

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI 0712716-2 A2**

(22) Data de Depósito: 17/05/2007
(43) Data da Publicação: 22/05/2012
(RPI 2159)



(51) *Int.Cl.:*
C12P 21/04

(54) Título: PROTEÍNA DE FUSÃO, COMPOSIÇÃO, CONSTRUÇÃO DE ÁCIDO NUCLEICO, VETOR, CÉLULA TRANSFORMADA, PREPARAÇÃO ISOLADA DE CORPOS DE INCLUSÃO BACTERIALMENTE EXPRESSADOS, PROCESSO PARA PRODUZIR UMA PROTEÍNA DE FUSÃO, E, MÉTODOS PARA MATAR SELETIVAMENTE UMA CÉLULA DE TUMOR E PARA TRATAR UMA CÉLULA DE TUMOR QUE EXPRESSA MESOTELINA EM SUA SUPERFÍCIE

(30) Prioridade Unionista: 19/05/2006 US 60/801798

(73) Titular(es): Technion Research & Development foundation LTD, Teva Pharmaceutical Industries, Ltd.

(72) Inventor(es): Kfir Oved, Roy Noy, Yoram Reiter

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT US2007011953 de 17/05/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/136778de 29/11/2007

(57) Resumo: PROTEÍNA DE FUSÃO, COMPOSIÇÃO, CONSTRUÇÃO DE ÁCIDO NUCLEICO, VETOR, CÉLULA TRANSFORMADA, PREPARAÇÃO ISOLADA DE CORPOS DE INCLUSÃO BACTERIALMENTE EXPRESSADOS, PROCESSO PARA PRODUZIR UMA PROTEÍNA DE FUSÃO, E, MÉTODOS PARA MATAR SELETIVAMENTE UMA CÉLULA DE TUMOR E PARA TRATAR UMA CÉLULA DE TUMOR QUE EXPRESSA MESOTELINA EM SUA SUPERFÍCIE. Esta invenção provê proteínas de fusão compreendendo aminoácidos consecutivos que, começando no término amino da proteína, correspondem a aminoácidos consecutivos presentes em (i) um peptídeo limitado a MHC de citomegalovírus humano, (ii) um primeiro ligador de peptídeo, (iii) uma β -2 microglobulina humana, (iv) um segundo ligador de peptídeo, (v) uma cadeia HLA-A2 de uma molécula de MHC de classe I humana, (vi) um terceiro ligador de peptídeo, (vii) uma região variável de uma cadeia pesada de um fragmento scFv de um anticorpo, e (viii) uma região variável de uma cadeia leve deste fragmento scFv, em que os aminoácidos consecutivos que correspondem a (vii) e (viii) são ligados juntos diretamente por uma ligação peptídeo ou por aminoácidos consecutivos que correspondem a um quarto ligador de peptídeo, em que o anticorpo do qual o fragmento scFv é derivado especificamente liga a mesotelina. Esta intenção provê construções de ácido nucleico codificando os mesmos, processos para produzir os mesmos, composições e usos dos mesmos.

“PROTEÍNA DE FUSÃO, COMPOSIÇÃO, CONSTRUÇÃO DE ÁCIDO NUCLEICO, VETOR, CÉLULA TRANSFORMADA, PREPARAÇÃO ISOLADA DE CORPOS DE INCLUSÃO BACTERIALMENTE EXPRESSADOS, PROCESSO PARA PRODUZIR UMA PROTEÍNA DE FUSÃO, E, MÉTODOS PARA MATAR SELETIVAMENTE UMA CÉLULA DE TUMOR E PARA TRATAR UMA CÉLULA DE TUMOR QUE EXPRESSA MESOTELINA EM SUA SUPERFÍCIE”

Antecedentes da Invenção

Em todo este pedido, algumas publicações são mencionadas.

10 As citações completas para estas publicações podem ser encontradas imediatamente precedendo as reivindicações. As descrições destas publicações são aqui incorporadas por referência neste pedido a fim de descrever mais completamente o estado da técnica ao qual esta invenção pertence.

15 De acordo com uma teoria de vigilância imune atual, o sistema imune continuamente localiza e destrói as células transformadas. No entanto, algumas células escapam da resposta imune aparentemente eficaz e conseqüentemente se tornam tumores (1-4). A evasão do tumor da resposta imune é um fenômeno bem estabelecido demonstrado em numerosos estudos e é causada por uma ampla variedade de mecanismos sugeridos (1- 4). Dentre estes mecanismos estão: a produção de citocinas supressivas, a perda de peptídeos imunodominantes, a resistência a mecanismos de morte (apoptose), e a perda de MHC de classe I (1-4). Um dos mecanismos de evasão mostrados como estando fortemente correlacionado com a progressão do tumor é a perda ou regulação negativa das moléculas de MHC de classe I. Este mecanismo de evasão é abundante na maior parte dos tumores e pode resultar em um número de diferentes mutações. Vários estudos revelaram pontos fracos na carga de MHC de classe I e via de apresentação incluindo perda de beta-2-microglobulina, mutações TAP1/ TAP2, mutações de LMP, perda de

25

heterozigocidade nos genes MHC, e regulação negativa de alelos de MHC específicos.

As estratégias de imunoterapia de câncer atuais tipicamente empregam os dois braços do sistema imune: os sistemas humoral e celular.

5 No primeiro, injeção sistêmica de anticorpos monoclonais de alta afinidade (mAbs) dirigido contra os antígenos associados com o tumor na superfície da célula demonstraram atividade anti-tumor estatisticamente significativa em experiências clínicas (5,6). Além disso, mAbs anti-tumor que transportam efetadores como citocinas ou toxinas estão sendo atualmente avaliados em

10 experiências clínicas (7). A segunda abordagem principal para imunoterapia de câncer específica emprega o braço celular do sistema imune, principalmente os linfócitos T citotóxicos CD8+. Duas estratégias principais estão sendo atualmente usadas para aumentar a eficácia anti-tumor do braço celular do sistema imune: (i) imunização ativa de pacientes com peptídeos

15 conhecidos como sendo reconhecidos por linfócitos T, e (ii) terapias de transferência adotiva que permitem a seleção, ativação, e expansão de subpopulações de células T altamente reativas com potência anti-tumor melhorada. Na primeira abordagem, os peptídeos limitados a MHC derivados de antígenos de associados com tumor recentemente identificados (como

20 gp100, o grupo MAGE, NY-ESO-1) são usados para vacinar os pacientes. Estes peptídeos derivados de antígenos específicos de tumor são altamente específicos devido a sua expressão exclusiva em tecidos específicos (8-11). A segunda estratégia, transferência de células adotivas, mostrou recentemente resultados impressionantes em pacientes com melanoma metastático em que

25 células T reativas para tumor altamente selecionadas contra diferentes antígenos de diferenciação auto-derivados super-expressados foram isolados, expandidos ex vivo e re-introduzidos nos pacientes. Nesta abordagem, uma re-população clonal persistente de células T, proliferação in vivo, atividade funcional, e tráfico de sítios de tumor foram demonstrados (12-14).

Uma nova abordagem imunoterapêutica recentemente apresentada toma vantagem de duas áreas bem estabelecidas: (i) a eficácia conhecida de linfócitos T citotóxicos CD8⁺ na eliminação de células apresentando complexos MHC/peptídeo altamente imunogênicos e (ii) a

5 marcação dos antígenos de superfície de células específicas de tumor via fragmentos recombinantes de anticorpos, principalmente fragmentos de Fc de cadeia única (scFvs). Esta abordagem usa uma proteína de fusão recombinante composta de duas entidades funcionalmente distintas: (i) uma

10 molécula de MHC de classe I de cadeia única que transporta um tumor altamente imunogênico ou peptídeo derivado viral e (ii) um fragmento scFv de alta afinidade, específico de tumor (15). Vários grupos previamente demonstraram que um peptídeo MHC biotinilado multimerizado em estreptavidina ou complexos de peptídeo matriz monoméricos HLA-A2/

15 influenza (resfriado) copulados via conjugação química de anticorpos específicos de tumor podem induzir *in vitro* a lise mediada por linfócitos T de células de tumor revestidas (16-20). No entanto, estas abordagem utilizam

20 conjugação química e usam anticorpos completos ou fragmentos maiores, por exemplo fragmentos Fab. No entanto, produção e homogeneidade devido à estratégia de copulação assim como capacidade de penetração de tumor são limitados devido ao tamanho grande de tais moléculas. Lev et al descrevem

25 uma fusão genética criada entre um HLA-A2 recombinante de cadeia única e scFvs específicos de tumor. Estas fusões foram mostradas como sendo funcionais *in vitro* e *in vivo*, sendo capazes de especificamente induzir lise *in vitro* e *in vivo* mediada por linfócitos T de células de tumor revestidas com

alvo (15). A estabilidade da nova molécula quimérica é altamente dependente da presença do peptídeo no sulco MHC. Assim, dissociação do peptídeo do domínio scHLA-A2 da molécula quimérica pode afetar sua estabilidade. Oved et al se dirigiram a este problema por construção de novas moléculas quiméricas em que o peptídeo é conectado à construção scHLA-A2/scFv via

um ligador curto. Esta nova proteína de fusão foi testada para sua atividade bioquímica e biológica *in vitro* (21).

Existe uma necessidade amplamente reconhecida para uma nova proteína de fusão que possa manter sua atividade dual; ligar células alvo de tumor através da porção scFv assim como mediar citotoxicidade potente, eficaz e específica através do recrutamento de células T CD8+, cuja especificidade é governada pelo peptídeo limitado HLA-2 covalentemente ligado.

O braço de efetuator (CT) de célula T citotóxica CD8+ limitada por MHC de classe I da resposta imune adaptativa é melhor equipado para reconhecer as células de tumor como estranhas e iniciar a cascata de eventos resultando em destruição do tumor. No entanto, tumores desenvolveram estratégias sofisticadas para escapar dos mecanismos de efetuator imune, das quais a melhor estudada é a regulação negativa de moléculas de MHC de classe I que apresentam os antígenos reconhecidos por CTLs.

Para superar a limitação de abordagens anteriores e desenvolver novas abordagens para imunoterapia, uma molécula recombinante foi construída em que MHC de cadeia única é especificamente marcado para células de tumor através de sua fusão para fragmentos de anticorpo recombinantes específicos de câncer ou um ligando que liga a receptores expressados por células de tumor.

Sumário da Invenção

Esta invenção provê uma proteína de fusão compreendendo aminoácidos consecutivos que, começando no término amino da proteína, correspondem a aminoácidos consecutivos presentes em (i) um peptídeo limitado a MHC de citomegalovírus humano, (ii) um primeiro ligador de peptídeo, (iii) uma β -2 microglobulina humana, (iv) um segundo ligador de peptídeo, (v) uma cadeia HLA-A2 de uma molécula de MHC de classe I

humana, (vi) um terceiro ligador de peptídeo, (vii) uma região variável de uma cadeia pesada de um fragmento scFv de um anticorpo, e (viii) uma região variável de uma cadeia leve deste fragmento scFv, em que os aminoácidos consecutivos que correspondem a (vii) e (viii) são ligados juntos diretamente por uma ligação peptídeo ou por aminoácidos consecutivos que correspondem a um quarto ligador de peptídeo e o fragmento scFv é derivado de um anticorpo que especificamente liga a mesotelina.

Esta invenção também provê composições compreendendo a proteína de fusão e um veículo.

Esta invenção ainda provê a construção de ácido nucleico codificando uma proteína de fusão compreendendo aminoácidos consecutivos que, começando no término amino da proteína, correspondem a aminoácidos consecutivos presentes em (i) um peptídeo limitado a MHC de citomegalovírus humano, (ii) um primeiro ligador de peptídeo, (iii) uma β -2 microglobulina humana, (iv) um segundo ligador de peptídeo, (v) uma cadeia HLA-A2 de uma molécula de MHC de classe I humana, (vi) um terceiro ligador de peptídeo, (vii) uma região variável de uma cadeia pesada de um fragmento scFv de um anticorpo, e (viii) uma região variável de uma cadeia leve deste fragmento scFv, em que os aminoácidos consecutivos que correspondem a (vii) e (viii) são ligados juntos diretamente por uma ligação peptídeo ou por aminoácidos consecutivos que correspondem a um quarto ligador de peptídeo e o fragmento scFv é derivado de um anticorpo que especificamente liga a mesotelina.

Esta invenção ainda provê uma preparação isolada de corpos de inclusão bacterionalmente expressados compreendendo acima de 30 por cento em peso de uma proteína de fusão de acordo com a invenção.

Esta invenção também provê um processo para produzir uma proteína de fusão compreendendo cultivar uma célula transformada compreendendo uma proteína de fusão, de modo que uma proteína de fusão é

expressada, e recuperando uma proteína de fusão assim expressada.

Esta invenção ainda provê um método de seletivamente matar uma célula de tumor que compreende contatar a célula com uma proteína de fusão da invenção em uma quantidade eficaz para iniciar uma resposta imune mediada por CTL contra a célula de tumor de modo a assim matar a célula de tumor.

Finalmente, esta invenção ainda provê um método de tratar uma célula de tumor que expressa mesotelina em sua superfície, que compreende contatar a célula de tumor com uma proteína de fusão de acordo com a invenção em uma quantidade eficaz para iniciar uma resposta imune mediada por CTL contra a célula de tumor para assim tratar a célula de tumor.

Uma molécula exemplar da presente invenção, uma molécula de MHC de cadeia única, composta de β_2 microglobulina fusionada nos domínios $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$ de HLA-A2 via um ligador de peptídeo curto (15 aminoácidos) foi fusionado no scFv SS1 que marca mesotelina. Para construir uma proteína de fusão com peptídeo covalentemente ligado a peptídeo de 9 aminoácidos derivado da proteína CMV pp65 NLVPMVATV (SEQ ID NO: 4) foi fusionado ao N-término da proteína de fusão scHLA-A2/SS1 (scFv) via um ligador de 20 aminoácidos GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 6). A proteína de fusão foi expressada em *E. coli* e moléculas funcionais foram produzidas por reduplicação *in vitro* na presença de CMV/scHLA-A2/SS1 (scFv). Os estudos de citometria de fluxo revelaram a capacidade para decorar células de tumor humano, negativas para HLA-A2, positivas para antígeno, em um modo que foi completamente dependendo da especificidade do fragmento de anticorpo de marcação.

Mais importante, o revestimento mediado por CMV/scHLA-A2/SS1 (scFv) de células de tumor de alvo as tornaram susceptíveis para uma lise mediada por CTL, específica de peptídeo CMV, limitada por HLA-A2 específica e eficiente. Estes resultados demonstraram que a marcação

específica de antígeno de tumor guiada por anticorpo de complexos de MHC-peptídeo sobre as células de tumor pode tornar as mesmas susceptíveis a, e potencializar, a morte de CTL. Esta nova abordagem agora abre o caminho para o desenvolvimento de novas estratégias imunoterapêuticas com base em

5 marcação de anticorpo de ligandos de MHC cognatos naturais e mecanismos citotóxicos com base em CTL.

Em conexão com a presente invenção, uma nova estratégia foi desenvolvida para re-marcar complexos MHC de classe I - peptídeo sobre a superfície de células de tumor em um modo que é independente da extensão

10 de expressão de MHC de classe I pelas células de tumor alvo. Para isto, em uma forma de realização da presente invenção, uma molécula com dois braços foi empregada. Um braço, a porção de marcação, compreende fragmentos recombinantes específicos de tumor de anticorpos dirigidos para antígeno de diferenciação ou de tumor que foram usados durante muitos anos para marcar

15 radioisótopos, toxinas ou fármacos para as células de câncer. O segundo braço efetuator é uma molécula de MHC de cadeia única (scMHC) composta de $\beta 2$ -microglobulina humana ligada aos três domínios extracelulares de cadeia pesada de HLA-A2 (24, 25 WO 01/72768). Por conexão dos genes codificando os dois braços em um gene recombinante único e expressando o

20 gene, a nova molécula é expressada eficientemente em *E. coli* e produzida, por exemplo, por reduplicação *in vitro* na presença de peptídeos HLA-2-CMV. Esta abordagem, como aqui descrito, torna as células de tumor alvo suscetíveis à lise por células T citotóxicas apesar de seu nível de expressão de MHC e assim podem ser empregadas como uma nova abordagem para

25 potencializar a imunidade anti-tumor mediada por TL. Esta nova abordagem irá levar ao desenvolvimento de uma nova classe de agentes terapêuticos recombinantes capazes de matar e eliminar seletivamente as células de tumor usando ligados MHC cognatos naturais e mecanismos citotóxicos com base em CTL.

Breve Descrição dos Desenhos

Figuras 1A-B

Representação esquemática de scHLA-A2/SSl (scFv) e um peptídeo (CMV) /scHLA-A2/SSl (scFv) (Composto A).

5 Figura 1A ilustra o C = término do scHLA-A2 fusionado ao N-término de SSl (scFv) via um ligador de 4 aminoácidos. Figura 1B ilustra que o peptídeo CMV pp65, isto é NLVPMVATV (SEQ ID NO: 4) foi fusionado no N-término do scHLA-A2/SSl (scFv) via um ligador de 20 aminoácidos GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 6).

10 Figura 2

Seqüência de ácido nucleico codificando Composto A (SEQ ID NO:1)

Figuras 3A-B

Expressão e purificação de Composto A.

15 Figura 3A mostra a análise de SDS/PAGE de corpos de inclusão isolados.

Figura 3B mostra a análise de SDS/PAGE de composto A após a purificação em cromatografia de troca iônica.

Figura 4

20 Ligação de composto A a mesotelina recombinante.

Mesotelina foi imobilizada em imuno-placas e ligação dependente da dose de Composto A foi monitorada por mAb W6 de conformação sensível (33,34).

Figuras 5A-D

25 Ligação de composto A a células expressando mesotelina.

Figura 5A-B demonstra a análise de citometria de fluxo da ligação de Composto A a células A431K5 negativas para HLA-A2 e positivas para mesotelina e células A431 negativas para HLA-A2 e negativas para mesotelina. Figura 5A mostra ligação de K1 mAb (31,32) a células A431K5, e

Figura 5B mostra ausência de ligação das K1 mAb a células A431. Figura 5C mostra a ligação de composto A a células A431K5, e Figura 5D mostra ausência de ligação de Composto A a células A431.

A ligação foi monitorada usando anticorpo BB7.2 específico de anti-HLA-A2 (35) e um anticorpo secundário rotulado FITC.

