.06.2012

Priority date (day/month/year)

22.06.2011

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC

INV. C07K16/46 A61K47/48 C07K14/705 C07K16/28

Applicant

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step and industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office

D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0
Fax: +49 89 2399 - 4465

Date of completion of
this opinion

see form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Hermann, Patrice

Telephone No. +49 89 2399-7109



**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/EP2012/061734

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))
3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, this opinion has been established on the basis of a sequence listing filed or furnished:
 - a. (means)
 - ☐ on paper
 - ☒ in electronic form
 - b. (time)
 - ☒ in the international application as filed
 - ☐ together with the international application in electronic form
 - ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search
4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

see separate sheet

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/EP2012/061734

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>2, 5, 6, 10-12, 15-17</u>
	No: Claims	<u>1, 3, 4, 7-9, 13, 14, 18-30</u>
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-30</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-30</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Re Item I

Basis of the report

Sequences SEQ ID NOs 1-112 from the sequence listing are also included in the basis of this written opinion.

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

- 1 Reference is made to the following documents; the numbering will be adhered to in the rest of the procedure.

D1 WO 2005/099361 A2 (VACCINEX INC [US]; ZAUDERER MAURICE [US]) 27 October 2005

D2 US 2004/091488 A1 (SEEMAN GERHARD [DE] ET AL) 13 May 2004

- 2 Document D1 already discloses fusion protein comprising an antibody linked to alpha 1-3 protein domains of a MHC class I molecule and beta-2 microglobulin and also eventually an antigenic peptide bound in the MHC groove (cf. D1 p. 4 [0011] and p. 7 [0024] and claims). In that regards document D1 discloses nucleic acid encoding the same, host cells comprising said nucleic acid, pharmaceutical formulation comprising the same and their use for treating cancer, infections, or autoimmune diseases, i.e. the use of said fusion protein to target specific cytotoxic T cells towards cancer cells or infectious agents such as viral infected cells that are recognised by the antibody portion of the chimera (cf. D1 p. 5 [0018], p. 44 [0140]; examples 16 and 17). The disclosure of document D1 appears therefore to anticipate the subject-matters of claims 1, 3, 4, 7-9, 13, 14 and 18-30 contrary to the requirements of Articles 33(1) and 33(2) PCT.
- 3 None of the prior-art documents at hand discloses the subject-matters of claims 2, 5, 6, 10-12 and 15-17. Claims 2, 5, 6, 10-12 and 15-17 appear therefore to be novel and to meet the requirements of Article 33(2) PCT.

- 4 However, the subject-matters of claims 2, 5, 6, 10-12 and 15-17 do not appear to be based on an inventive concept and claims 2, 5, 6, 10-12 and 15-17 therefore lack an inventive step required to fulfill Articles 33(1) and 33(3) PCT, the reasons being as follows:

- 4.1 Taking D1 as closest prior art document it appears that the subject-matters of present claims 10-12 and 15-17 differ from the disclosure of D1 by the exact sequences of the alpha chain domains of the MHC class 1 determinant used in the fusion protein construct, the exact peptide sequence of the beta-2 microglobulin, the linker sequences used to link each polypeptide to each other or the polypeptide sequences of the antibody domains used in the fusion protein. The effect due to such distinction can only be seen in the recognition and targeting of distinct population of cytotoxic T cells towards a distinct population of target cells.

Therefore, in view of the prior art at hand the objective technical problem to be solved by the instant application can be seen in the provision of an alternative MHC class I - beta-2 microglobulin - antibody target protein adapted to target distinct cells.

The solution to said objective technical problem can however not be considered inventive because for a person skilled in the art and having knowledge of D1, the selection of distinct alpha 1-3 polypeptide domain sequences of MHC class I molecule and distinct polypeptide sequences of antibody domain for use in the fusion protein is considered to represent a design procedure said skilled person would perform according to his needs without the need of inventive skills. It should further be noted that none of the experimental data provided in the present description pertains to the use of a product as contained in present claims 10-12 and 15-17. In the absence of said data it appears that the subject-matter of claims 10-12 and 15-17 does not solve a previously unforeseeable technical problem in the art or lead to a surprising technical effect and an inventive step for the subject-matters of claims 10-12 and 15-17 would not at present be acknowledged contrary to the requirements of Articles 33(1) and 33(3) PCT.