Figuras 6A-B

Potenciação de lise mediada por CTL de células de tumor negativas para HLA-A2 por Composto A. Na Figura 6A, as células A431K5 transfectadas por mesotelina e as células A431 parentais negativas para mesotelina foram incubadas com Composto A (10 µg) e CTLs específicos para CMV em um teste de liberação de metionina [S^{35}]. Figura 6B demonstra a atividade dependente de dose de Composto A quando as células A431K5 transfectadas por mesotelina e as células A431 parentais negativas para mesotelina foram incubadas com concentrações diferentes de Composto A e CTLs específicos para CMV em um teste de liberação de metionina [S^{35}].

Figura 7

Representação esquemática de pep/scHLA-A2/SSI (scFv) (Composto B). No Composto B, o peptídeo NLVPMVATV foi fusionado ao N-término de scHLA-A2/SSI (scFv) via um ligador de 15 aminoácidos GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 8).

Figura 8

Seqüência de ácido nucleico codificando Composto B (SEQ ID NO: 22).

Figuras 9A-B

Expressão e purificação de Composto B.

Figura 9A mostra análise de SDS/PAGE de corpos de inclusão isolados. Figura 9B mostra análise de SDS/PAGE de Composto B após purificação em cromatografia de troca iônica.

Figuras 10A-F

Ligação de Composto B a células expressando mesotelina.

Figuras 10A-F demonstram a análise de citometria de fluxo da ligação de Composto B a células A431K5 negativas para HLA-A2 e positivas para mesotelina e células A431 negativas para HLA-A2 e negativas para mesotelina. Figura 10A mostra ligação de K1 mAb a células A431K5, e Figura 10B mostra falta de ligação de K1 mAb a células A431 (B). Figura 10C mostra a ligação de composto B a células A431K5, e Figura 10D mostra falta de ligação de Composto B a células A431. Figura 10E mostra comparação entre a ligação de Composto A e Composto B a células A431K5, e Figura 10F mostra falta de ligação de Composto A e Composto B a células A431. A ligação foi monitorada usando anticorpo BB7.2 específico de anti-HLA-A2 e um anticorpo secundário rotulado FITC.

Figuras 11A-B

Potenciação de lise mediada por CTL-de células de tumor negativas para HLA-A2 por Composto B.

Na Figura 11A, células A431K5 transfectadas por mesotelina e as células A431 parentais negativas para mesotelina foram incubadas com Composto B (10 µg) e CTLs específicos para CMV- em um [S^{35}] teste de liberação de metionina. Figura 11B demonstra a atividade dependente de dose de composto B, quando células A431K5 transfectadas com mesotelina e as células A431 parentais negativas para mesotelina foram incubadas com concentrações diferentes de Composto A e CTLs específicos para CMV em um teste de liberação de metionina [S^{35}].

Figura 12

Potenciação de lise mediada por CTL de células de tumor negativas para HLA-A2 por Composto B e Composto A. As células A431K5 transfectadas por Mesotelina e as células A431 parentais negativas para mesotelina foram incubadas com concentrações diferentes de Composto B ou Composto A e com CTLs específicos para CMV em um teste de liberação de

metionina[S³⁵]. A figura mostra resultados de incubação de Composto A com células A431K5, incubação de Composto B com células A431K5, incubação de Composto A com células A431, e incubação de Composto B com células A431.

5 Figuras 13A-B

Representação esquemática de scHLA-A2/SS1 (scFv) e M1cov/scHLA-

A2/SS1 (scFv).

Figura 13A mostra C-término do scHLA-A2 fusionado ao N-término de scFv via ligador de 4 aminoácidos. Figura 13B mostra peptídeo M158-66 fusionado ao N-término do scHLA-A2/SS1 (scFv) via um ligador de 15 aminoácidos GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 8).

Figura 14

Seqüência de ácido nucleico codificando a proteína de fusão M1-cov/scHLA-A2/SS1 (scFv) (SEQ ID NO:23).

Figuras 15A-B

Expressão e purificação da proteína de fusão M1-cov/scHLA-A2/SS1 (scFv).

Figura 15A mostra a análise de SDS/PAGE de corpos de inclusão isolados. Figura 15B mostra a análise de SDS/PAGE de proteína de fusão M1-cov/scHLA-A2/SS1 (scFv) após purificação em cromatografia de troca iônica. Em

Figura 16

Ligação da proteína de fusão M1-cov/scHLA-A2/SS1 (scFv) para Mesotelina recombinante. Mesotelina foi imobilizada sobre placas imuno e ligação dependente de dose de M1-cov/scHL-A-A2/SS1 (scFv) foi monitorada por mAb sensível à conformação (W6).

Figuras 17A-D

Ligação de proteína de fusão M1-cov/scHI_A-A2/SS1 (scFv) a

células expressando Mesotelina. Figuras 17A-D mostram análise de citometria de fluxo de ligação de M1-cov/scHLA-A2/SS1 (scFv) para células A431K5 positivas para mesotelina negativas para HLA- A2- e células A431 negativas para mesotelina e negativas para HLA-A2. Figura 17A mostra
5 ligação de K1 mAb a células A431K5, e Figura 17B mostra ausência de ligação de K1 mAb para células A431. Figura 17C mostra ligação de proteína de fusão M1-cov/scHLA-A2/SS1 (scFv) para células A431K5, e Figura 17D mostra ausência de ligação de proteína de fusão M1-cov/scHLA-A2/SS1 (scFv) a células A431. A ligação foi monitorada usando anticorpo BB7.2
10 específico anti-HYLA_A2 e um anticorpo secundário rotulado FITC.

Figura 18

Potenciação de lise mediada por CTL de células de tumor negativas para HLA-A2 por proteína de fusão M1-cov/scHLA-A2/SS1 (scFv). células A431K5 transfectadas por mesotelina e células A431 parentais
15 negativas para mesotelina foram incubadas com concentração diferente de M1-cov/scHLA-A2/SS1 (scFv) e com CTLs limitados em HLA-A2 específicos para M1 em um teste de liberação de metionina [S^{35}].

Descrição Detalhada da Invenção

Esta invenção provê uma proteína de fusão compreendendo
20 aminoácidos consecutivos que, começando no término amino da proteína, correspondem aminoácidos consecutivos presentes em (i) um peptídeo limitado a MHC de citomegalovírus humano, (ii) um primeiro ligador de peptídeo, (iii) uma β -2 microglobulina humana, (iv) um segundo ligador de peptídeo, (v) uma cadeia HLA-A2 de uma molécula de MHC de classe I
25 humana, (vi) um terceiro ligador de peptídeo, (vii) uma região variável de uma cadeia pesada de um fragmento scFv de um anticorpo, e (viii) uma região variável de uma cadeia leve deste fragmento scFv, em que os aminoácidos consecutivos que correspondem a (vii) e (viii) são ligados juntos diretamente por uma ligação peptídeo ou por aminoácidos consecutivos que correspondem

a um quarto ligador de peptídeo e o fragmento scFv é derivado de um anticorpo que especificamente liga a mesotelina. Em uma forma de realização, o primeiro ligador de peptídeo tem a seqüência de aminoácido GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 6). Em outra forma de
 5 realização, o segundo ligador de peptídeo tem a seqüência de aminoácido GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 8). Em outra forma de realização, o terceiro ligador de peptídeo tem a seqüência de aminoácido ASGG (SEQ ID NO: 10). Em outra forma de realização, o quarto ligador de peptídeo tem a seqüência de aminoácido GVGGS GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 19). Em
 10 outra forma de realização, o peptídeo limitado a MHC de citomegalovírus humano tem a seqüência de aminoácido NLVPMVATV (SEQ ID NO: 4).

Como usado aqui, "primeiro ligador de peptídeo", "segundo ligador de peptídeo" e "quarto ligador de peptídeo" referem-se a peptídeos compostos de um peptídeo monomérico cuja seqüência de aminoácido é
 15 GXGGS (SEQ ID NO: 20) ou um multímero do mesmo, em que X pode ser qualquer aminoácido. Estes ligadores de peptídeos podem ser um multímero de 2-10 deste peptídeo monomérico. Em qualquer tal multímero, cada peptídeo monomérico pode ser igual ou diferente de outro peptídeo monomérico no multímero dependendo da identidade de aminoácido X. Em
 20 uma forma de realização, X no peptídeo monomérico é o aminoácido valina (V). Em outra forma de realização, X no peptídeo monomérico é o aminoácido glicina. (G). Em formas de realização atualmente preferidas, o ligador de peptídeo compreende um multímero de três ou quatro peptídeo monoméricos, particularmente um multímero de três peptídeos monoméricos
 25 em que o X o mais N-terminal é o aminoácido V, e o segundo e terceiro X são o aminoácido G.

Em uma forma de realização, a seqüência dos aminoácidos consecutivos correspondendo a (vii), seguido pelo quarto ligador de peptídeo, seguido por (viii) é especificada em SEQ ID NO: 12.

Em outra forma de realização, os aminoácidos consecutivos de uma proteína de fusão, Composto A, têm uma sequência de aminoácido especificada em SEQ ID NO: 2.

Esta invenção também provê uma composição compreendendo uma proteína de fusão de acordo com a invenção e um veículo. Em uma forma de realização, a proteína de fusão está presente na composição em uma quantidade terapeuticamente eficaz e o veículo é um veículo farmaceuticamente aceitável.

Esta invenção também provê uma construção de ácido nucleico codificando uma proteína de fusão compreendendo aminoácidos consecutivos que, começando no término amino da proteína, correspondem a aminoácidos consecutivos presentes em (i) um peptídeo limitado a MHC de citomegalovírus humano, (ii) um primeiro ligador de peptídeo, (iii) uma β -2 microglobulina humana, (iv) um segundo ligador de peptídeo, (v) uma cadeia HL.A-A2 de uma molécula de MHC de classe humana, (vi) um terceiro ligador de peptídeo, (vii) uma região variável de uma cadeia pesada de um fragmento scFv de um anticorpo, e (viii) uma região variável de uma cadeia leve deste fragmento de scFv, em que os aminoácidos consecutivos que correspondem a (vii) e (viii) estão ligados juntos diretamente por uma ligação peptídeo ou por aminoácidos consecutivos que correspondem a um quarto ligador de peptídeo e o fragmento scFv é derivado de um anticorpo que especificamente liga a mesotelina. Em uma forma de realização, a construção de ácido nucleico tem a sequência de ácido nucleico especificada em SEQ ID NO:1.

Esta invenção também provê um vetor compreendendo a construção de ácido nucleico da invenção. Exemplos destes vetores são plasmídeos, vírus, fagos e semelhantes.

Esta invenção ainda provê um vetor de expressão compreendendo a construção de ácido nucleico da invenção e um promotor

ligado operativamente à mesma.

Esta invenção também provê uma célula transformada compreendendo um vetor de acordo com a invenção. A célula transformada pode ser uma célula eucariótica, por exemplo uma selecionada dentre o grupo consistindo de uma célula de mamífero, uma célula de inseto, uma célula de planta, uma célula de levedura, e uma célula de protozoário. Alternativamente, a célula transformada pode ser uma célula bacteriana.

Esta invenção provê uma preparação isolada de corpos de inclusão expressados bacterionalmente, compreendendo acima de 30 por cento em peso de uma proteína de fusão de acordo com a invenção.

Esta invenção também provê um processo para produzir uma proteína de fusão compreendendo cultivar a célula transformada da invenção de modo que uma proteína de fusão é expressada, e recuperando uma proteína de fusão assim expressada. Em uma forma de realização, a recuperação de uma proteína de fusão compreende submeter a proteína de fusão expressada a cromatografia de exclusão de tamanho. Em outra forma de realização, a proteína de fusão é expressada em corpos de inclusão. Em uma forma de realização, o processo ainda compreende tratar os corpos de inclusão de modo a separar e a reduplicar a proteína de fusão e assim produzir uma proteína de fusão em uma forma ativa. Em outra forma de realização, o tratamento dos corpos de inclusão para separar a proteína de fusão do mesmo compreende contatar os corpos de inclusão com um agente desnaturante.

Como usado aqui, uma "forma ativa" de uma proteína de fusão significa uma conformação tri- dimensional de uma proteína de fusão que permite à proteína de fusão ligar especificamente a mesotelina quando a mesotelina está presente sobre a superfície de uma célula de tumor..

Esta invenção também provê um método de seletivamente matar uma célula de tumor, que compreende contatar a célula com uma proteína de fusão da invenção em uma quantidade eficaz para iniciar uma

resposta imune mediada por CTL contra a célula de tumor para assim matar a célula de tumor. Em uma forma de realização, a célula de tumor está em um paciente e o contato é efetuado por administração de uma proteína de fusão ao paciente.

5 Esta invenção ainda provê um método de tratar uma célula de tumor que expressa mesotelina em sua superfície, que compreende contatar a célula de tumor com uma proteína de fusão de acordo com a invenção em uma quantidade eficaz para iniciar a resposta imune mediada por CTL contra a célula de tumor para assim tratar a célula de tumor. Em uma forma de
10 realização, a célula de tumor está presente em um tumor sólido. Em outra forma de realização, o tumor sólido é um tumor associado com câncer ovariano, pulmão, pancreático ou cabeça/pescoço, ou mesotelioma.

 A presente invenção provê (i) novas proteínas de fusão; (ii) processos de preparar as mesmas (iii) construção de ácido nucleicos
15 codificando as mesmas, e (iv) métodos de usar as mesmas para matar seletivamente as células, particularmente células de câncer.

Os princípios e operação da presente invenção podem ser melhor entendidos com referência às figuras e descrição especificada aqui abaixo.

20 Será entendido que a invenção não é limitada em sua aplicação aos detalhes especificados na descrição ou como exemplificados. A invenção engloba outras formas de realização e é capaz de ser praticada ou realizada em vários modos. Também, deve-se entender que a fraseologia e terminologia empregadas aqui é para o fim de descrição e não devem ser considerados
25 como limitativos.

A progressão do tumor é com freqüência associada com a secreção de fatores imune-supressivos e/ou a regulação negativa de funções de apresentação de antígeno MHC de classe I (2). Mesmo quando uma resposta de CTL específica é demonstrada em pacientes, esta resposta é baixa

porque a população CTL anti-tumor é rara, muito não freqüente, e em alguns casos os CLTS não são funcionais ou anérgicos (26). Além disso, é bem estabelecido que o número de complexos MHC- peptídeo na superfície das células de tumor que apresentam um peptídeo associado com tumor particular é baixo (27). O progresso significativo para o desenvolvimento de vacinas que podem estimular uma resposta imune contra tumores tem envolvido a identificação dos antígenos de proteína associados com um dado tipo de tumor e mapeamento de epítomos de antígenos de tumor para motivos de ligação restringidos a MHC de classe I e classe II foram identificados e estão sendo atualmente usados em vários programas de vacinação (14, 11, 8). As moléculas de MHC de classe I apresentando os peptídeos apropriados são necessárias para prover os sinais específicos para reconhecimento e morte por CTLs. No entanto, o mecanismo principal de escape de tumor é a perda, regulação negativa ou alteração de perfis de HLA que podem tornar a célula alvo não responsiva a lise de CTL, mesmo se a célula expressar o antígeno de tumor apropriado.

A presente invenção provê uma nova abordagem para superar este problema. Enquanto se reduz a presente invenção à prática, a marcação específica de tumor de complexos de MHC de classe I -peptídeo em células de tumor foi mostrada como sendo uma estratégia eficaz e eficiente para tornar as células negativas para HLA- A2 suscetíveis à lise por CTLs limitados em HLA-A2 relevantes. Esta nova estratégia de redirecionar CTLs contra as células de tumor toma vantagem do uso de fragmento de anticorpo recombinante anti- mesotelina e ligando de CMV que podem localizar em células malignas que expressam um tumor com um grau relativamente elevado de especificidade.

O fragmento de marcação de anticorpo anti - mesotelina e ligando CMV são fusionados a uma molécula HLA-A2 de cadeia única que pode ser duplicada de modo eficiente e funcional.

Os resultados aqui apresentados provêem uma demonstração clara da utilidade da abordagem da presente invenção para recrutar CTLs ativos para a morte de célula de tumor via anticorpo específico para câncer ou ligando guiado marcando os complexos scMHC- peptídeo. Estes resultados
5 pavimentam a via para o desenvolvimento de nova abordagem imuno terapêutica com base em respostas imunes celulares de ocorrência natural que são redirecionadas contra as células de tumor.

Será notado que a proteína de fusão da presente invenção ou porções da mesma pode ser preparada por vários modos, incluindo síntese de
10 proteína em fase sólida. NO entanto, na forma de realização preferida da invenção, pelo menos porções principais das moléculas, por exemplo o domínio scHLA-A2 (com ou sem o peptídeo CMV) e o domínio scFV são gerados por tradução de uma construção de ácido nucleico respectiva ou construções codificando a molécula.

Assim, uma a três matrizes de leitura aberta são requeridas
15 para sintetizar as moléculas da figura 1B via tradução. Estas matrizes de leitura aberta podem residir em uma única, duas ou três moléculas de ácido nucléico. Assim por exemplo, uma construção de ácido nucleico única pode transportar uma duas ou todas as três matrizes de leitura aberta. Uma a três
20 seqüências regulatórias cis-atuantes podem ser usadas para controlar a expressão de uma a três matrizes de leitura aberta. Por exemplo, uma única seqüência regulatória cis-atuante pode controlar a expressão de uma, duas ou três, matrizes de leitura aberta em um modo de tipo cistrone. Na alternativa, três seqüências regulatórias cis-atuantes independentes podem ser usadas para
25 controlar a expressão das três matrizes de leitura aberta. Outras combinações são também visadas.

As matrizes de leitura aberta e as seqüências regulatórias cis-atuantes podem ser transportadas por uma a três moléculas de ácido nucléico. Por exemplo, cada matriz de leitura aberta e sua seqüência regulatória cis-

atuante são transportadas por uma molécula de ácido nucleico diferente, ou todas as matrizes de leitura aberta e suas seqüências regulatórias cis-atuantes associadas são transportadas por uma única molécula de ácido nucléico. Outras combinações são também visadas.

5 A expressão da proteína de fusão pode ser efetuada por transformação/transfecção e/ou co-transformação/co- transfecção de uma célula única ou uma pluralidade de células com qualquer uma das moléculas de ácido nucléico, servindo como vetores de transformação/transfecção (por exemplo, como plasmídeos, fagos, fagemídeos ou vírus).

10 Será notado que uma proteína de fusão cuja seqüência de aminoácido é especificada em SEQ ID NO: 2 e inclui o aminoácido N-terminal metionina, representa do mesmo modo uma proteína de fusão como expressada em uma célula bacteriana. Dependendo da célula bacteriana específica empregada par expressar a proteína de fusão, a metionina N-terminal pode ser clivada e removida. Conseqüentemente, é contemplado que
15 as proteínas de fusão de acordo com esta invenção engloba ambas as com, como as sem, uma metionina N-terminal. Em geral, quando uma proteína de fusão de acordo com a invenção é expressada em uma célula eucariótica, ela iria falta a metionina N-terminal. Assim, deve ser apreciado que a seqüência
20 de aminoácido de proteínas de fusão expressadas de acordo com a invenção pode incluir ou não incluir esta metionina N-terminal dependendo do tipo de células em que as proteínas são expressadas.

 Sempre e onde que é usado, o peptídeo ligador é selecionado dentre uma seqüência de aminoácido que é inerentemente flexível, de modo
25 que os polipeptídeos conectados assim independentemente e nativamente duplicam após a expressão dos mesmos, assim facilitando a formação de um complexo β_2 M/HLA humano de cadeia única (sc), funcional ou ativo, marcação de anticorpo ou completo de antígeno limitado em -CMV β_2 M/HLA humano.

Qualquer uma das construções de ácido nucleico descritas aqui compreende pelo menos uma sequência regulatória cis-atuante ligada operativamente aos polinucleotídeos de codificação aqui. Preferivelmente, a sequência regulatória cis-atuante é funcional em bactérias. Alternativamente, a sequência regulatória cis-atuante é funcional em levedura. Ainda alternativamente, a sequência regulatória cis-atuante é funcional em células de animais. Ainda alternativamente, a sequência regulatória cis-atuante é funcional em células de plantas.

A sequência regulatória cis-atuante pode incluir uma sequência de promotor e sequências de melhorador translacional ou transcripcional adicionais todas das mesmas servindo para facilitar a expressão dos polinucleotídeos quando introduzidos em uma célula hospedeira. Os exemplos específicos de promotores são descritos abaixo em contexto de vários sistemas de expressão eucarióticos e procarióticos e na seção de exemplo que se segue.

Será notado que uma única sequência regulatória cis-atuante pode ser usada em uma construção de ácido nucleico para dirigir a transcrição de um único transcrito que inclui uma ou mais matrizes de leitura aberta. No último caso, um sítio de entrada de ribossoma interno (IRES) pode ser usado de modo a permitir a tradução da sequência de ácido nucleico internamente posicionada.

Sempre que a co-expressão de polipeptídeos independentes em uma célula única for escolhida, a construção ou construções empregadas devem ser configuradas de modo que os níveis de expressão dos polipeptídeos independentes são otimizados, de modo a obter proporções maiores de produto final.

Preferivelmente, um promotor (sendo um exemplo de uma sequência regulatória cis-atuante) utilizado pela construção(ões) de ácido nucleico da presente invenção é um promotor constitutivo forte como que

níveis elevados de expressão são atingidos para os polinucleotídeos após a transformação da célula hospedeira.

Será notado que níveis elevados de expressão também podem ser efetuados por transformação da célula hospedeira com um número de cópias elevado de construção (ões) de ácido nucleico, ou por utilização de seqüências cis-atuantes que estabilizam o transcrito resultante e como tal diminuem a degradação ou viragem de tal transcrito.

Como usado aqui, a expressão "célula transformada" descreve uma célula em que uma seqüência de ácido nucleico exógena é introduzida para assim alterar geneticamente de modo estável ou transiente a célula hospedeira. Pode ocorrer sob condições naturais ou artificiais usando vários métodos bem conhecidos na técnica, alguns dos quais são descritos em detalhes abaixo no contexto com exemplos específicos de células hospedeiras.

A célula transformada hospedeira pode ser uma célula procariótica, como por exemplo, uma célula de mamífero, uma célula de inseto, uma célula de planta, uma célula de levedura, e uma célula de protozoário, ou alternativamente, a célula pode ser uma célula bacteriana.

Quando utilizada para expressão de célula hospedeira procariótica, a construção (ões) de acordo com a presente invenção podem ser um vetor bidirecional, que pode propagar tanto em *E. coli* (em que a construção kp um marcador selecionável apropriado e origem de replicação) e pode ser compatível para expressão em células hospedeiras eucarióticas. A construção (ões) de ácido nucleico de acordo com a presente invenção pode(m) ser por exemplo um plasmídeo um bacmídeo, um fagemídeo, um cosmídeo, um fago, um vírus ou um cromossomo artificial.

Os sistemas de expressão de mamíferos apropriados incluem, mas não são limitados a pcDNA3, pcDNA3.1 (+/-), pZeoSV2 (+/-), pSecTag2, pDisplay, pEF/myc/cyto, pCMV/myc/cyto, pCR3.1, que são disponíveis de Invitrogen™ Corporation (Carlsbad, CA USA), pCI que é

disponível de Promega™ Corporation (Madison WI USA), pBK-RSV e pBK-CMV que são disponíveis de Stratagene" (La Jolla, CA USA), pTRES que é disponível de Clontech Laboratories, Inc. (Mountain View, CA USA), e seus derivados.

5 As culturas de células de insetos também podem ser usadas para expressar as seqüências de ácido nucleico da presente invenção. Os sistemas de expressão de insetos apropriados incluem, mas não são limitados a sistema de expressão de baculovírus e seus derivados que são comercialmente disponíveis de numerosos fornecedores como maxBac™
10 (Invitrogen™ Corporation, Carlsbad, CA USA) BacPak™ (Clontech^(R) Laboratories, Inc. Mountain View, CA USA), ou Bac-to-Bac™ (Invitrogen™/Gibco^(R), Carlsbad, CA USA).

 A expressão das seqüências de ácido nucleico da presente invenção também pode ser afetada em células de plantas. Como usado aqui, a
15 expressão "célula de planta" pode fazer referência a protoplastos de plantas, células de uma cultura de tecido de planta, células de tecidos derivados de plantas ou células de plantas completas.

 Existem vários métodos de introdução de construções de ácido nucleico em células de plantas. Estes métodos baseiam-se em ou integração
20 estável da construção de ácido nucleico ou uma porção da mesma no genoma da célula da planta, ou em expressão transiente de construção de ácido nucleico em cujo caso estas seqüências não são estavelmente integradas no genoma da célula da planta.

 Existem dois métodos principais de efetuar a integração
25 genômica estável de seqüências de ácido nucleico exógenas como as incluídas dentro da construção de ácido nucleico da presente invenção em genomas de células de plantas:

(i) transferência mediada por *Agrobacterium*: Klee et al. (1987) Annu. Rev. Plant Physiol. 38:467-486; Klee e Rogers in Cell Culture

and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol. 6, Molecular Biology of Plant Nuclear Genes, eds. Schell, J., e Vasil, L. K., Academic Publishers, San Diego, Calif. (1989) p. 2-25; Gatenby, in Plant Biotechnology, eds. Kung, S. e Arntzen, C. J., Butterworth Publishers, Boston, Mass. (1989) p. 93-112.

- 5 (ii) absorção de DNA direta: Paszkowski et al., in Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol. 6, Molecular Biology of Plant Nuclear Genes eds. Schell, J., e Vasil, L. K., Academic Publishers, San Diego, Calif. (1989) p. 52-68; incluindo métodos para a absorção direta de DNA em protoplastos, Toriyama, K. et al. (1988) Bio/Technology 6:1072-1074. DNA uptake induced by brief electric shock of plant cells: Zhang et al. Plant Cell Rep. (1988) 7:379-384. Fromm et al. Nature (1986) 319:791-793. DNA injection into plant cells ou tissues by particle bombardment, Klein et al. Bio/Technology (1988) 6:559-563; McCabe et al. Bio/Technology (1988) 6:923-926; Sanford, Physiol. Plant. (1990) 79:206-209; pelo uso de sistemas de micropipeta: Neuhaus et al., Theor. Appl. Genet. (1987) 75:30-36; Neuhaus e Spangenberg, Physiol. Plant. (1990) 79:213-217; ou pela incubação direta de DNA com pólen germinante, DeWet et al. em Experimental Manipulation of Ovule Tissue, eds. Chapman, G. P. e Mantell, S. H. e Daniels, W. Longman, London, (1985) p. 197-209; e Ohta, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1986) 83:715-719.

O sistema de *Agrobacterium* inclui o uso de vetores de plasmídeo que contém segmentos de DNA definidos que integram no DNA genômico da planta. Os métodos de inoculação do tecido de planta variam dependendo da espécie de planta e o sistema de distribuição de *Agrobacterium*. Uma abordagem amplamente usada é o procedimento de disco de folha, ver, por exemplo, Horsch et al. in Plant Molecular Biology Manual A5, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (1988) p. 1-9. Uma abordagem suplementar empregada o sistema de distribuição de *Agrobacterium* em combinação com infiltração a vácuo. O sistema de

Agrobacterium é especialmente viável na criação de plantas dicotiledôneas estavelmente transformadas.

Existem vários métodos de transferência de DNA direta em células de plantas. Em eletroporação, os protoplastos são brevemente expostos a um campo elétrico forte. Em micro-injeção, o DNA é mecanicamente injetado diretamente nas células usando micropipetas muito pequenas.

No bombardeio de micropartículas, o DNA é adsorvido em microprojéteis como cristais de sulfato de magnésio, partículas de tungstênio ou partículas de ouro, e os microprojéteis são fisicamente acelerados em células ou tecidos de plantas. A transferência de DNA direta também pode ser usada para transformar transientemente células de plantas.

Em qualquer caso, promotores de plantas apropriados que podem ser usados para expressão de células de plantas das primeira e segunda seqüências de ácido nucleico incluem, mas não são limitados ao promotor CaMV 35S, promotor de ubiquitina, e outros promotores fortes que podem expressar as seqüências de ácido nucleico em um modo constitutivo ou específico de tecido.

Os vírus de plantas também podem ser usados como vetores de transformação. Os vírus que foram mostrados como úteis para a transformação de células hospedeiras de plantas incluem CaV, TMV e BV. A transformação de plantas usando vírus de plantas é descrita em Pat. U.S. No. 4.855.237 (BGV), EP- A 67,553 (TMV), Pedido publicado japonês No. 63-14693 (TMV), EPA 194,809 (BV), EPA 278,667 (BV); e Gluzman, Y. et al., Communications in Molecular Biology: Viral Vectors, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp. 172-189 (1988). Partículas de pseudovírus para uso na expressão de DNA estranho em muitos hospedeiros, incluindo plantas, são descritas em WO 87/06261.

A construção de vírus de RNA de plantas para a introdução e

expressão de seqüências de ácido nucleico exógenas não virais em plantas é demonstrada pelas referências acima assim como por Dawson, W. O. et al., Virology (1989) 172:285-292; Takamatsu et al. EMBO J. (1987) 6:307-311; French et al. Science (1986) 231:1294-1297; e Takamatsu et al. FEBS Letters (1990) 269:73-76.

Quando o vírus é um vírus de DNA, as construções podem ser feitas no próprio vírus. Alternativamente, o vírus pode ser primeiro clonado em um plasmídeo bacteriano para facilidade de construção de vetor viral desejado com as seqüências de ácido nucleico descritas acima. O vírus pode ser então excisado do plasmídeo. Se o vírus for um vírus de DNA, uma origem de replicação bacteriana pode ser fixada ao DNA viral., que é então replicado pelas bactérias. A transcrição e a tradução deste DNA irá produzir a proteína de revestimento que irá encapsidar o DNA viral. Se o vírus for um vírus de RNA, o vírus é geralmente clonado como um cDNA e inserido em um plasmídeo. O plasmídeo é então usado para fazer todas as construções. O vírus de RNA é então produzido por transcrição da seqüência viral do plasmídeo e tradução dos genes virais para produzir a proteína (s) de revestimento que encapsida o RNA viral.

A construção de vírus de RNA de planta para a introdução e expressão em plantas de seqüências de ácido nucleico exógenos não virais como os incluídos na construção da presente invenção é demonstrada pelas referências acima assim como patente US 5 316 931.

As células de levedura também podem ser usadas como células hospedeiras pela presente invenção. Exemplos numerosos de vetores de expressão de levedura apropriados para expressão das seqüências de ácido nucleico da presente invenção em levedura são bem conhecidos na técnica e são comercialmente disponíveis. Estes vetores são geralmente introduzidos em uma célula hospedeira de levedura via métodos de transformação química ou eletroporação bem conhecidos na técnica. Os sistemas comercialmente

disponíveis incluem, por exemplo, os sistemas de expressão pYES™ (Invitrogen™ Corporation, Carlsbad CA, USA) ou o YEX™ (Clontech* Laboratories, Mountain View, CA USA).

Será notado que quando expressada em sistemas de expressão eucarióticos como os descritos acima, a construção de ácido nucleico preferivelmente inclui uma sequência codificando peptídeo de sinal como os polipeptídeos produzidos das primeira e segunda sequências de ácido nucleico são dirigidas via o peptídeo de sinal fixado em vias de secreção. Por exemplo, em células hospedeiras de mamíferos, insetos e levedura, os polipeptídeos expressados podem ser secretados para o meio de crescimento, enquanto em sistemas de expressão de plantas, os polipeptídeos podem ser secretados no apoplasto, ou dirigidos em um organelo subcelular.

Um hospedeiro bacteriano pode ser transformado com a sequência de ácido nucleico via métodos de transformação bem conhecidos, incluindo por exemplo transformação química (por exemplo CaCl_2) ou eletroporação.

Numerosos exemplos de sistemas de expressão bacterianos que podem ser usados para expressar as sequências de ácido nucleico da presente invenção são bem conhecidos na técnica. Os sistemas de expressão bacterianos comercialmente disponíveis incluem, mas não são limitados a sistema de expressão pET™ (Novagen^(R), EMB Biosciences, San Diego, CA USA), sistema de expressão pSET™ (Invitrogen™ Corporation, Carlsbad CA, USA) ou o sistema de expressão pGEX™ (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ USA).

Como é ainda descrito na seção de Detalhes Experimentais que se seguem, a expressão bacteriana é particularmente vantajosa porque os polipeptídeos expressados formam corpos de inclusão substancialmente puros prontamente levando à recuperação e purificação do polipeptídeo expressado.

Assim, esta invenção provê uma preparação de corpos de

inclusão expressados bacterianos, que são compostos de acima de 30%, preferivelmente acima de 50%, mais preferivelmente acima de 75%, o mais preferivelmente acima de 90 % em peso de proteína de fusão ou uma mistura de proteínas de fusão da presente invenção. O isolamento destes corpos de
5 inclusão e a purificação da(s) proteína (s) de fusão a partir dos mesmos são descritos em detalhes na seção de Detalhes Experimentais que se segue. A expressão bacteriana da(s) proteína (s) de fusão pode prover quantidades elevadas de formas puras e ativas de proteínas de fusão.

Como é ainda descrito na seção de Detalhes Experimentais que
10 segue, as proteínas de fusão expressadas formam corpos de inclusão substancialmente puros que são prontamente isolados por técnicas de fracionamento bem conhecidas na técnica e purificadas via por exemplo etapas de desnaturação - renaturação.

As proteínas de fusão da invenção podem ser renaturadas e
15 reduplicadas na presença de um peptídeo limitado a MHC, que é ou ligado a, co-expressado com ou misturado com outros polipeptídeos da invenção e sendo capaz de ligar o polipeptídeo de MHC de classe I de cadeia única. Com é ainda descrito na seção de exemplos, isto permite gerar um complexo peptídeo antigênico - MHC de classe I substancialmente puro que pode ser
20 ainda purificado via cromatografia de exclusão de tamanho.

Será notado que o peptídeo CMV usado para a reduplicação pode ser co-expressado junto com (com um peptídeo independente) ou ser fusionado à cadeia scHLA-A2 da molécula MHC de classe I nas bactérias. Em tal caso, a proteína de fusão expressada e peptídeo co-formam corpos de
25 inclusão que podem ser isolados e usados para formação de complexo peptídeo antigênico - MHC de classe I.

A seguinte seção provê exemplos específicos para cada um dos vários aspectos da invenção aqui descrita. Estes exemplos não devem ser considerados como limitando em qualquer modo, como a invenção pode ser

praticada em modos similares, ainda um pouco diferentes. Estes exemplos, no entanto, ensinam a um versado na técnica como praticar várias alternativas e formas de realização da invenção.

Em geral, a nomenclatura usada aqui e os procedimentos de laboratório usados na presente invenção incluem técnicas de DNA moleculares, bioquímicas, microbiológicas e recombinantes. Estas técnicas são completamente explicada na literatura. Ver, por exemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al, (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); metodologias como especificado em patentes US Nos. 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 e 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volumes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Culture of Animal Cells- A Manual of Basic Technique" por Freshney, wiley-Liss, N. Y. (1994), 3a. ed.; "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8a. ed), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994),- Mishell e Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman e Co., New York (1980); imunotestes disponíveis são extensivamente descritos na literatura científica e de patentes, ver por exemplo, patentes US Nos. 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 e 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., e Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., e Higgins S. J., eds. (1984);

"Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) e "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification e Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); todos sendo incorporados aqui por referência como se completamente especificados. Outras referências gerais são providas em todo este documento. Os procedimentos aqui são bem conhecidos na técnica, como se acredita, e são providos para a conveniência do leitor. Toda a informação aqui contida é incorporada aqui por referência.

Detalhes Experimentais

Materiais e Métodos:

Clonagem de Composto A

O SCHLA-A2/SS1 (scFv) foi construído como previamente descrito por ligação do C-término de scHLA-A2 ao N-término do SS1 scFv via um ligador curto ASGG (SEQ ID NO: 4) (15). Para construir o scHLA-A2/SS1 (scFv) com peptídeo covalentemente ligado limitado em MHC, o peptídeo limitado em MHC foi fusionado com o ligador de peptídeo GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 6) no N-término da molécula de scHLA-A2/SS1 (scFv) por uma reação de extensão de sobreposição PCR com os iniciadores: 5' M1-5'GGAAGCGTTGGCGCATATGGGCATTCTGGGCTTCGTGTTTACC CTGGGCGGAGGAGGATCCGGTGGCGGAGGTTCAGGAGGCGGTGG ATCGATCCAGCGTACTCCAAAG3' (SEQ ID NO: 13) e 3'VLscSS1-5'GCAGTAAGGAATTCTCATTATTTTATTTCCAACCTTTGTS' (SEQ ID NO: 14). No iniciador 5'M1, uma mutação silente foi inserida na seqüência do ligador, esta mudança na seqüência cria um sítio de restrição BamH1.

Os produtos de PCR foram subclonados em vetor de clonagem

detA (pGEM-T Easy Vector, Promega™ Corporation, Madison, WI USA) e subsequentemente em um vetor de expressão à base do promotor T7 (PRB) usando os sítios de restrição NdeI e EcoRI.