- 4.2 A similar reasoning would apply *mutatis mutandis* when departing from D2 as closest state of the art. Document D2 also discloses antigenic construct resulting from the linkage of major histocompatibility complex (MHC) class I with specific carrier molecules such as antibody fragments and their use for targeting cytotoxic T cells towards target cells bearing antigen specifically recognized by the antibody fragment (cf. D2 [0051] - [0070], fig. 1, 34 and

claims 6 and 7). Here again the difference between the claimed subject-matters and the disclosure of D2 can be seen in the specific peptide sequences chosen for the MHC class I binding groove, the antibody domain, the beta-2 microglobulin and the linkers. However the selection of said peptide sequences appear to be a design procedure the skilled person would performed without involving inventive skills. Moreover, in the absence of experimental and comparative data proving the contrary, said choice does not appear to solve a previously unforeseeable technical problem in the art or to lead to an unexpected effect contrary to the requirements of Articles 33(1) and 33(3) PCT.

- 4.3 In view of the prior-art documents at hand, dependent claims 2, 5 and 6 do not appear to contain any additional features which, in combination with the features of any claim to which they refer, meet the requirements of the PCT with respect to inventive step (Article 33(3) PCT) since these additional features appear to be conventional and do not appear to result in any unexpected effect (Article 33(3) PCT). For instance the features contained in claims 2, 5 and 6 are considered as directly derivable from the teaching of both documents D1 and D2 taken separately as closest state of the art.
- 5 Due to their wording, i.e. "method of ... comprising administering ...", claims 29 and 30 encompass method of treatment of the human or animal body by surgery and/or therapy. Claims 29 and 30 thus relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 39.1(iv) / 67.1(iv) PCT. The patentability can be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognise as patentable claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow claims to a product, in particular substances or compositions for use in a first or further medical treatment.

Possible steps after receipt of the international search report (ISR) and written opinion of the International Searching Authority (WO-ISA)

General information

For all international applications filed on or after 01/01/2004 the competent ISA will establish an ISR. It is accompanied by the WO-ISA. Unlike the former written opinion of the IPEA (Rule 66.2 PCT), the WO-ISA is not meant to be responded to, but to be taken into consideration for further procedural steps. This document explains about the possibilities.

Amending claims under Art. 19 PCT

Within 2 months after the date of mailing of the ISR and the WO-ISA the applicant may file amended claims under Art. 19 PCT directly with the International Bureau of WIPO. The PCT reform of 2004 did not change this procedure. For further information please see Rule 46 PCT as well as form PCT/ISA/220 and the corresponding Notes to form PCT/ISA/220.

Filing a demand for international preliminary examination

In principle, the WO-ISA will be considered as the written opinion of the IPEA. This should, in many cases, make it unnecessary to file a demand for international preliminary examination. If the applicant nevertheless wishes to file a demand this must be done before expiry of 3 months after the date of mailing of the ISR/ WO-ISA or 22 months after priority date, whichever expires later (Rule 54bis PCT). Amendments under Art. 34 PCT can be filed with the IPEA as before, normally at the same time as filing the demand (Rule 66.1 (b) PCT).

If a demand for international preliminary examination is filed and no comments/amendments have been received the WO-ISA will be transformed by the IPEA into an IPRP (International Preliminary Report on Patentability) which would merely reflect the content of the WO-ISA. The demand can still be withdrawn (Art. 37 PCT).

Filing informal comments

After receipt of the ISR/WO-ISA the applicant may file informal comments on the WO-ISA directly with the International Bureau of WIPO. These will be communicated to the designated Offices together with the IPRP (International Preliminary Report on Patentability) at 30 months from the priority date. Please also refer to the next box.

End of the international phase

At the end of the international phase the International Bureau of WIPO will transform the WO-ISA or, if a demand was filed, the written opinion of the IPEA into the IPRP, which will then be transmitted together with possible informal comments to the designated Offices. The IPRP replaces the former IPER (international preliminary examination report).

Relevant PCT Rules and more information

Rule 43 PCT, Rule 43bis PCT, Rule 44 PCT, Rule 44bis PCT, PCT Newsletter 12/2003, OJ 11/2003, OJ 12/2003

ANEXO

El documento que acredita la calidad de REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores **ALICIA LLOREDA** y/o **GUSTAVO TAMAYO** y/o **IGNACIO SANTAMARIA** y/o **ENRIQUE ALVAREZ** para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de la sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se está presentando con esta solicitud. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.