Para gerar o Composto A, M1/scHLA-A2/SSI (scFv) foi usado como um gabarito para ligação com iniciador dsDNA. O M1/scHLA-A2/SSI (scPv) (em plasmídeo PRB) foi digerido com NdeI e BamHI, e a fração do plasmídeo foi ligada ao iniciador dsDNA contendo a sequência de peptídeo CMV e a extensão da sequência de ligador 5' CMVcovLL (cassete): 5' TATGAACCTGGTGCCGATGGTCGCGACCGT
 10 TGGAGGTGGCGGTTCTGGCGGAGGAG-3' (SEQ ID NO: 15) e 3' CMVcovLL (cassete): 5' GATC CTCCTCCGCCAGAACCGCCACCTCCAACGGTCGCGACCATCGGCA CCAGGTTCA 3' (SEQ ID NO: 16). O anelamento dos iniciadores (5' CMVcovLL (cassete) e 3' CMVcovLL (cassete)) foi realizado por incubação dos iniciadores a 95°C por 2 min seguido por 1 hora de incubação em temperatura ambiente. O produto de ligação foi transformado em DH5α de E- coli para amplificação do plasmídeo. O plasmídeo foi purificado por kit QIAGEN® miniprep (Qiagen*, Inc., Valencia, CA USA) e as amostras foram colocadas para análise de sequência.

20 **Reduplicação da expressão e purificação de composto A**

Composto A foi expressado em células LB21 (λDE3) de E-coli (Novagen*, Madison, WI USA) como corpos de inclusão. A construção de Composto A foi transformada em células de E-coli por choque térmico, células foram colocadas em placas LBAMP e incubadas durante a noite a 25 37°C. Colônias foram transferidas para meio rico (super caldo) suplementado com glicose, MgSO₄, AMP e sais. As células foram cultivadas a DO=2 (600 nm) a 37°C, induzidas com IPTG (concentração final 1mM) e incubadas por mais 3 h a 37°C.

Corpos de inclusão foram purificados do grânulo de células

por ruptura das células com 0,2 mg/ml de lisozima seguido pela adição de 2,5% Triton® X-100 (Octilfenolpoli [etilenoglicol éter] x, Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Mannheim, Alemanha) e 0,5M NaCl. Os grânulos dos corpos de inclusão foram coletados por centrifugação (13,000 rpm, 60 min a 4°C) e lavados três vezes com 50 mM tampão Tris r pH 7,4 contendo 20 mM EDTA. Os corpos de inclusão isolados e purificados foram solubilizados em 6M Guanidina HCl pH 7,4, seguido por redução com 65-mM DTE. Os corpos de inclusão solubilizados e reduzidos foram reduplicados por uma diluição de 1:100 em um sistema de tampão redox-embaralhamento, contendo 0,1-M Tris, 0,001M EDTA, 0,5-M 5 Arginina, e 0,09-mM Glutathione oxidada, pH 9, e incubação a 10 °C durante 24 h. Após ter sido reduplicada a proteína foi dialisada contra 150-mM Uréia, 20-mM Tris, pH 8, seguido por purificação do Composto A solúvel por cromatografia de troca iônica em uma coluna Q- Sepharose® (7,5 mm I.D 60 cm) (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, 0 MO USA), aplicando um gradiente de sal (NaCl). As frações de pico contendo Composto A foram então submetidas a uma troca de tampão com PBS.

Clonagem de Composto B

O scHLA-A2/SS1 (scFv) foi construído como previamente descrito por ligação do C-término de scHLA-A2 ao N-término do SS1 scFv via um ligador curto ASGG (SEQ ID NO: 15). Para construir o SCHLA-A2/SS1 (scFv) com peptídeo covalentemente ligado limitado em MHC, o peptídeo limitado em MHC e o ligador de peptídeo GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 8) foram fusionados no N -término da molécula scHLA-A2/SS1 (scFv) por uma reação de extensão de sobreposição de PCR com os iniciadores 5' -Nde-209B2M: 5 ' GGAAGCGTTGGCGCATAT GATCAT GGACCAGGTTCCGTTCTCTGTTGGCGAGGAGGGTCCGGTGGCGGA GGTTCAGGAGGCGGTGGATCGATCCAGCGTACTCCAAAG3 ' (SEQ ID NO: 17) e o 3'VLscSS1- 5' GCAGTAAGG AATTCTCAT

TATTTTATTTCCAAC TTTGT3 ' (SEQ ID NO: 18). A molécula 209cov/scHLA-A2/SS1 (scFv) foi usada como um gabarito para a construção de Composto B. Nesta molécula, o peptídeo CMV NLVPMVATV (SEQ ID NO: 4) foi introduzido na sequência 209cov/scHLA-A2/SS1 (scFv) (trocando o 209 peptídeo) por reação PCR usando os iniciadores 5 ' GGAAGCGTTGGCGCATATGGTCGATCCAGCGTACTCCAAAG 3' (SEQ ID NO: 17) e o 3'VLscSS15' GCAGTAAGGAATTCTCATTATTTTAT TTCCAAC TTTGT 3' (SEQ ID NO: 18).

Os protocolos de expressão e purificação de Composto B foram idênticos aos protocolos de expressão e purificação de Composto A.

Todos os métodos usados para analisar as propriedades bioquímicas e biológicas de composto B foram idênticos aos métodos usados para analisar a atividade de Composto A.

15 **Construção de M1-COV/acHLA-A2/SS1 (scFv)**

Para construir a proteína de fusão M1-cov/scHLA-A2/SS1 (scFv) o peptídeo MI 58-66 foi fusionado no N-término de proteína de fusão scHLA-A2/SS1 (scFv) através de um ligador curto de 15 aminoácidos por reação PCR de sobreposição com o iniciador de ligador 5'M1: 5 ' GGAAGCGTTGGCGCATATGGGCATTCTGGGCTTCGTGTTTACCCTG GGCGGAGGAGGATCCGGTGGCGGAGGTTTCAGGAGGCGGTGGATC GATCCAGCGTACTCCAAAGS ' (SEQ ID NO: 13) e o 3'VLscSS1-S'GCAGTAAGGAATTCTCAT TATTTTATTTCCAAC TTTGT3 ' (SEQ ID NO: 14). O plasmídeo PRB foi usado como um gabarito contendo a sequência scHLA -A2/SS1 (scFv). Os protocolos de expressão e purificação de proteína de fusão M1-cov/scHLA-A2/SS1(scFV) foram idênticos aos protocolos de expressão e purificação de Composto A. Todos os métodos usados para analisar as propriedades bioquímicas e biológicas da proteína de fusão M1-cov/scHLA-A2/SS1 (scFv) foram idênticos aos métodos usados para analisar

a atividade de Composto A.

Citometria de fluxo

As células foram incubadas com Composto A (60 min a 4°C em 100µl, 10 µg/ml), lavadas e incubadas com anti-HLA-A2 MAb BB7.2 (60 min a 4°C, 10 µl/ml). As células foram lavadas e incubadas com FITC anti-camundongo (60 min a 4°C, 10 µl/ml) que serviram como um anticorpo secundário. As células foram subsequenteiramente lavadas e analisadas por um citômetro de fluxo de calibre FACS (Becton-Dickinson, San Jose, CA USA).

Teste imunossorvente ligado a enzima

Imunoplasmas (Falcon®, Becton-Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ USA) foram revestidas com 10 µg/ml de mesotelina recombinante produzida bacterionalmente purificada (0/N a 4 °C). As placas foram bloqueadas com PBS contendo 2% leite desnatado e então incubadas com várias concentrações de Composto A (60 min a RT) e lavadas três vezes com PBS. A ligação foi detectada usando o anticorpo dependente anti-HLA-conformacional W6/32 (60 min, RT, 1 µg/ml), as placas foram lavadas três vezes com PBS e incubadas com IgG-peroxidase anti -camundongo (60 min, RT, 1 µg/ml). A reação foi desenvolvida usando TMB (DAKO) e terminada pela adição de 50µl H₂SO₄ 2N. O anticorpo anti-mesotelina (K1) foi usado como um controle positivo. As imunoplasmas foram analisadas por uma leitora ELISA usando filtro de 450 nm (Anthos 2001™, Anthos Labtech, Salzburg, Áustria).

Testes de citotoxicidade

A citotoxicidade foi determinada por testes de liberação de S³⁵- metionina. As células alvo foram cultivadas em placas de cultura em RPMI 10% FCS livres de metionina durante 2 h, seguido por incubação durante a noite com 15 µCi/ml de S³⁵metionina (NEN). As células alvo foram coletadas por tripsinização e lavadas duas vezes com 40 ml RPMI 10% FCS. As células alvo foram colocadas em placas de 96 cavidades (5 10³ células por

cavidade) em RMPI+10% FCS e incubadas durante a noite a 37°C, 5% CO₂. As células alvo foram incubadas com concentrações diferentes de proteínas de fusão de Composto A durante 2 h, células CTL efetadoras foram adicionadas em relações diferentes de alvo: efetador e as placas foram incubadas durante 8-12 h a 37°C, 5% CO₂. Após a incubação, S³⁵-metionina liberadas das células alvo foi medida em uma amostra de 25µl do sobrenadante de cultura. Todos os testes foram realizados em triplicata, a lise foi calculada diretamente: ([liberação experimental - liberação espontânea] / [liberação máxima - liberação espontânea]) •100, A liberação espontânea foi medida como a S³⁵ metionina liberada das células alvo na ausência de células efetuadas, e a liberação máxima foi medida como a S³⁵-metionina liberada das células alvo lisadas por 0,05M NaOH.

Linhagens de células

As células A431 e A431K5 (carcinoma epidermóide) foram mantidas em meio RPMI contendo 10% FCS, L-glutamina e penicilina/estreptomicina. A linhagem de células A431K5 é uma linhagem de células A431 de carcinoma epidermóide humano transfectado estavelmente com Mesotelina, as células transfectadas foram mantidas com 700 µg/ml G418 (Gibco-BRL*, Invitrogen™ Inc., Carlsbad, CA USA).

CTL's com especificidade para epítipo CMV pp65 (NLVPMVATV) foram gentilmente oferecidos pelo Dr Ditmar Zehn (Charitee, Berlin). Os CTL's foram expandidos por incubação com PBMCs pulsados com peptídeo, radiados (4000rad) de um doador positivo para HLA-A2 saudável e foram mantidas em meio AIMV + 8.9% FCS +50 µM-2-mercaptoetanol + penicilina/estreptomicina $1 \cdot 10^5$ U/L.

Resultados

Construção de Composto A

Uma construção codificando uma molécula de MHC de cadeia única composta de gene $\beta 2$ microglobulina fusionado a $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$ do gene

HLA-A2 via um ligador de peptídeo curto (15 aminoácidos) foi fusionado no scFv SS1 que marca mesotelina (Figura 1A). Esta construção foi analisada em detalhes para a atividade bioquímica e biológica e verificou-se ser funcional in-vitro e in-vivo (15). Para construir uma proteína de fusão com peptídeo covalentemente ligado, um peptídeo de 9 aminoácidos derivado da proteína CMV pp65 (NLVPMVATV) (SEQ ID NO: 4) foi fusionado no N-término da proteína de fusão scHLA-A2/SS1 (scFv) via ligador de 20 aminoácidos GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 6) (Figura 1B). Composto A foi construído em duas etapas: Primeiro uma proteína de fusão covalente chamada M1/scHLA-A2/SS1 (scFv) foi construída por PCR de extensão sobreposição. Nesta construção, o peptídeo M158-66 de influenza GILGFVFTL (SEQ ID NO: 21) e um ligador de 15 aminoácidos foram fusionados no N-término da proteína de fusão scHLA-A2/SS1 (scFv). Nesta construção, um sítio de restrição novo, singular, (BamHI) foi inserido na sequência de ligador por uma mutação silente. Na segunda etapa, o plasmídeo PRB contendo a sequência completa M1/scHLA-A2/SS1 (scFv) foi digerido com as enzimas de restrição NdeI e BamHI. Esta digestão produziu dois fragmentos. Um fragmento contém o peptídeo e parte da sequência de ligador, e segundo fragmento contém o plasmídeo, parte do ligador e a sequência scHLA-A2/SS1 (scFv). O fragmento que contém o plasmídeo, parte do ligador e a sequência scHLA-A2/SS1 (scFv) foi então ligado ao iniciador dsDNA que codifica a sequência de peptídeo CMV pp65 e uma extensão da sequência do ligador (Figura 1B). O novo plasmídeo foi transformado em células DH5 α de *E. coli*, e colônias positivas foram enviadas para o sequenciamento de DNA (Figura 2).

Expressão e purificação de Composto A

Composto A foi expressado em células BL21 de *E. coli* e, quando da indução com isopropil β -D-tiogalactosídeo, grandes quantidades de proteína recombinante acumulada nos corpos de inclusão intracelulares. A

análise SDS/PAGE de corpos de inclusão isolados e purificados revelou que o Composto A com o tamanho correto constituía 80-90% da massa total dos corpos de inclusão (Figura 3A). Os corpos de inclusão solubilizados e isolados foram reduzidos e reduplicados in-vitro em um tampão redox-embaralhamento. As proteínas de fusão monoméricas solúveis (Composto A) foram purificadas por cromatografia de troca iônica em Q-sepharose ®. A análise SDS/PAGE de Composto A revelou uma molécula monomérica altamente purificada com o tamanho esperado de 72 KDa (Figura 3B).

Atividade biológica do Composto A

10 ELISA

Para testar a capacidade de ligação de Composto A purificado para seu antígeno alvo, a mesotelina recombinante foi imobilizada em imunoplasmas. A ligação de composto A foi monitorada por uso de mAb W6/32 sensível à conformação, este anticorpo reconhece as moléculas MHC que são duplicadas corretamente com um peptídeo em seu sulco. Como mostrado na figura 4, a ligação de composto A a mesotelina recombinante foi dependente da dose. Isto sugere que os dois domínios funcionais de composto A, o domínio scFv (SS1) e o domínio peptídeo / scHLA-A2 foram duplicados corretamente. Além disso, o domínio scFv (SS1) de proteína de fusão está em forma ativa e pode especificamente ligar mesotelina.

Análise de citometria de fluxo (FACS)

Para testar a capacidade de ligação de composto A a linhagens de células expressando mesotelina, a análise FACS foi realizada. Como um modelo, as células alvo que são negativas para HLA-A2 foram usadas, assim a reatividade de um mAB anti-HLA-A2 pode ser usada para medir a ligação de Composto A em células que expressam mesotelina em sua superfície. Este modelo de células negativas para HLA-A2, positivas para mesotelina, representa o caso extremo em que as células de tumor perdem sua expressão de HLA. Assim, para a análise FACS, as células A431K5 negativas para

HLA-A2 foram usadas, que são células A431 de carcinoma epidermóide humano que foram transfectadas estavelmente com mesotelina. As células A431 parentais de carcinoma epidermóide humano que são negativas para mesotelina e negativas para HLA-A2 foram usadas como controle negativo. A

5 ligação de Composto A para as células alvo foi monitorada com anti-HLA-A2 mAb BB7.2 como um anticorpo primário seguido por um anticorpo secundário rotulado FITC. Um anti-mAb K1 de mesotelina foi usado para testar os níveis de expressão de mesotelina. Como mostrado na Figura 5A, células A431K5 expressam níveis elevados de mesotelina, enquanto as células

10 A431 parentais não expressam o antígeno alvo. As linhagens de células A431 e A431K5 foram também testadas para a expressão de HLA-A2 usando anticorpo específico para HLA-A2 (BB7.2), e ambas as linhagens de células HLA-A2 negativas. No entanto, quando as células A431K5 foram pré-incubadas com Composto A, elas foram positivamente coloridas com o

15 anticorpo BB7.2 específico para HLA-A2 (Figura 5B). As células A413 negativas para antígeno não foram afetadas. A ligação específica de Composto A para células A431K5 mas não para as células A431 ainda indica que a ligação é exclusivamente dependente da interação do domínio scFv de marcação da fusão com mesotelina e que uma proteína de fusão pode ligar seu

20 antígeno alvo como expressado nativamente sobre a superfície das células.

Teste de citotoxicidade

Para testar a capacidade de Composto A para mediar a morte de células negativas para HLA-A2- positivas para mesotelina por CTLs específicos para CMV pp65 limitado em HLA-A2- NLVPMVATV (SEQ ID

25 NO: 4), teste de liberação de metionina S³⁵ foi realizado usando células A431K5 negativas para HLA-A2- transfectadas com mesotelina, e as células parentais A431 negativas para HLA-A2 negativas para mesotelina. Para determinar o potencial de morte de CTLs específicos para CMV, o teste de citotoxicidade foi realizado usando células JY positivas para HLA-A2 que

foram radio-rotuladas com MetS³⁵ e carregadas com o peptídeo CMV NLVPMVATV. A morte específica média das células JY pelos CTLs específicos para CMV foi de 47% com uma relação E: T de 10:1 (dados não mostrados). Como mostrado na Figura 6a, Composto A eficazmente mediou a morte das células A431K5 (positivas para mesotelina negativas para HLA-A2-). A morte específica pode alcançar 66% em comparação com as células JY carregadas com peptídeo. Assim, a morte com uma proteína de fusão foi ainda mais eficiente comparada com células apresentando antígeno pulsado por peptídeo que representam as marcações ótimas. No entanto, quando as células A431K5 alvo foram incubadas com os CTLs específicos para CMV sozinha sem uma pré- incubação com Composto A ou quando as células alvo foram células A431 negativas para mesotelina com ou sem pré-incubação com Composto A, nenhuma atividade citotóxica foi observada. A seguir, uma experiência de titulação foi realizada para determinar a potência de Composto A, Como mostrado na Figura 6b, a morte de células A431K5 positivas para mesotelina foi dependente da dose com um IC50 de 0,5-1 µg/ml.

Estes resultados indicam que a morte de células A431K5 positivas para mesotelina negativas para HLA- A2 foi específica e controlada pelo reconhecimento de mesotelina pelo domínio de marcação de Composto A (scFv/SSI) e a especificidade de CTLs de CMV para o domínio peptídeo/scHLA-A2.

Atividade biológica de Composto B

Análise de citometria de fluxo (FACS)

Para testar a capacidade de ligação de Composto B para linhagens de células expressando mesotelina, uma análise de citometria de fluxo foi usada. Como um modelo, as células alvo que são negativas para HLA-A2 foram usadas, assim a reatividade do mAb anti-HLA-A2 irá indicar a ligação de Composto B ao antígeno de superfície de célula. As células A431K5 que são células A431 de carcinoma epidermóide humano foram

estavelmente transfectadas com mesotelina e são negativas para HLA-A2. Como controles, as células A431 parentais de carcinoma epidermóide humano foram usadas que são negativas para mesotelina e negativas para HLA-A2. A ligação de Composto B para as células alvo foi monitorada por mAb BB7.2 anti-HLA-A2 como um anticorpo primário seguido por um anticorpo secundário rotulado com FITC. Para testar os níveis de expressão de mesotelina e como um controle positivo, um mAb K1 anti- mesotelina comercial foi usado. Como mostrado na Figura 10A-B, células A431K5 expressam níveis altos de mesotelina, enquanto as células parentais A431 não expressam mesotelina. As linhagens de células A431 e A431K5 foram também testadas por sua expressão de HLA-A2 usando anticorpo específico para HLA-A2 (BB7.2), ambas as linhagens de células foram negativas para HLA-A2. No entanto, quando as células 431K5 foram pré-incubadas com Composto B, elas foram positivamente coloridas com o anticorpo BB7.2 específico para HLA-A2 enquanto as células A431 de controle não foram coloridas (Figura 10 C-D). A ligação específica de Composto B a células A431K5 mas não a células A431 indica que a ligação é exclusivamente dependente da interação do domínio scFv de marcação com mesotelina.

Para analisar a ligação de Composto B em comparação com a fusão de Composto A, uma análise FACS foi realizada usando ambas as moléculas em condições e concentrações similares. Como mostrado nas Figuras 10E-F somente as células A431K5 positivas para mesotelina foram positivamente coloridas com Ab específico para HLA-A2 quando pré-incubado com ambas as proteínas de fusão, no entanto, o composto A demonstrou uma melhor ligação.

Teste de citotoxicidade

Para testar a capacidade de Composto B de mediar a morte de células negativas para HLA-A2 e positivas para mesotelina por CTLs específicos para CMV limitados em HLA-A2- CMV NLVPMVATV (SEQ

ID NO: 4), o teste de liberação de metionina S^{35} -usando células A431K5 negativas para HLA-A2- transfectadas com mesotelina foi realizado, e as células parentais A431 negativas para HLA-A2 negativas para mesotelina. Para determinar o potencial de morte dos CTLs específicos para CMV, teste de citotoxicidade foi realizado usando células JY positivas para HLA-A2 que foram radio-rotuladas com $MetS^{35}$ e carregadas com o peptídeo CMV NLVPMVATV. A morte específica média das células JY pelos CTLs específicos para CMV foi em torno de 45-50% usando uma relação E:T de 10:1 (dados não mostrados). Como mostrado na Figura HA, Composto B eficazmente mediou a morte das células A431K5 (positivas para mesotelina-negativas para HLA-A2), esta morte específica foi de 66% em comparação com as células JY carregadas com peptídeo (-150% comparado com células JY). No entanto, quando as células alvo A431K5 foram incubadas os CTLs específicos para CMV- apenas sem uma pré-incubação com Composto B ou quando as células alvo eram negativas para mesotelina (células A431), com ou sem pré-incubação com Composto B, nenhuma atividade citotóxica foi observada. Os experimentos de titulação que determinaram a potência de uma proteína de fusão, mostrados na Figura HB, indicam que a morte de células A431K5 positivas para mesotelina células foi dependente da dose. Para comparar a atividade citotóxica de Composto B e Composto A, proteínas de fusão, que diferem em comprimento dos peptídeos usados para covalentemente fixar o peptídeo antigênico para a β -2 microglobulina, um - Teste de liberação de metionina - S^{35} foi realizado usando condições similares para ambas proteínas de fusão. Como mostrado na Figura 12, ambas as moléculas mediarão de modo eficiente e específica a morte de células A431K5, mas não células A431. Quando concentrações relativamente elevadas de proteínas de fusão (Composto B e Composto A) foram usadas, a atividade de morte de ambas as moléculas foi similar. No entanto, quando baixas concentrações of proteínas de fusão foram usadas, a atividade

citotóxica de Composto A foi superior provavelmente devido a uma melhor estabilidade e posicionamento do peptídeo CMV no sulco de ligação MHC peptídeo devido a um ligador mais longo.

M1-COV/SCHLA-A2/SS1

5 A proteína de fusão M1-cov/scHLA-A2/SS1 (scFv) foi construída por reação de PCR de extensão de sobreposição em que o peptídeo M1 58-66 Influenza e um ligador de 15 aminoácidos GGGGSGGGGSGGGGS foram fusionados no N-término da proteína de fusão SCHLA-A2/SS1 (scFv) (Figura 13). O produto PCR foi ligado ao vetor
10 de clonagem TA- (p-GEM, Promega), transformado em células DH5 α de E. coli. As colônias positivas foram selecionadas e o inserto foi isolado usando EcoRI e NdeI. O inserto foi ligado ao vetor de expressão PRB e transformado em células DH5 α de E. coli. Colônias positivas foram enviadas para seqüenciamento de DNA (Figura 14).

15 Expressão e purificação de Composto B

A proteína de fusão M1-cov/scHLA-A2/SS1 (scFv) foi expressada em células BL21 de E. coli e, quando da indução com isopropil β -D-tiogalactosídeo, grandes quantidades de proteína recombinante acumulada nos corpos de inclusão intracelulares. A análise SDS/PAGE de corpos de
20 inclusão isolados e purificados revelou que a proteína de fusão M1-cov/scHLA-A2/SS1 (scFv) com o tamanho correto constituía 80-90% da massa total dos corpos de inclusão (Figura 15A). Os corpos de inclusão solubilizados e isolados foram reduzidos e reduplicados in-vitro em um tampão redox- embaralhamento. As proteínas de fusão monoméricas solúveis
25 (M1-cov/scHLA-A2/SS1 (scFv)) foram purificadas por cromatografia de troca iônica em Q-sepharose ®. A análise SDS/PAGE de proteínas de fusão M1-cov/scHLA-A2/SS1 (scFv) revelou uma molécula monomérica altamente purificada com o tamanho esperado de 72 KDa (Figura 15B).

ELISA

Para testar a capacidade de ligação de proteína de fusão M1-cov/scHLA-A2/SS1 (scFv) purificada para seu antígeno alvo, a mesotelina recombinante foi imobilizada em imunoplaacas. A ligação de proteína de fusão M1-cov/scHLA-A2/SS1 (scFv) foi monitorada por uso de mAb W6/32 sensível à conformação, este anticorpo reconhece as moléculas MHC que são duplicadas corretamente com um peptídeo em seu sulco. Como mostrado na figura 16, a ligação de proteína de fusão M1-cov/scHLA-A2/SS1 (scFv) a mesotelina recombinante foi dependente da dose. Isto sugere que os dois domínios funcionais de M1-cov/scHLA-A2/SS1 (scFv), o domínio scFv (SS1) e o domínio M1-cov/scHLA-A2 foram duplicados corretamente. Além disso, o domínio scFv (SS1) de proteína de fusão está em forma ativa e pode especificamente ligar mesotelina.

Análise de citometria de fluxo (FACS)

Para testar a capacidade de ligação de proteína de fusão M1-cov/scHLA-A2/SS1 (scFv) a linhagens de células expressando mesotelina, a análise FACS foi realizada. Como um modelo, as células alvo que são negativas para HLA-A2 foram usadas, e o mAb anti-HLA-A2 foi usado para monitorar a ligação de proteína de fusão M1-cov/scHLA-A2/SS1 (scFv) ao antígeno de superfície de célula. Para a análise FACS, as células A431K5 transfectadas com mesotelina foram usadas. A ligação de proteína de fusão M1-cov/scHLA-A2/SS1 (scFv) para as células alvo foi monitorada com anti-HLA-A2 mAb BB7.2 como um anticorpo primário seguido por um anticorpo secundário rotulado FITC. Para testar os níveis de expressão de mesotelina e como controle positivo, um mAb K1 anti-mesotelina comercial foi usado. Como mostrado na figura 17A-B, as células A431K5 expressam níveis elevados de mesotelina, enquanto as células parentais A431 não expressam mesotelina. As linhagens de células A431 e A431K5 também foram testadas para sua expressão de HLA-A2 usando anticorpo específico para HLA-A2 (BB7.2), ambas as linhagens de células

eram negativas para HLA-A2. No entanto, quando as células A431K5 mas não as células A431 foram pré-incubadas com proteínas de fusão M1-cov/scHLA-A2/SS1 (scFv), elas foram positivamente coloridas com o anticorpo BB7.2 específico para HLA-A2 (figura 17C-D). Esta ligação específica de proteína de fusão M1-cov/scHLA-A2/SS1 (scFv) para células A431K5 e não para as células A431 indica que a ligação é exclusivamente dependente da interação do domínio de marcação (scFv (SS1)) com mesotelina.

Teste de citotoxicidade

Para testar a capacidade de proteína de fusão M1-cov/scHLA-A2/SS1 (scFv) mediar a morte de células negativas para HLA-A2- positivas para mesotelina por CTLs específicos para M158-66 limitados em HLA-A2, teste de liberação de metionina - S^{35} usando células A431K5 negativas para HLA-A2- transfectadas com mesotelina foi realizado. Como mostrado na Figura 18, proteína de fusão M1- cov/scHLA-A2/SS1 (scFv) não mediou a lise de células A431K5 (positivas para mesotelina negativas para HLA-A2). No entanto, o SCHLA-A2/SS1 (scFv) contendo o peptídeo M158-66 em seu sulco mediou a morte de células alvos positivas para mesotelina pelos CTLs específicos para M158-66 e limitados em HLA-A2.

Discussão:

Este estudo demonstra a capacidade de marcar peptídeo covalentemente ligado / scMHC/ proteína de fusão scFv em células de tumor pode tornar as células negativas para HLA-A2 susceptíveis à lise pelos CTLs limitados em HLA-A2 relevantes. Como previamente mostrado por Lev et al. e Oved et al. (15, 21), esta estratégia tem duas vantagens principais. Primeiro, ela toma vantagem do uso de fragmentos de Ab recombinantes que podem localizar sobre estas células malignas que expressam um marcador de tumor, geralmente associado com o fenótipo transformado (com receptores de fator de crescimento e/ou antígeno de diferenciação), com um grau relativamente

elevado de especificidade. Segundo, esta estratégia tem a capacidade de recrutar uma população particular de células T citotóxicas altamente reativas específicas para um epítopo de peptídeo pré-selecionado, altamente antigênico, no complexo MHC-peptídeo marcado, como epítomos de células T específicas virais. Esta abordagem de plataforma gera moléculas múltiplas com muitos fragmentos de scFv específicos de tumor que marcam vários antígenos específicos de tumor, combinados com a capacidade de marcar muitos tipos de complexos MHC- peptídeo carregando peptídeo pré-selecionados, únicos e altamente antigênicos derivados de epítomos de células T de tumor, virais ou bacterianos. Estes exemplos apresentam uma estratégia em outra etapa por fusão do peptídeo de 9 aminoácidos ligado por um ligador curto (20AA) para a proteína de fusão scHLA-A2/scFv previamente relatada (15AA), e assim, estabilizando o peptídeo no sulco de MHC prolongando a estabilidade geral das proteínas de fusão. Um modelo para esta nova geração de proteínas de fusão, a presente invenção refere-se à construção de uma proteína de fusão em que o CMV pp65 derivado (NLVPMVATV) fusionado no N-término da molécula scHLA-A2/SS1 (scFv) e suas características bioquímicas e biológicas. Foi mostrado que os dois domínios da nova proteína de fusão podem reduplicar in vitro para formar moléculas corretamente duplicadas com o peptídeo dentro do sulco HLA-A2 e um domínio de marcação ativo (scFv) pode especificamente ligar a seu antígeno alvo. Além disso, esta proteína de fusão mediu com sucesso a lise de células de tumor negativas para HLA-A2 positivas para mesotelina por CTLs limitados em HLA-A2.

A progressão do tumor é com frequência associada com a secreção de fatores imune-supressivos e/ou a regulação negativa de funções de apresentação de antígeno MHC de classe I (2). Mesmo quando uma resposta de CTL específica é demonstrada em pacientes, esta resposta é baixa porque a população CTL anti-tumor é rara, muito não frequente, e em alguns

casos os CLTS não são funcionais ou anérgicos (26). Além disso, é bem estabelecido que o número de complexos MHC- peptídeo na superfície das células de tumor que apresentam um peptídeo associado com tumor particular é baixo (27). Como mostrado aqui, uma nova estratégia superou estes problemas. Primeiro, as células de tumor são revestidas com os complexos MHC- peptídeo independente de sua expressão de MHC endógeno. Segundo, o uso de antígenos específicos para tumor que fazem geralmente parte do fenótipo do tumor (como receptores de fator de crescimento e antígenos de diferenciação) evitam a regulação negativa destes antígenos e prolongam a eficiência do tratamento. Terceiro e mais importante, o domínio do efetador da proteína de fusão, o complexo MHC- peptídeo pode recrutar populações específicas de CTLs dependendo do peptídeo abrigando o sulco de MHC.

Será notado que alguns aspectos da invenção, que são, para clareza, descritos no contexto de formas de realização separadas, também podem ser providos em combinação com uma forma de realização única. Inversamente, vários aspectos da invenção que são, por exemplo, descritos no contexto de uma forma de realização única, também podem ser providos separadamente ou em uma sub-combinação apropriada. Apesar da invenção ter sido descrita em conjunto com formas de realização específicas da mesma, é evidente que muitas alternativas, modificações e variações serão evidentes para o versado na técnica. Conseqüentemente, pretende-se englobar todas estas alternativas, modificações e variações que estão dentro do espírito e amplo escopo das reivindicações. Todas as publicações, patentes e pedidos de patente mencionados neste relatório são aqui incorporados em sua totalidade por referência no relatório, na mesma extensão com se cada publicação, patente ou pedido de patente individual fosse especificamente e individualmente indicado para ser incorporado por referência. Além disso, citação ou identificação de qualquer referência neste pedido não deve ser construída como uma admissão de que esta referência está disponível como

técnica anterior à presente invenção.

Referências Citadas

1. Gilboa. E. How tumors escape immune destruction and what we can do about it. *Cancer Immunol. Immunother.* 48, 382-385 (1999).
- 5 2. Seliger, B., Maeurer, M. J., & Ferrone, S. Antigen- processing machinery breakdown and tumor growth. *Immunol. Today* 21, 455-464 (2000).
3. Garcia-Lora, A., Algarra,I., & Garrido,F. MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. *J. Cell Physiol* 195, 346-355 (2003).
4. Garrido, F. & Algarra, I. MHC antigens and tumor escape from immune
10 surveillance. *Adv. Cancer Res.* 83, 117-158
(2001).
5. McLaughlin, P. et al. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J. Clin. Oncol.* 16, 2825-2833 (1998).
- 15 6. Cobleigh, M.A. et al. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J. Clin. Oncol.* 17, 2639-2648 (1999).
7. Pastan, I. & Kreitman,R. J. immunotoxins in cancer therapy. *Curr. Opin.*
20 *Investig. Drugs* 3, 1089-1091 (2002).
8. Boon, T. Sc van der, B.P. Human tumor antigens recognized by T-lymphocytes. *J. Exp. Med.* 183, 725-729 (1996). 9. Esche,C, Shurin,M.R., & Lotze,M.T. The use of dendritic cells for cancer vaccination. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 1, 72-81 (1999).
- 25 10. Offringa, R., van der Burg, S.H., Ossendorp, F., Toes, R. E., & Melief,C.J. Design and evaluation of antigen-specific vaccination strategies against cancer. *Curr. Opin. Immunol.* 12, 576-582 (2000).
11. Wang, E., Phan,G.Q., & Marincola, F.M. T-cell- directed cancer vaccines: the melanoma model. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 1, 277-290 (2001).

12. Dudley, M. E. et al. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 298, 850-854 (2002).
13. Dudley, M.E. & Rosenberg, S.A. Adoptive-cell- transfer therapy for the
5 treatment of patients with cancer. *Nat. Rev. Cancer* 3, 666-675 (2003).
14. Rosenberg, S.A. Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature* 411, 380-384 (2001).
15. Lev, A. et al. Tumor-specific Ab-mediated targeting of MHC-peptide complexes induces regression of human tumor xenografts in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 9051-9056 (2004).
10
16. Donda, A. et al. In vivo targeting of an anti-tumor antibody coupled to antigenic MHC class I complexes induces specific growth inhibition and regression of established syngeneic tumor grafts. *Cancer immun.* 3, 11 (2003).
17. Ogg, G.S. et al. Sensitization of tumour cells to lysis by virus-specific
15 CTL using antibody-targeted MHC class I/peptide complexes. *Br. J. Cancer* 82, 1058-1062 (2000).
18. Robert, B., Guillaume, P., Luescher, I., Romero, P., & Mach,J.P. Antibody-conjugated MHC class I tetramers can target tumor cells for specific lysis by T-lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 30, 3165-3170 (2000).
- 20 19. Robert, B. et al. Redirecting anti-viral CTL against cancer cells by surface targeting of monomeric MHC class I- viral peptide conjugated to antibody fragments. *Cancer Immun.* 1, 2 (2001).
20. Savage, P. et al. Anti-viral cytotoxic T-cells inhibit the growth of cancer cells with antibody targeted HLA class I/peptide complexes in SCID mice.
25 *Int. J. Cancer* 98, 561-566 (2002).
21. Oved, K., Lev,A., Noy,R., Segal, D., & Reiter,Y. Antibody-mediated targeting of human single-chain class I MHC with covalently linked peptides induces efficient killing of tumor cells by tumor or viral- specific cytotoxic T-lymphocytes. *Cancer Immunol. Immunother.* 54, 867-879 (2005).

22. Chang, K. & Pastan, I. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding a protein detected by the K1 antibody from an ovarian carcinoma (OVCAR-3) cell line. *Int. J. Cancer* 57, 90-97 (1994).
23. Chang, K. & Pastan, I. Molecular cloning of mesothelin, a differentiation antigen present on mesothelium, mesotheliomas, and ovarian cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 136-140 (1996).
24. Chang, K. & Pastan, I. Molecular cloning of mesothelin, a differentiation antigen present on mesothelium, mesotheliomas, and ovarian cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 136-140 (1996).
25. Hassan, R., Bera, T., & Pastan, I. Mesothelin: a new target for immunotherapy. *Clin. Cancer Res.* 10, 3937-3942 (2004).
26. Lee, P. P. et al. Characterization of circulating T- cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients. *Nat. Med.* 5, 677-685 (1999).
27. Christinck, E.R., Luscher, M.A., Barber, B. H., & Williams, D. B. Peptide binding to class I MHC on living cells and quantitation of complexes required for CTL lysis. *Nature* 352, 67-70 (1991).
28. Jain, R. K. Transport of molecules, particles, and cells in solid tumors. *Annu. Rev. Biomed. Eng* 1, 241-263 (1999).
29. Bromley, S. K. et al. The immunological synapse. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 375-396 (2001).
30. Lanzavecchia, A., Lezzi, G., & Viola, A. From TCR engagement to T-cell activation: a kinetic view of T-cell behavior. *Cell* 96, 1-4 (1999).
31. Chang, K., Pastan, I. & Willingham, M. C. Isolation and characterization of a monoclonal antibody, K1, reactive with ovarian cancers and normal mesothelium. *Int. J. Cancer* 50, 373-381 (1992).
32. Chang, K., Pai, L. H., Batra, J. K., Pastan, I. & Willingham, M. C. Characterization of the antigen (CAK1) recognized by monoclonal antibody K1 present on ovarian cancers and normal mesothelium. *Cancer Res.* 52, 181-186 (1992).