ALICIA LLOREDA RICAURTE

T.P. No. 53.215

TRADUCCION OFICIAL No.

de un documento escrito en Inglés, el cual para su identificación se sella con el sello de la traductora, lo mismo que la presente.-

Traducción de la apostilla en inglés que se encuentra a continuación de la legalización de las firmas de los señores Klausner y Strebel, representantes legales de F. Hoffmann-La Roche, que aparecen en un documento de Poder, escrito en español e inglés, conferido a ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, expedida en idioma inglés por el notario Peter Kuster, bajo el No. 2004/20, el 17-08-2004, en Basilea, Suiza.

AUTENTICACION OFICIAL

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. País: Suiza

Este documento público

2. Ha sido firmado por el Lic. iur. Peter Kuster

3. Actuando en calidad de notario público

4. Lleva el sello del mencionado notario

Certificado

5. en Basel (Basilea)

6. el 18 de agosto 2004

7. por la Cancillería de Estado del Cantón de Basel-Stadt

8. bajo el No 8835/13376

9. Sello

10. Firma

Cancillería de Estado

Fdo.: firma ilegible

de la ciudad de Basel (Basilea)

Ruedi Eggs

ES TRADUCCION FIEL Y COMPLETA, de la cual se deja copia en los archivos de estas oficinas para su confrontación.

Bogotá, 2 de septiembre 2004

Maria Mercedes Uricoechea T.
Maria Mercedes Uricoechea T.
 Traductora Juramentada
 Resolución 10607/81 Minjusticia

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

258651

ZONA SET - 3 P 12:12

Pana Urcochea

UCS

CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTÁ D.C.

Los abajo firmados, **F. HOFFMANN-LA ROCHE AG**, una sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes de Suiza.

con domicilio en **4070 Basilea, Suiza**

The undersigned, **F. HOFFMANN-LA ROCHE AG**, a corporation organized and existing under the laws of Switzerland.

domiciled at **4070 Basel, Switzerland**

nombramos por el presente a **ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ**, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 6o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

Los doctores **ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ**, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en todos los trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos; formular descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes, presentar oposiciones y apelaciones; instaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeran conducentes al resguardo de nuestros intereses; y en caso de producirse oposición, pasando los antecedentes a los tribunales, quedan facultados para tomar intervención como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a árbitros, desistir, percibir y apelar, con todas las demás facultades que resulten necesarias, y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno cuanto dichos representantes y/o los apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro beneficio.

Asimismo, facultamos a los doctores **ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ**, para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre nuestro.

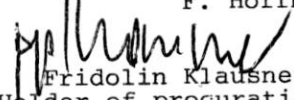
Dado y firmado

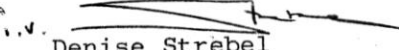
hereby appoint, **ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ**, of Bogota, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents, so as to comply with paragraph 1o. of article 543 of decree 410 of 1971.

Doctors **ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ**, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in all proceedings pertaining to industrial property, for which purpose we authorize them to take before the said authorities all the necessary steps for the said end; to file petitions, declarations, claims, recourses and withdrawals, to draw up specifications; to file amendments, to limit the scope of applications, file oppositions; file cancellations total or partially waive registrations, to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive proper receipts, to comply with all other requirements and, in short, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests; and in case of opposition, where the proceedings be passed over to the courts, we authorize said agents to act on our behalf, as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to make arrangements, to submit to arbitrators, to desist, to collect, to appeal and, in short, with all such further powers as may be required, and we hereby declare from now on as valid and good all that said representatives and/or the agents by any one of them appointed may do for our benefit.

We also authorize doctors **ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ**, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

Given and signed this *17th day of August 2009.*
F. Hoffmann-La Roche AG


Fridolin Klausner
Holder of procuration


Denise Strébel
Mandatory

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

Suiza
Basilea

{ss

El día 17 de Agosto de 2004, compareció Fridolin Klausner y Denise Stöbel a quien conozco y de quien me consta que firmó el anterior documento, y quien debidamente juramentado declaró y dijo que él es titular del poder/mandatario de F.HOFFMANN-LA ROCHE AG, la compañía nombrada en el documento que antecede, una sociedad debidamente organizada y existente conforme a las leyes de Suiza, domiciliada en la ciudad de Basilea, Suiza, legalmente constituida para un período de duración que aún no ha terminado, que ejerce su objeto social; conforme a las leyes de Suiza; que el declarante está autorizado por dicha Compañía para conferir este poder; que el sello estampado por él al pie de tal poder, en nombre y en representación de la expresada Compañía, es el sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se confiere este instrumento está comprendido dentro del de la sociedad.