33. Parham, P., Barnstable, C. J. & Bodmer, W. F. Use of a monoclonal antibody (W6/32) in structural studies of HLA-A, B, C, antigens. *J. Immunol.* 123, 342-349 (1979).

34. Shields, M. J. & Ribaud, R. K. Mapping of the monoclonal antibody W6/32: sensitivity to the amino terminus of beta2-microglobulin. *Tissue Antigens* 51, 567-570 (1998).

35. Parham, P. & Brodsky, F. M. Partial purification and some properties of BB7.2. A cytotoxic monoclonal antibody with specificity for HLA-A2 and a variant of HLA-A28. *Hum. Immunol.* 3, 277-299 (1981).

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Teva Pharmaceutical Industries, Ltd.
Teva Pharmaceuticals USA, Inc.
Technion Research and Development Foundation Ltd.

<120> Proteínas de fusão, usos das mesmas e processos para produzir as mesmas

<130> 76322-PCT/JPW/YC

<150> US 60/801,798

<151> 2006-05-19

<160> 23

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 1995

<212> DNA

<213> sequência artificial

<220>

<223> Proteína de fusão do composto A

<400> 1

atgaacctgg tgccgatggg cgcgaccgtt ggaggtggcg gttctggcgg aggaggatcc	60
gggtggcggag gttcaggagg cgggtggatcg atccagcgta ctccaaagat tcagggtttac	120
tcacgtcatc cagcagagaa tggaaagtca aatttcctga attgctatgt gttctgggttt	180
catccatccg acattgaagt tgacttactg aagaatggag agagaattga aaaagtggag	240
cattcagact tgtctttttc gaaggactgg tctttctatc tcttgtaacta cactgaattc	300
acccccactg aaaaagatga gtatgcctgc cgtgtgaacc atgtgacttt gtcacagccc	360
aagatagtta agtgggatcg cgacatgggt ggcgggtggaa gcggcgggtg aggctctggt	420
ggaggtggca gcggctctca ctccatgagg tatttcttca catccgtgtc ccggccccggc	480
cgcggggagc cccgcttcat cgcagtgggc tacgtggacg acacgcagtt cgtgcggttc	540
gacagcgacg ccgcgagcca gaggatggag ccgcgggcgc cgtggataga gcaggagggt	600
ccggagtatt gggacgggga gacacggaaa gtgaaggccc actcacagac tcaccgagtg	660
gacctgggga ccctgcgcgg ctactacaac cagagcgagg ccggttctca caccgtccag	720
aggatgtatg gctgcgacgt ggggtcggac tggcgcttcc tccgcgggta ccaccagtac	780
gcgtacgacg gcaaggatta catcgccctg aaagaggacc tgcgctcttg gaccgcggcg	840
gacatggcag ctacagaccac caagcacaag tgggaggcgg cccatgtagc ggagcagttg	900
agagcctacc tggagggcac gtgcgtggag tggctccgca gatacctgga gaacgggaag	960
gagacgctgc agcgcacgga cgccccaaa acgcacatga ctcaccacgc tgtctctgac	1020
catgaagcca ccctgaggtg ctgggcccctg agcttctacc ctgcggagat cactctgacc	1080
tggcagcggg atggggagga ccagaccacg gacacggagc tcgtggagac aaggcctgca	1140
ggggatggaa ctttcagaa gtgggcggct gtgggtgggc cttctggaca ggagcagaga	1200
tacacctgcc atgtgcagca tgagggtttg cccaagcccc tcacctgag atgggaggct	1260
tccaaaatc aactacaact acacacatct aacccctaac taaadaaac taaacattca	1320

```

gtgaagatat cctgcaaggc ttctggttac tcattcactg gctacacccat gaactgggtg 1380
aagcagagcc atggaaagag ccttgagtgg attggactta ttactcctta caatggtgct 1440
tctagctaca accagaagtt caggggcaag gccacattaa ctgtagacaa gtcattccagc 1500
acagcctaca tggacctcct cagtctgaca tctgaagact ctgcagtcta ttctctgtgca 1560
aggggggggtt acgacgggag gggttttgac tactggggcc aaggggaccac ggtcaccgtc 1620
tcctcaggtg taggcggttc aggcggcggg ggctctggcg gtggcggatc ggacatcgag 1680
ctcactcagt ctccagcaat catgtctgca tctccagggg agaagggtcac catgacctgc 1740
agtgccagct caagtgtgag ttacatgcac tggtagcagc agaagtcagg cacctcccc 1800
aaaagatgga tttatgacac atccaaactg gcttctggag tcccagggtc cttcagtggc 1860
agtgggtctg gaaactctta ctctctcaca atcagcagcg tggaggctga agatgatgca 1920
acttattact gccagcagtg gagtaagcac cctctcacgt tcggtgctgg gacaaagttg 1980
gaaataaaaat aatga 1995

```

```

<210> 2
<211> 663
<212> PRT
<213> Sequência artificial

```

```

<220>
<223> Proteína de fusão do composto A

```

```

<400> 2

```

```

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

```

130	135	140
Gly 145 Ser His Ser Met 150 Arg Tyr Phe Phe Thr Ser 155 Val Ser Arg Pro Gly 160		
Arg Gly Glu Pro Arg 165 Phe Ile Ala Val Gly 170 Tyr Val Asp Asp Thr Gln 175		
Phe Val Arg 180 Phe Asp Ser Asp Ala 185 Ala Ser Gln Arg Met 190 Glu Pro Arg		
Ala Pro Trp 195 Ile Glu Gln Glu Gly 200 Pro Glu Tyr Trp Asp 205 Gly Glu Thr		
Arg Lys 210 Val Lys Ala His Ser 215 Gln Thr His Arg Val 220 Asp Leu Gly Thr		
Leu 225 Arg Gly Tyr Tyr Asn 230 Gln Ser Glu Ala Gly 235 Ser His Thr Val Gln 240		
Arg Met Tyr Gly 245 Cys Asp Val Gly Ser Asp 250 Trp Arg Phe Leu Arg Gly 255		
Tyr His Gln 260 Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys 265 Asp Tyr Ile Ala Leu 270 Lys Glu		
Asp Leu Arg 275 Ser Trp Thr Ala 280 Ala Asp Met Ala Ala Gln 285 Thr Thr Lys		
His Lys 290 Trp Glu Ala Ala His 295 Val Ala Glu Gln Leu 300 Arg Ala Tyr Leu		
Glu Gly Thr Cys Val 310 Glu Trp Leu Arg Arg Tyr 315 Leu Glu Asn Gly Lys 320		
Glu Thr Leu Gln 325 Arg Thr Asp Ala Pro Lys 330 Thr His Met Thr His 335 His		
Ala Val Ser 340 Asp His Glu Ala Thr Leu 345 Arg Cys Trp Ala Leu 350 Ser Phe		
Tyr Pro Ala 355 Glu Ile Thr Leu Thr 360 Trp Gln Arg Asp Gly 365 Glu Asp Gln		
Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val 375 Glu Thr Arg Pro Ala 380 Gly Asp Gly Thr		
Phe Gln Lys Trp Ala 390 Ala Val Val Val Pro Ser 395 Gly Gln Glu Gln Arg 400		
Tyr Thr Cys His Val 405 Gln His Glu Gly Leu 410 Pro Lys Pro Leu Thr 415 Leu		

Arg Trp Glu Ala Ser Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro
 420 425 430
 Glu Leu Glu Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser
 435 440 445
 Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His
 450 455 460
 Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Leu Ile Thr Pro Tyr Asn Gly Ala
 465 470 475 480
 Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp
 485 490 495
 Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Asp Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu
 500 505 510
 Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Gly Arg Gly
 515 520 525
 Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Val
 530 535 540
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu
 545 550 555 560
 Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val
 565 570 575
 Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr
 580 585 590
 Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser
 595 600 605
 Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Gly Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 610 615 620
 Asn Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu Ala Glu Asp Asp Ala
 625 630 635 640
 Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Lys His Pro Leu Thr Phe Gly Ala
 645 650 655
 Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 660

<210> 3
 <211> 27
 <212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptídeo CMV

<400> 3

aacctgggtgc cgatgggtcgc gaccgtt

27

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Peptídeo CMV

<400> 4

Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val
1 5

<210> 5

<211> 60

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Ligador de peptídeo 20-aa

<400> 5

ggaggtggcg gttctggcgg aggaggatcc ggtggcggag gttcaggagg cggtggatcg

60

<210> 6

<211> 20

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Ligador de peptídeo 20-aa

<400> 6

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> 7

<211> 45

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Ligador de peptídeo 15-aa

<400> 7

ggtggcggcg gaagcggcgg tggaggctct ggtggaggcg gcagc

45

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Ligador de peptídeo 15-aa

<400> 8

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

<210> 9

<211> 12

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Ligador de peptídeo 4-aa

<400> 9

gcttccggag gt

12

<210> 10

<211> 4

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Ligador de peptídeo 4-aa

<400> 10

Ala Ser Gly Gly

1

<210> 11

<211> 726

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> SS1

<400> 11

caggtacaac tgcagcagtc tgggcctgag ctggagaagc ctggcgcttc agtgaagata	60
tcctgcaagg ctctctggtta ctcatcact ggctacacca tgaactgggt gaagcagagc	120
catggaaaga gccttgagtg gattggactt attactcctt acaatgggtg ttctagctac	180
aaccagaagt tcaggggcaa ggccacatta actgtagaca agtcatccag cacagcctac	240
atggacctcc tcagtctgac atctgaagac tctgcagtct atttctgtgc aagggggggt	300
tacgacggga ggggttttga ctactggggc caagggacca cggtcaccgt ctctcaggt	360
gtaggcggtt caggcggcgg tggctctggc ggtggcggat cggacatcga gctcactcag	420
tctccagcaa tcatgtctgc atctccaggg gagaaggcca ccatgacctg cagtgccagc	480
tcaagtgtaa gttacatgca ctgggtaccag cagaagtcag gcacctcccc caaaagatgg	540
atztatgaca catccaaact ggcttctgga gtcccagggt gcttcagtgg cagtgggtct	600
ggaaactctt actctctcac aatcagcagc gtggaggctg aagatgatgc aacttattac	660
tgccagcagt ggagtaagca ccctctcacg ttcgggtgctg ggacaaagtt ggaaataaaa	720

taatga

726

<210> 12
 <211> 240
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> SS1

<400> 12

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

Ser Lys His Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 225 230 235 240

<210> 13
 <211> 109
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Iniciador de PCR

<400> 13
 ggaagcggtg gcgcataatgg gcattctggg cttcgtgttt accctgggcg gaggaggatc 60
 cggtagcgga ggttcaggag gcggtggatc gatccagcgt actccaaag 109

<210> 14
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Iniciador de PCR

<400> 14
 gcagtaagga attctcatta ttttatttcc aactttgt 38

<210> 15
 <211> 56
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Iniciador de PCR

<400> 15
 tatgaacctg gtgccgatgg tcgcgaccgt tggagggtggc ggttctggcg gaggag 56

<210> 16
 <211> 58
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Iniciador de PCR

<400> 16
 gatcctcttc cgccagaacc gccacctcca acggtcgcga ccatcggcac cagggttca 58

<210> 17
 <211> 108
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Iniciador de PCR

<400> 17
 ggaagcggtg gcgcataatga tcatggacca ggttccgttc tctgttggcg aggagggtcc 60
 ggtggcggag gttcaggagg cggtaggatcg atccagcgtg ctccaaag 108

<210> 18

<211> 38
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Iniciador de PCR

<400> 18
 gcagtaagga attctcatta ttttatttcc aactttgt

38

<210> 19
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> ligador de peptideo

<400> 19

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

<210> 20
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> monômero ligador de peptideo

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> x = qualquer aminoácido

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> xaa pode ser qualquer aminoácido ocorrendo naturalmente

<400> 20

Gly xaa Gly Gly Ser
 1 5

<210> 21
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Ligador de peptideo

<400> 21

Gly Ile Leu Gly Phe val Phe Thr Leu
 1 5

<210> 22
 <211> 1980
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>

<223> Proteína de fusão do composto B

<400> 22

atgaacctgg	tgccgatggt	cgcgaccgtt	ggcggaggag	gatccggtgg	cggagggttca	60
ggaggcggtg	gatcgatcca	gcgtactcca	aagattcagg	tttactcacg	tcatccagca	120
gagaatggaa	agtcaaattt	cctgaattgc	tatgtgtctg	ggtttcatcc	atccgacatt	180
gaagttgact	tactgaagaa	tggagagaga	attgaaaaag	tggagcattc	agacttgtct	240
ttttcgaagg	actgggtctt	ctatctcttg	tactacactg	aattcacccc	cactgaaaaa	300
gatgagtatg	cctgccgtgt	gaaccatgtg	actttgtcac	agcccaagat	agttaagtgg	360
gatcgcgaca	tgggtggcgg	tggaaagcgg	ggtggaggct	ctggtggagg	tggcagcggc	420
tctcactcca	tgaggatatt	cttcacatcc	gtgtcccggc	ccggccgcgg	ggagccccgc	480
ttcatcgcag	tgggttacgt	ggacgacacg	cagttcgtgc	ggttcgacag	cgacgccgcg	540
agccagagga	tggagccgcg	ggcgcctgtg	atagagcagg	aggggtccga	gtattgggac	600
ggggagacac	ggaaagtga	ggccccactc	cagactcacc	gagtggacct	ggggaccctg	660
cgcggctact	acaaccagag	cgaggccggt	tctcacaccg	tccagaggat	gtatggctgc	720
gacgtggggt	cggactggcg	cttctctcgc	gggtaccacc	agtacgcgta	cgacggcaag	780
gattacatcg	ccctgaaaga	ggacctgcgc	tcttggaccg	cggcggacat	ggcagctcag	840
accaccaagc	acaagtggga	ggcggcccat	gtagcggagc	agttgagagc	ctacctggag	900
ggcacgtgcg	tggagtggct	ccgcagatac	ctggagaacg	ggaaggagac	gctgcagcgc	960
acggacgccc	ccaaaacgca	catgactcac	cacgctgtct	ctgaccatga	agccaccctg	1020
aggtgtctgg	ccctgagctt	ctaccctgcg	gagatcacac	tgacctggca	gcgggatggg	1080
gaggaccaga	cccaggacac	ggagctcgtg	gagaccaggc	ctgcagggga	tggaaacctt	1140
cagaagtggg	cggctgtggt	ggtgccttct	ggacaggagc	agagatacac	ctgccatgtg	1200
cagcatgagg	gtttgcccac	gccccctacc	ctgagatggg	aggcttccgg	aggtcaggta	1260
caactgcagc	agtctgggcc	tgagctggag	aagcctggcg	cttcagtga	gatatcctgc	1320
aaggcttctg	gttactcatt	cactggctac	accatgaact	gggtgaagca	gagccatgga	1380
aagagccttg	agtggattgg	acttattact	ccttacaatg	gtgcttctag	ctacaaccag	1440
aagttcaggg	gcaaggccac	attaactgta	gacaagtcac	ccagcacagc	ctacatggac	1500
ctcctcagtc	tgacatctga	agactctgca	gtctatttct	gtgcaagggg	gggttacgac	1560
gggagggggt	ttgactactg	gggccaaggg	accacgggtc	ccgtctctct	aggtgtaggc	1620
gggtcaggcg	gcggtggctc	tggcgggtgg	ggatcggaca	tcgagctcac	tcagtctcca	1680
gcaatcatgt	ctgcatctcc	aggggagaag	gtcaccatga	cctgcagtgc	cagctcaagt	1740
gtaagttaca	tgcactggta	ccagcagaag	tcaggcacct	cccccaaaag	atggatttat	1800
gacacatcca	aactggcttc	tggagtccca	ggtcgcttca	gtggcagtgg	gtctggaaac	1860
tcttactctc	tcacaatcag	cagcgtggag	gctgaagatg	atgcaactta	ttactgccag	1920
cagtggagta	agcaccctct	cacgttcggt	gctgggacaa	agttggaaat	aaaataatga	1980

<210> 23
 <211> 1980
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Proteína de fusão M1cov/SCHLA-A2/SS1 (scFv)

<400> 23
 atgggcattc tgggcttcgt gtttacctg ggcggaggag gatccggtgg cggaggttca 60
 ggaggcgggt gatcgatcca gcgtactcca aagattcagg ttactcacg tcatccagca 120
 gagaatggaa agtcaaattt cctgaattgc tatgtgtctg ggtttcatcc atccgacatt 180
 gaagttgact tactgaagaa tggagagaga attgaaaaag tggagcattc agacttgtct 240
 ttttcgaagg actggtcttt ctatctcttg tactacactg aattcacccc cactgaaaaa 300
 gatgagtatg cctgccgtgt gaaccatgtg actttgtcac agcccaagat agttaagtgg 360
 gatcgcgaca tgggtggcgg tgggaagcggc ggtggaggct ctggtggagg tggcagcggc 420
 tctcactcca tgaggtattt cttcacatcc gtgtcccggc ccggccgcgg ggagccccgc 480
 ttcacgcag tgggctacgt ggacgacacg cagttcgtgc ggttcgacag cgacgccgcg 540
 agccagagga tggagccgcg ggcgccgtgg atagagcagg agggctccga gtattgggac 600
 ggggagacac ggaaagtga ggccactca cagactcacc gagtggacct ggggacctg 660
 cgcggctact acaaccagag cgaggccggg tctcacaccg tccagaggat gtatggctgc 720
 gacgtggggt cggactggcg cttcctccgc gggtaaccac agtacgcgta cgacggcaag 780
 gattacatcg ccttgaaaga ggacctgcgc tcttgaccg cggcggaat ggagctcag 840
 accaccaagc acaagtggga ggcggcccat gtagcggagc agttgagagc ctacctggag 900
 ggcacgtgcg tggagtggct ccgcagatac ctggagaacg ggaaggagac gctgcagcgc 960
 acggacgccc ccaaaacgca catgactcac cagctgtct ctgaccatga agccacctg 1020
 aggtgctggg ccttgagctt ctacctgcg gaaatcacac tgacctggca gcgggatggg 1080
 gaggaccaga ccaggacac ggagctcgtg gagaccaggc ctgcagggga tggaaccttc 1140
 cagaagtggg cggctgtggt ggtgccttct ggacaggagc agagatacac ctgccatgtg 1200
 cagcatgagg gtttgcccaa gcccttcacc ctgagatggg aggcctccgg aggtcaggta 1260
 caactgcagc agtctgggcc tgagctggag aagcctggcg cttcagtgaa gatatcctgc 1320
 aaggcttctg gttactcatt cactggctac accatgaact gggatgaagca gagccatgga 1380
 aagagccttg agtggattgg acttattact ccttacaatg gtgcttctag ctacaaccag 1440
 aagttcaggg gcaaggccac attaaactgta gacaagtcac ccagcacagc ctacatggac 1500
 ctctcagtc tgacatctga agactctgca gtctatttct gtgcaagggg gggttacgac 1560
 gggagggggt ttgactactg gggccaagg accacggtca ccgtctctc aggtgtaggc 1620
 ggttcaggcg gcggtggctc tggcggggc ggatcggaca tcgagctcac tcagtctcca 1680
 gcaatcatgt ctgcatctcc aggggagaag gtcaccatga cctgcagtc cagctcaagt 1740
 gtaagttaca tgcactggta ccagcagaag tcaggcacct ccccaaaag atggatttat 1800

gacacatcca aactggcttc tggagtccca ggtcgcttca gtggcagtgg gtctggaaac	1860
tcttactctc tcacaatcag cagcgtggag gctgaagatg atgcaactta ttactgccag	1920
cagtggagta agcaccctct cacgttcggt gctgggacaa agttggaaat aaaataatga	1980

REIVINDICAÇÕES

1. Proteína de fusão, caracterizada pelo fato de compreender aminoácidos consecutivos que, começando no término amino da proteína, correspondem a aminoácidos consecutivos presentes em (i) um peptídeo limitado a MHC de citomegalovírus humano, (ii) um primeiro ligador de peptídeo, (iii) uma β -2 microglobulina humana, (iv) um segundo ligador de peptídeo, (v) uma cadeia HLA-A2 de uma molécula de MHC de classe I humana, (vi) um terceiro ligador de peptídeo, (vii) uma região variável de uma cadeia pesada de um fragmento scFv de um anticorpo, e (viii) uma região variável de uma cadeia leve deste fragmento scFv, em que os aminoácidos consecutivos que correspondem a (vii) e (viii) são ligados juntos diretamente por uma ligação peptídeo ou por aminoácidos consecutivos que correspondem a um quarto ligador de peptídeo e o fragmento scFv é derivado de um anticorpo que especificamente liga a mesotelina.

2. Proteína de fusão de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o primeiro ligador de peptídeo tem a seqüência de aminoácido GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 6).

3. Proteína de fusão de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o segundo ligador de peptídeo tem a seqüência de aminoácido GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 8).

4. Proteína de fusão de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o terceiro ligador de peptídeo tem a seqüência de aminoácido ASGG (SEQ ID NO: 10).

5. Proteína de fusão de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o quarto ligador de peptídeo tem a seqüência de aminoácido GVGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 19).

6. Proteína de fusão de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o peptídeo limitado a MHC de citomegalovírus humano tem a seqüência de aminoácido NLVPMVATV (SEQ ID NO: 4).

7. Proteína de fusão de acordo com a reivindicação 1,

caracterizada pelo fato de que a seqüência dos aminoácidos consecutivos correspondendo a (vii), seguido pelo quarto ligador de peptídeo, seguido por (viii) é especificada em SEQ ID NO: 12.

8. Proteína de fusão de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que os aminoácidos consecutivos tem a seqüência de aminoácido especificada em SEQ ID NO: 2.

9. Composição, caracterizada pelo fato de compreender a proteína de fusão como definida em qualquer uma das reivindicações 1-8 e um veículo.

10. Composição de acordo com a reivindicação 9 caracterizada pelo fato de que a proteína de fusão está presente na composição em uma quantidade terapeuticamente eficaz e o veículo é um veículo farmacologicamente aceitável.

11. Construção de ácido nucleico, caracterizada pelo fato de codificar uma proteína de fusão compreendendo aminoácidos consecutivos que, começando no término amino da proteína, correspondem a aminoácidos consecutivos presentes em (i) um peptídeo limitado a MHC de citomegalovírus humano, (ii) um primeiro ligador de peptídeo, (iii) uma β -2 microglobulina humana, (iv) um segundo ligador de peptídeo, (v) uma cadeia HLA-A2 de uma molécula de MHC de classe I humana, (vi) um terceiro ligador de peptídeo, (vii) uma região variável de uma cadeia pesada de um fragmento scFv de um anticorpo, e (viii) uma região variável de uma cadeia leve deste fragmento scFv, em que os aminoácidos consecutivos que correspondem a (vii) e (viii) são ligados juntos diretamente por uma ligação peptídeo ou por aminoácidos consecutivos que correspondem a um quarto ligador de peptídeo e o fragmento scFv é derivado de um anticorpo que especificamente liga a mesotelina.

12. Construção de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 11 caracterizada pelo fato de ter a seqüência de ácido nucleico como especificada em SEQ ID NO:1.

13. Vetor, caracterizado pelo fato de compreender a construção de ácido nucleico como definida na reivindicação 11 ou 12.

14. Vetor de expressão caracterizado pelo fato de compreender a construção de ácido nucleico como definida na reivindicação 11 ou 12 e um
5 promotor ligado operativamente à mesma.

15. Célula transformada caracterizada pelo fato de compreender o vetor como definido na reivindicação 14.

16. Célula transformada de acordo com a reivindicação 15, caracterizada pelo fato de que a célula é uma célula eucariótica selecionada
10 dentre o grupo consistindo de uma célula de mamífero, uma célula de inseto, uma célula de planta, uma célula de levedura, e uma célula de protozoário.

17. Célula transformada de acordo com a reivindicação 15, caracterizada pelo fato de que a célula é uma célula bacteriana.

18. Preparação isolada de corpos de inclusão bacterialmente expressados caracterizada pelo fato de compreender acima de 30 por cento em
15 peso de uma proteína de fusão como definida em qualquer uma das reivindicações 1-8.

19. Processo para produzir uma proteína de fusão caracterizado pelo fato de compreender cultivar a célula transformada como
20 definida na reivindicação 15 ou 16, de modo que uma proteína de fusão é expressada, e recuperar uma proteína de fusão assim expressada.

20. Processo para produzir uma proteína de fusão caracterizado pelo fato de compreender cultivar a célula transformada como
definida na reivindicação 17 de modo que uma proteína de fusão é
25 expressada, e recuperar uma proteína de fusão assim expressada.

21. Processo de acordo com a reivindicação 19 ou 20, caracterizado pelo fato de que a recuperação de uma proteína de fusão compreende submeter a proteína de fusão expressada a cromatografia de exclusão de tamanho.

22. Processo de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que a proteína de fusão é expressada em corpos de inclusão.

23. Processo de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de ainda compreender tratar os corpos de inclusão de modo a separar e reduplicar a proteína de fusão e assim produzir uma proteína de fusão em uma forma biologicamente ativa.

24. Processo de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que o tratamento dos corpos de inclusão para separar uma proteína de fusão dos mesmos compreende contatar os corpos de inclusão com um agente desnaturante.

25. Método para matar seletivamente uma célula de tumor, caracterizado pelo fato de que compreende contatar a célula com uma proteína de fusão como definida em qualquer uma das reivindicações 1-8 em uma quantidade eficaz para iniciar uma resposta imune mediada por CLT contra a célula de tumor de modo a assim matar a célula de tumor.

26. Método de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que a célula de tumor está em um paciente e o contato é efetuado por administração da proteína de fusão ao paciente.

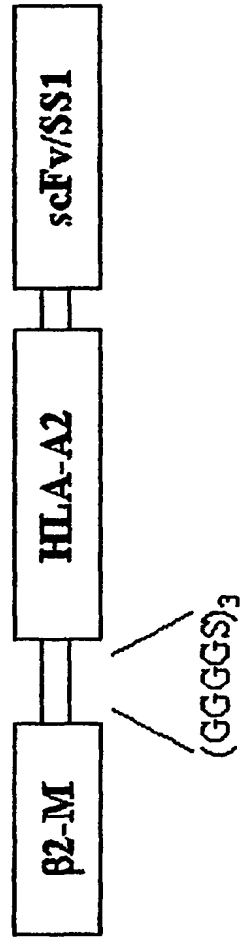
27. Método para tratar uma célula de tumor que expressa mesotelina em sua superfície, caracterizado pelo fato de compreender contatar a célula de tumor com uma proteína de fusão como definida em qualquer uma das reivindicações 1-8 em uma quantidade eficaz para iniciar uma resposta imune mediada por CTL contra a célula de tumor de modo a assim tratar a célula de tumor.

28. Método de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que a célula de tumor está presente em um tumor sólido.

29. Método de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que o tumor sólido está associado com câncer ovariano, pulmão, pancreático ou cabeça/pescoço, ou mesotelioma.

Fig 1

A. scHLA-A2/SS1(scFv)



B. pep/scHLA-A2/SS1(scFv)

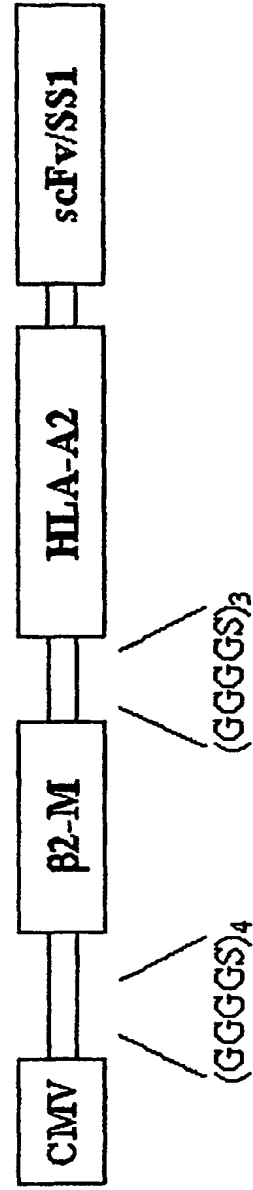


Fig 2

ATGAACCTGGTGCCGATGGTCGGACCGTGGAGGTGGCGGTTCTGGCGGAGGAGGATCCGGTGGCGGA
 GGTTCAGGAGCGGTGGATCGATCCAGCGTACTCCAAGATTCAGGTTTACTCACGTATCCAGCAGAGAA
 TGGAAAGTCAAAATTCCTGAATTGCTATGTCTGGTTTCATCCATCCGACATTGAAGTTGACTTACTGAAG
 AATGGAGAGAGAAATTGAAAAGTGGAGCATTCAGACTTGCTTTTTTCGAAGGACTGGTCTTTCTATCTCTTGT
 ACTACACTGAATTCACCCCACTGAAAAGATGAGTATGCCGTGCCGTGTGAACCATGTGACTTTGTACAGC
 CCAAGATAGTTAAGTGGATCGCGACATGGGTGGCGTGAAGCGCGGTGAGGCTCTGGTGGAGGTG
 GCAGCGCTCTCACTCCATGAGGTATTTCTTCACATCCGTGTCGCCGCCGCCGGGAGCCCGCTT
 CATCGCAGTGGCTACGTGGACGACACGAGTTCTGTGGTTCGACAGCGACGCCGCCGAGCCAGAGGAT
 GGAGCCGCGGCGCGTGGATAGAGCAGGAGGTCCGGAGTATTGGACGGGGAGACACGGAAGTGA
 AGGCCACTCACAGACTACCGAGTGGACCTGGGACCTGCGGGCTACTAACACGAGCGAGGCCG
 GTTCTCACACCGTCCAGAGGATGTATGGCTCGACGTGGGTCCGACTGGCGCTTCTCCGCGGTACCA
 CCAGTACCGTACGACGGCAAGGATTACATCGCCCTGAAAGAGGACCTGGCTCTTGGACCGCGCGGAC
 ATGGCAGCTCAGACCACCAAGCACAAGTGGGAGCGGCCCATGTAGCGGAGCAGTTGAGAGCCTACCTGG
 AGGGCAGTGGTGGAGTGGCTCCGCAGATACCTGGAGAACGGGAAGGAGACGCTGCAGCGCACGGACG
 CCCCCAAACGCACATGACTCACACCGCTGTCTCTGACCATGAAGCCACCTGAGGTGCTGGCCCTGAG
 CTTCTACCCCTGGGAGATCACACTGACCTGGACCGGGATGGGAGGAGCACGACCCAGGACACGGAGCTC
 GTGGAGACAAGGCTGCAGGGGATGGAACCTCCAGAAGTGGCGGCTGTGGTGCCTTCTGGACAG
 GAGCAGAGATACACCTGCCATGTGCAGCATGAGGTTTGGCCAGCCCTCACCTGAGATGGAGGCTT
 CCGGAGGTCAGGTACAACCTGCAGCAGTCTGGGCTGAGCTGGAGAAGCCTGGCGCTTCAGTGAAGATATC
 CTGCAAGGCTTCTGTTACTATTCACTGGCTACACCATGAACCTGGTGAAGCAGAGCCATGGAAAGAGCC
 TTGAGTGGATTGGACTTATTACTCCTTACAATGGTGCTTAGCTACAACCAAGATTGAGGGCAAGGCCA
 CATTAACTGTAGACAAGTCATCCAGCACAGCCTACATGGACCTCCTCAGTCTGACATCTGAAGACTCTGCAG
 TCTATTTCTGTCAAGGGGGTTACGACGGGAGGGTTTTGACTACTGGGGCCAAAGGACCCACGGTCAC
 CGTCTCCTCAGGTGATGGCGGTTACGGCGGCTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGGACATCGAGCTCAC
 TCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAGGTCAACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAAGTG
 TAAGTTACATGCACTGTACCGAGCAAGTCAGGCACCTCCCCAAAAGATGGATTATGACACATCCAAAC
 TGGCTTCTGGAGTCCAGGTGCTTCACTGGCAGTGGGTCTGGAACTCTTACTCTCTCACAAATCAGCAGC
 GTGGAGGCTGAAGATGATGCAACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAAGCACCCCTCTCACGTTCCGTGCTGG
 GACAAAGTTGGAAATAAAATAATGA