El suscrito Notario ha visto los Estatutos de incorporación firmados en Suiza, ciudad de Basilea, con fecha 19 Junio 1997, y certifica que de conformidad con la legislación de dicho País, la anterior declaración juramentada es prueba suficiente de que los hechos sobre que ella versa son ciertos o verdaderos, de lo cual da fe.

Notary Public (Notario Público).

Switzerland
Basel

{ss

On this 17th day of August, 2004, personally, Fridolin Klausner and Denise Stöbel came both, Swiss citizens and Swiss residents, to me known, and known to me to be the person who signed the foregoing instrument, who being by me duly sworn did depose and say that he is the Holder of Procuration/Mandatory of F.HOFFMANN-LA ROCHE AG, the company named within, a Corporation organized and existing under the laws of the Switzerland, domiciled at the City of Basel, legally constituted for a period of tenure not yet expired, which exercises its corporate purposes according to the laws of Switzerland; that the deponent is authorized by said Company to confer this power of attorney; that the seal affixed hereunto by the deponent in the name and on behalf of said Corporation is the corporate seal thereof; and that the purpose for which this instrument is granted is included within the corporate purposes of the Company.

The undersigned Notary Public has seen the articles of Incorporation of said Corporation executed at Suiza, ciudad de Basel, under date of 19th day of June 1997, and hereby certifies that under the laws of said Country the foregoing acknowledgment is sufficient proof that the facts therein contained are true, which he attests.

Basel, this 17-08-2004 (seventeenth day of two thousand and four)

Dr. P. Kuster
Notar



Allg. Pro.

Dr. Peter Kuster
Advokat und Notar
Peterskirchplatz 12
Postfach
CH-4001 Basel

OFFICIAL AUTHENTICATION
(Hague Convention of October 5th, 1961)

1. Country: Switzerland (Schweiz/Suisse)

This official document

2. is signed by Dr. R. Kuch

3. in his/her function as Att. Noller

4. and certified by the seal of the Gemeinde

Certified

18. Aug. 2004

5. in Basel (Bâle)

6. on

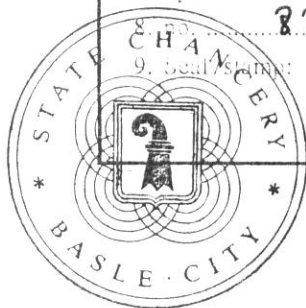
7. by the State Chancery of the Canton of Basel-Stadt

8. No. **8835 / 10 376**

9. Seal/Stamp:

10. Signature:

[Signature]





(51) International Patent Classification:

C07K 16/46 (2006.01) C07K 14/705 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/EP2012/061734

(22) International Filing Date:

19 June 2012 (19.06.2012)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

11171027.3 22 June 2011 (22.06.2011) EP

(71) Applicant (for all designated States except US): **F. HOFFMANN-LA ROCHE AG** [CH/CH]; Grenzacher Strasse 124, CH-4070 Basel (CH).

(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant (for US only): **KNOETGEN, Hendrik** [DE/DE]; Agathe-Fleissner-Weg 16, 82377 Penzberg (DE).

(74) Agents: **JENNI, Wolfgang** et al.; Roche Diagnostics GmbH, Patent Department (LPP.....6164), P.O.Box 11 52, 82372 Penzberg (DE).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

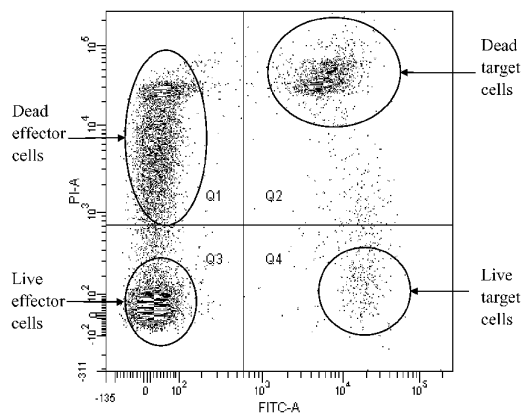
Declarations under Rule 4.17:

— of inventorship (Rule 4.17(iv))

[Continued on next page]

(54) Title: REMOVAL OF TARGET CELLS BY CIRCULATING VIRUS-SPECIFIC CYTOTOXIC T-CELLS USING MHC CLASS I COMPRISING COMPLEXES

Fig. 5b



(57) Abstract: Herein is reported a complex comprising as first part an antibody derived part that specifically binds to a target antigen, and as second part a virus-derived peptide linked to a MHC class I protein complex. With the complex as reported herein existing virus-specific circulating cytotoxic T-cells (T-memory-cells or T-effector-cells) of an individual can be directed to cells expressing the target antigen, to which the antibody derived part of the covalent complex specifically binds to, by dressing these cells with a MHC class I complexes mimicking an acute viral infection. Thus, one aspect as reported herein is a complex, characterized in that it comprises one fusion polypeptide that comprises in N- to C-terminal direction either (i) a β 2-microglobulin, and (ii) the extracellular domains α 1, α 2, and α 3 of a class I MHC molecule with a relative frequency of less than 1 %, or (i) a virus-derived peptide, (ii) a β 2-microglobulin, and (iii) the extracellular domains α 1, α 2, and α 3 of a class I MHC molecule with a relative frequency of 1 % or more, and two polypeptide chains, which are linked by one or more disulfide bonds, wherein the first disulfide-linked polypeptide chain comprises in N- to C-terminal direction (i) an immunoglobulin light or heavy chain variable domain, (ii) an immunoglobulin light or heavy chain constant domain, and (iii) an antibody heavy chain hinge region polypeptide, and the second disulfide-linked

[Continued on next page]



Published:— *with international search report (Art. 21(3))*— *with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))*

polypeptide chain comprises an antibody heavy chain hinge region polypeptide, wherein the fusion polypeptide is either covalently bound either to the C-terminus or the N-terminus of one of the disulfide-linked polypeptide chains, or covalently bound to the N-terminus of an antibody variable domain that is the complementary heavy or light chain variable domain to that comprised in the first disulfide-linked polypeptide chain.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 27493 WO-ASK	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/EP2012/061734	International filing date (<i>day/month/year</i>) 19/06/2012	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 22/06/2011
Applicant F. HOFFMANN-LA ROCHE AG		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 4 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
- ☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6**bis**(a)).

c. ☒ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. ☐ **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
- ☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
- ☐ the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. 5b
- ☒ as suggested by the applicant
- ☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
- ☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
- b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2012/061734

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
 - a. (means)

☐

 on paper
 - ☒

 in electronic form
 - b. (time)

☒

 in the international application as filed
 - ☐

 together with the international application in electronic form
 - ☐

 subsequently to this Authority for the purpose of search
2.

☐

 In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2012/061734

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/46 A61K47/48 C07K14/705 C07K16/28 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, PAJ, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/099361 A2 (VACCINEX INC [US]; ZAUDERER MAURICE [US]) 27 October 2005 (2005-10-27) the whole document -----	1-30
X	US 2004/091488 A1 (SEEMAN GERHARD [DE] ET AL) 13 May 2004 (2004-05-13) the whole document -----	1-30
A	US 7 521 197 B2 (SAVAGE PHILIP MICHAEL [GB]) 21 April 2009 (2009-04-21) the whole document -----	1-30
A	WO 99/64597 A1 (US GOV HEALTH & HUMAN SERV [US]; RIBAUDO RANDALL K [US]; SHIELDS MICHA) 16 December 1999 (1999-12-16) the whole document -----	1-30
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 19 September 2012		Date of mailing of the international search report 04/10/2012
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Hermann, Patrice

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/061734

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005099361 A2	27-10-2005	US 2005042218 A1 WO 2005099361 A2	24-02-2005 27-10-2005
US 2004091488 A1	13-05-2004	AT 128732 T AU 625065 B2 AU 3900589 A DE 3825615 A1 DK 371089 A EP 0352761 A2 ES 2080055 T3 FI 893575 A GR 3017915 T3 JP 2104599 A JP 2812726 B2 PT 91294 A US 6548067 B1 US 2004091488 A1	15-10-1995 02-07-1992 01-02-1990 01-02-1990 29-01-1990 31-01-1990 01-02-1996 29-01-1990 31-01-1996 17-04-1990 22-10-1998 08-02-1990 15-04-2003 13-05-2004
US 7521197 B2	21-04-2009	NONE	
WO 9964597 A1	16-12-1999	AT 321859 T AU 4545799 A DE 69930630 T2 EP 1086224 A1 WO 9964597 A1	15-04-2006 30-12-1999 18-01-2007 28-03-2001 16-12-1999

 SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES TARJETA ARCHIVO TEMÁTICO PATENTE DE INVENCION ____ PCT <u>X</u> MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____	
(21) No. de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 01-11-13	
(51) Clasificación Internacional: C07K 16/46	
(71) Solicitante(s): F. HOFFMANN–LA ROCHE AG	
(72) Inventor(es): KNOETGEN, Hendrik.	
(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE	
(30) Prioridad (31) No. Prioridad (32) Fecha (33) País 11171027.3 22-06-11 EP	
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 22-01-14	(87) Publicación internacional:
(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT Fecha de presentación de la solicitud: 19-06-12 No. de solicitud: PCT/EP2012/061734	Fecha: 27-12-12 No. Publicación: WO 2012/175508 A1
(54) Título: ELIMINACIÓN DE CÉLULAS DIANA POR PARTE DE CÉLULAS T CITOTÓXICAS ESPECÍFICAS DE VIRUS UTILIZANDO COMPLEJOS QUE COMPRENEN MHC DE CLASE I	
(57) Resumen - Reivindicación(es): Resumen.- En la presente memoria se informa de un complejo que comprende como primer componente una parte derivada de un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno diana, y como segundo componente un péptido derivado de un virus unido a un complejo de proteína de MHC de clase I. Con el complejo indicado en la presente memoria pueden dirigirse células T citotóxicas circulantes específicas de virus existentes (células T de memoria o células T efectoras) de un individuo a células que expresan el antígeno diana, a las que se une específicamente la parte del complejo covalente derivada de un anticuerpo, mediante la cobertura de dichas células con un complejo MHC de clase I imitando una infección vírica aguda. De esta manera, un aspecto indicado en la presente memoria es un complejo, caracterizado porque comprende un polipéptido de fusión que comprende, en dirección N-terminal a C-terminal, (i) una β2-microglobulina, e (ii) los dominios extracelulares α1, α2 y α3 de una molécula de MHC de clase I con una frecuencia relativa de 1% o superior, y dos cadenas polipeptídicas, que se encuentran unidas mediante uno o más enlaces disulfuro, en el que la primera cadena polipeptídica unida mediante disulfuro comprende, en dirección N-terminal a C-terminal, (i) un dominio variable de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina, (ii) un dominio constante de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina, e (iii) un polipéptido de región bisagra de cadena pesada de anticuerpo, y la segunda cadena polipeptídica unida mediante disulfuro comprende un polipéptido de región bisagra de cadena pesada de anticuerpo, en el que el polipéptido de fusión se encuentra unido covalentemente al extremo C-terminal o al extremo N-terminal de una de las cadenas polipeptídicas unidas mediante disulfuro, o se encuentra unida covalentemente al extremo N-terminal de un dominio variable de anticuerpo que es el dominio variable de cadena pesada o ligera complementario al comprendido en la primera cadena polipeptídica unida mediante disulfuro. Sector: Biotecnología. Inmunoglobulinas hídricas en las que el ingrediente activo esté unido químicamente a los ingredientes no activos.	

 SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS PATENTE DE INVENCION ____ PCT <u>X</u> MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____	
(21) No. de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 01-11-13	
(51) Clasificación Internacional: C07K 16/46	
(71) Solicitante(s): F. HOFFMANN–LA ROCHE AG.	
(72) Inventor(es): KNOETGEN, Hendrik.	
(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE	
(30) Prioridad (31) No. Prioridad (32) Fecha (33) País 11171027.3 22-06-11 EP	
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 22-01-14	(87) Publicación internacional
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 19-06-12 No. de solicitud: PCT/EP2012/061734	Fecha: 27-12-12 No. publicación: WO 2012/175508 A1
(54) Título: ELIMINACIÓN DE CÉLULAS DIANA POR PARTE DE CÉLULAS T CITOTÓXICAS ESPECÍFICAS DE VIRUS UTILIZANDO COMPLEJOS QUE COMPRENEN MHC DE CLASE I	