Fig 3

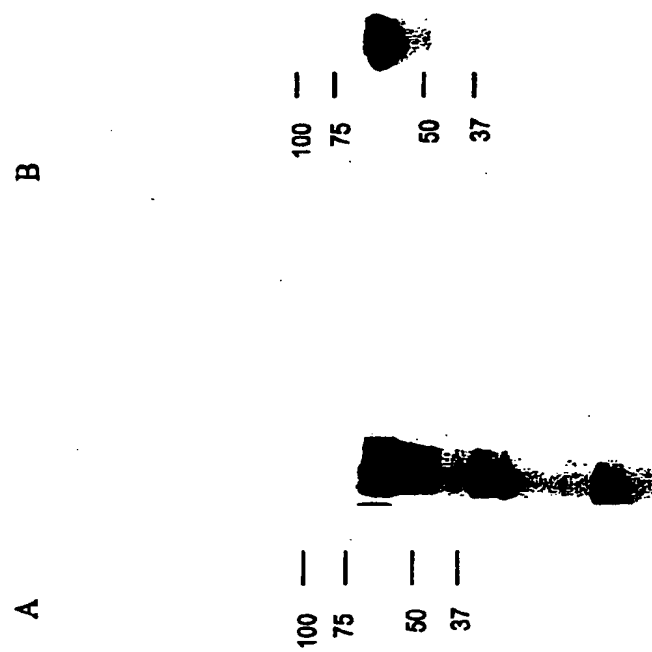


Fig 4

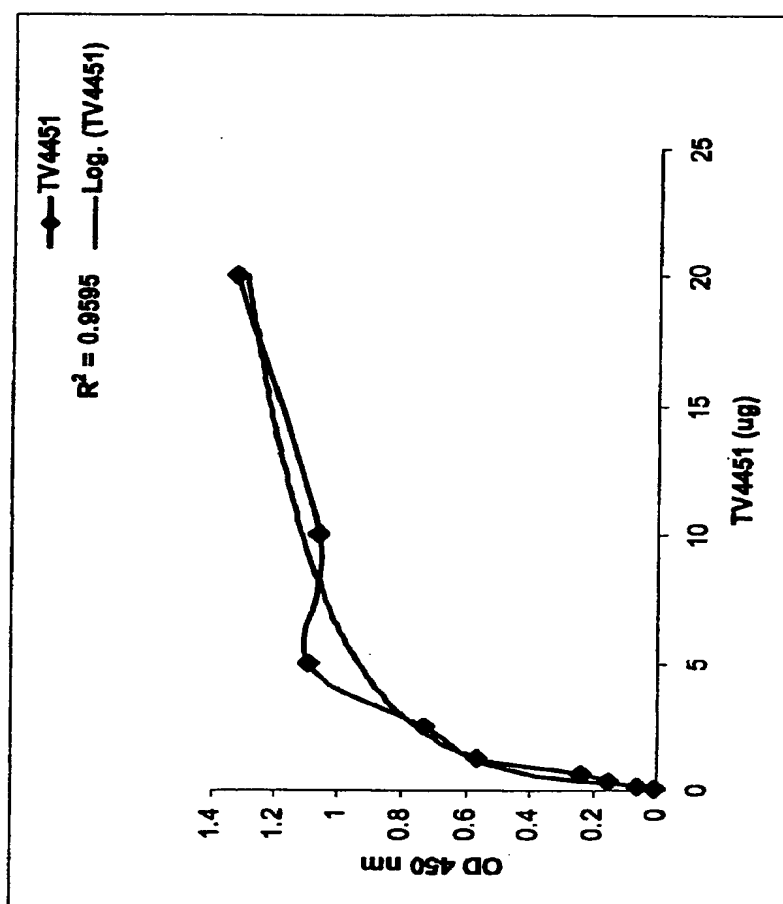


Fig 5

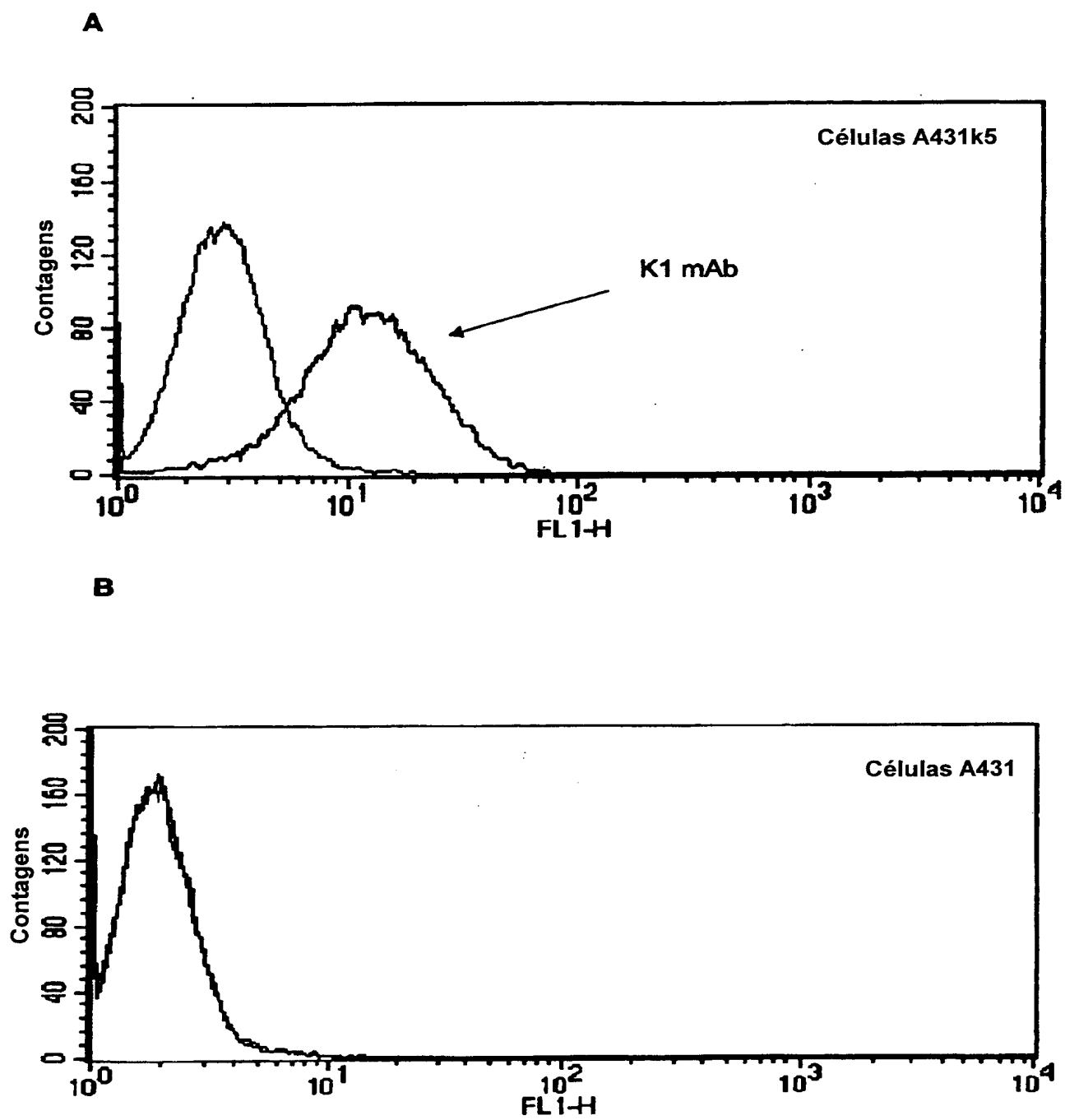


Fig 5 cont.

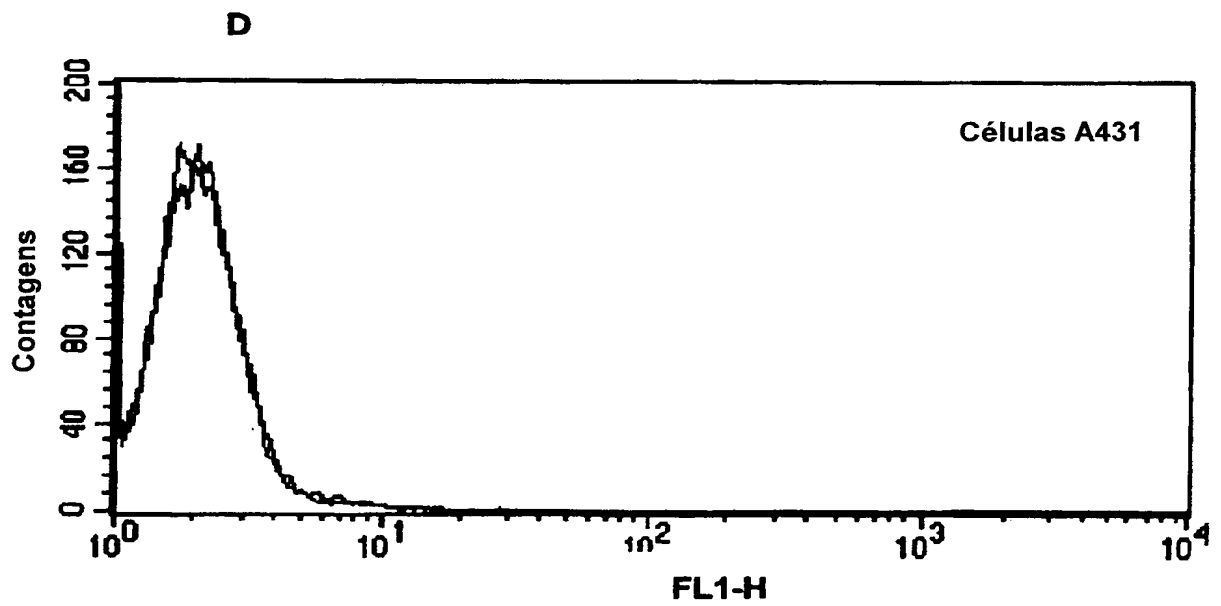
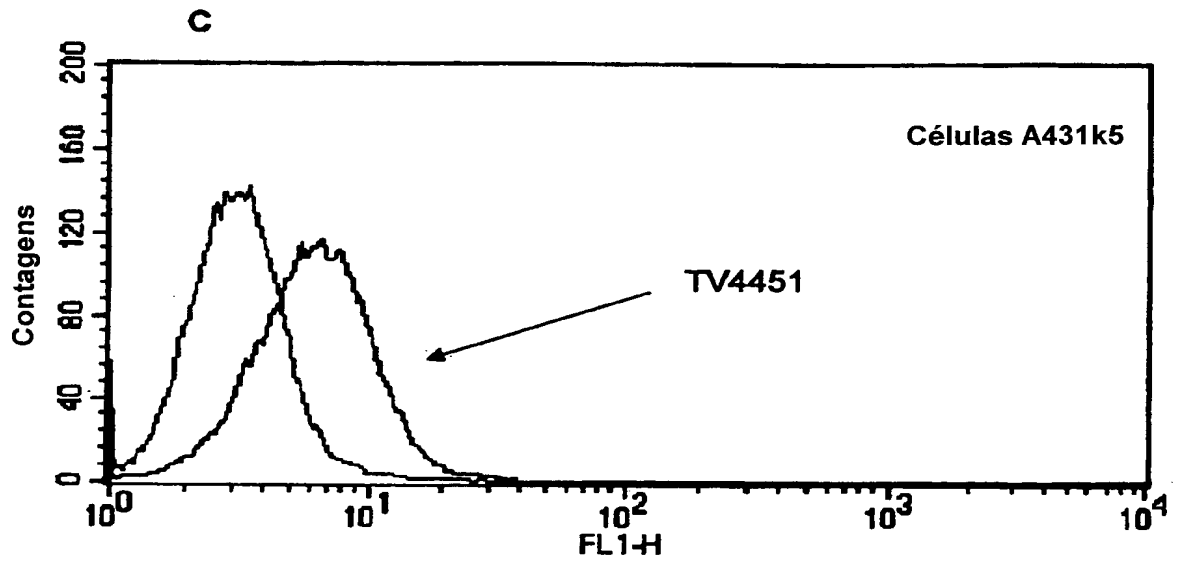


Fig 6

A

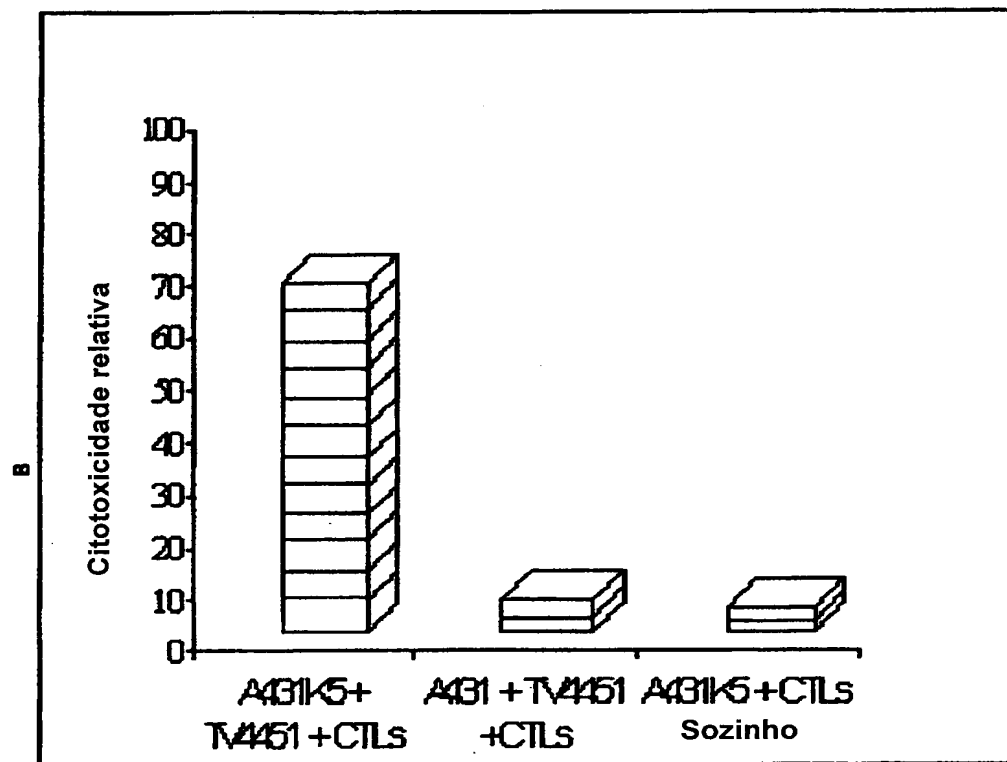


Fig 6 cont.

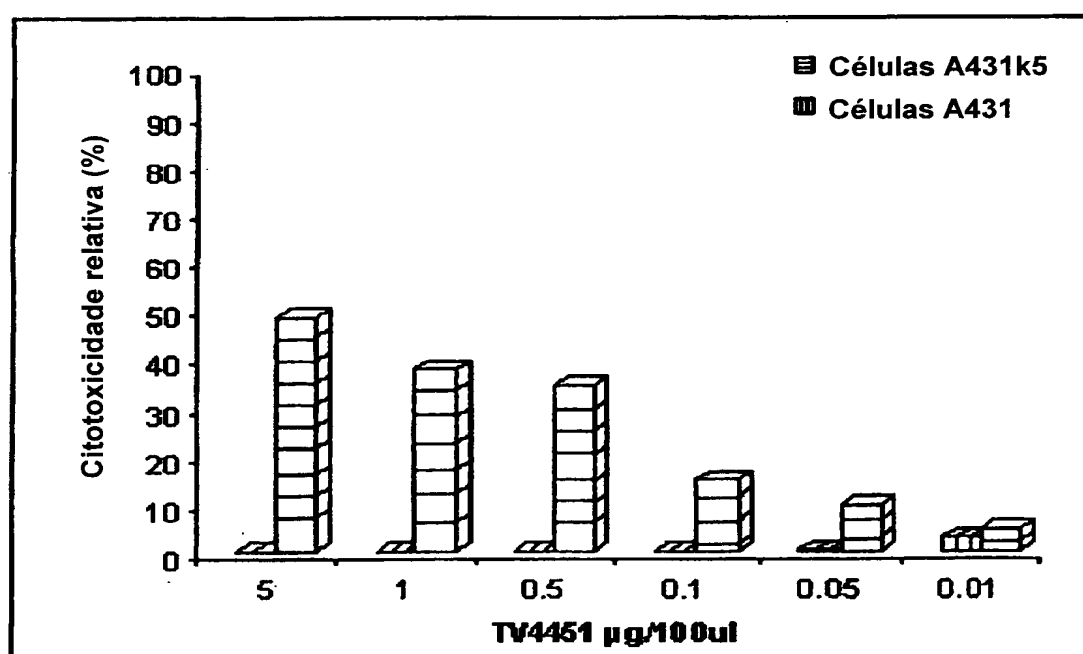
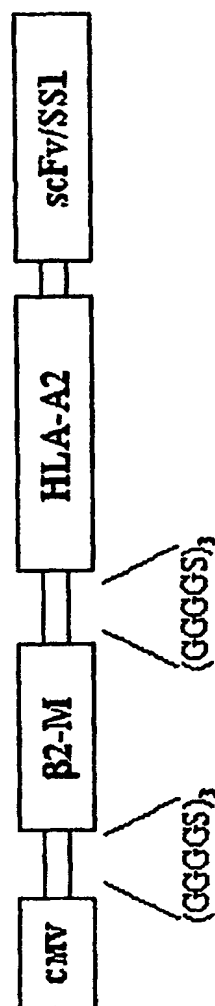
B

Fig 7

A. pep/scHLA-A2/SS1(scFv)



5'ATGAACCTGGTCCGATGGTCGGACCGTTGGCGGAGGAGGATCCGGTGGCGGAGGTTTCAGGAGCGGTGGATC F
GATCCAGCGTACTCCAAGATTACAGTTTACTCAGGTCTATCCAGCATCCAGCAGAGAAATGAAAGTCAAATTTCTGAATTGCTATG 12
TGCTGGGTTTCATCCATCCGACATTGAAGTTGACTTACTGAAGATGGAGAGAGAAATTGAAAAGTGGAGCATTTCAGA 19
CTTGCTTTTTCGAAGGACTGGTCTTTCTATCTCTTGACTACACTGAATTCACCCCACTGAAAAGATGAGTATGCCT 26
GCCGTGTGAACCATGTGACTTTGTACAGCCCCAAGATAGTTAAGTGGATCGCGACATGGGTGGCGTGAAGCGGC 33
GGTGAGGCTCTGGTGAGGTGGCAGCGGCTCTCACTCCATGAGGTATTTCTTCACATCCGTGTCCCGCCCGGCCG
CGGGAGCCCCGCTTCATCGCAGTGGCTACGTGGACGACACGCAGTTCTGTGGTTCGACAGCGACGCCGCGAGC
CAGAGGATGGAGCCGCGCGGTGGATAGACGAGGAGGTTCCGGAGTATTGGGACGGGAGACACGGAAAGTGA
AGGCCCACTCACAGACTCACCAGTGGACCTGGGACCTCGCGGCTACTACAACGAGAGCGCGGTTCTCAC
ACCGTCCAGAGGATGTATGGCTCGACGTGGGTGGACTGGGCTTCTCCGCGGTACCACTGCGGTACGCGTACGA
CGGCAAGGATTACATCGCCCTGAAAGAGGACCTGCGCTCTTGGACCGGGGACATGGCAGCTCAGACCACCAAGC
ACAAGTGGAGCGGCCCATGTAGCGGAGCAGTTGAGAGCCTACCTGGAGGGCACGTGCGTGGAGTGCTCCGCGAG
ATACCTGGAGAACGGGAAGGAGACGCTGCAGCGCACGGACGCCCAACGACACATGACTACCACTGCTCTCTG
ACCATGAAGCCACCTGAGGTGCTGGCCCTGAGCTTCTACCTGCGGAGATCACACTGACCTGCGCAGCGGATGGG
GAGGACCAAGCCAGGACCGAGCTCGTGGAGACCAAGGCTGCAGGGATGGAACCTTCCAGAAGTGGCGGCTG
TGGTGTGCCCTTCTGGACAGGAGCAGAGATACACCTGCCATGTGCAGCATGAGGTTTGGCCAAAGCCCTCACCCCTGA
GATGGAGGCTTCCGAGGTCAGGTACAACTGCAGCAGTCTGGCCCTGAGCTGGAGAACCTGGCGTTTCAGTGAAG
ATATCCTGCAAGGCTTCTGTTACTCATTCACTGGCTACACCATGAAGTGGTGAAGCAGAGCCATGGAAGAGCCTTG
AGTGGATTGGACTTATTACTCCTTACAATGGTGTCTTAGCTACAACCAAGATTTCAGGGCAAGGCCACATTAACTGT
AGACAAGTCATCCAGCACAGCCTACATGGACCTCCTCAGTCTGACATCTGAAGACTCTGCAGTCTATTTCTGTGCAAGG
GGGGTTACGACGGGAGGGTTTTGACTACTGGGCCAAAGGACCAAGGTCACCGTCTCCTCAGGTGAGGCGGTTT
AGGCGCGGCTGGCTCTGGCGGTGGGATCGGACATCGAGCTCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAG
GGGAGAAGGTACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGAAGTTACATGCACCTGGTACCAGCAGAAAGTCAGGCACCT
CCCCCAAAGATGGATTTATGACACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCAGGTCGCTTCAGTGGCAGTGGGCTTGAA
ACTCTTACTCTCTCACAAATCAGCAGCGGTGGAGGCTGAAGATGATGCAACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAAGCACCC
TCTCAGGTTCCGTGCTGGGACAAAGTTGGAAATAAAATAATGA3'

Fig 9

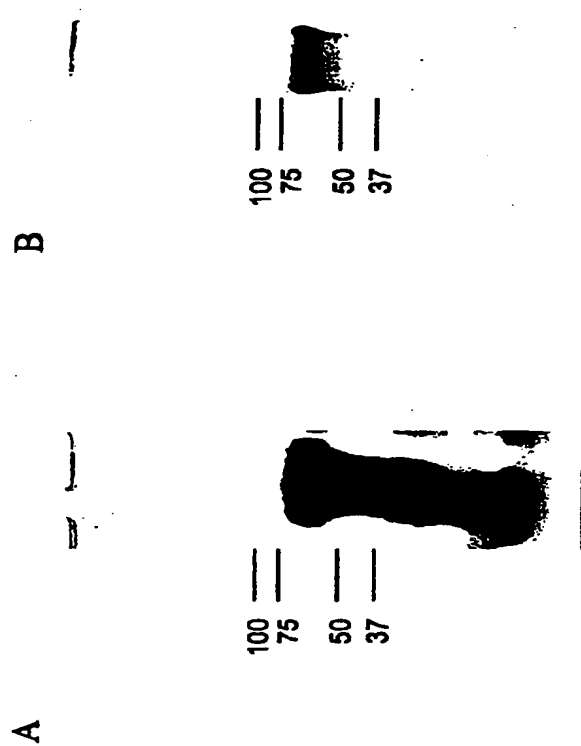


Fig 10

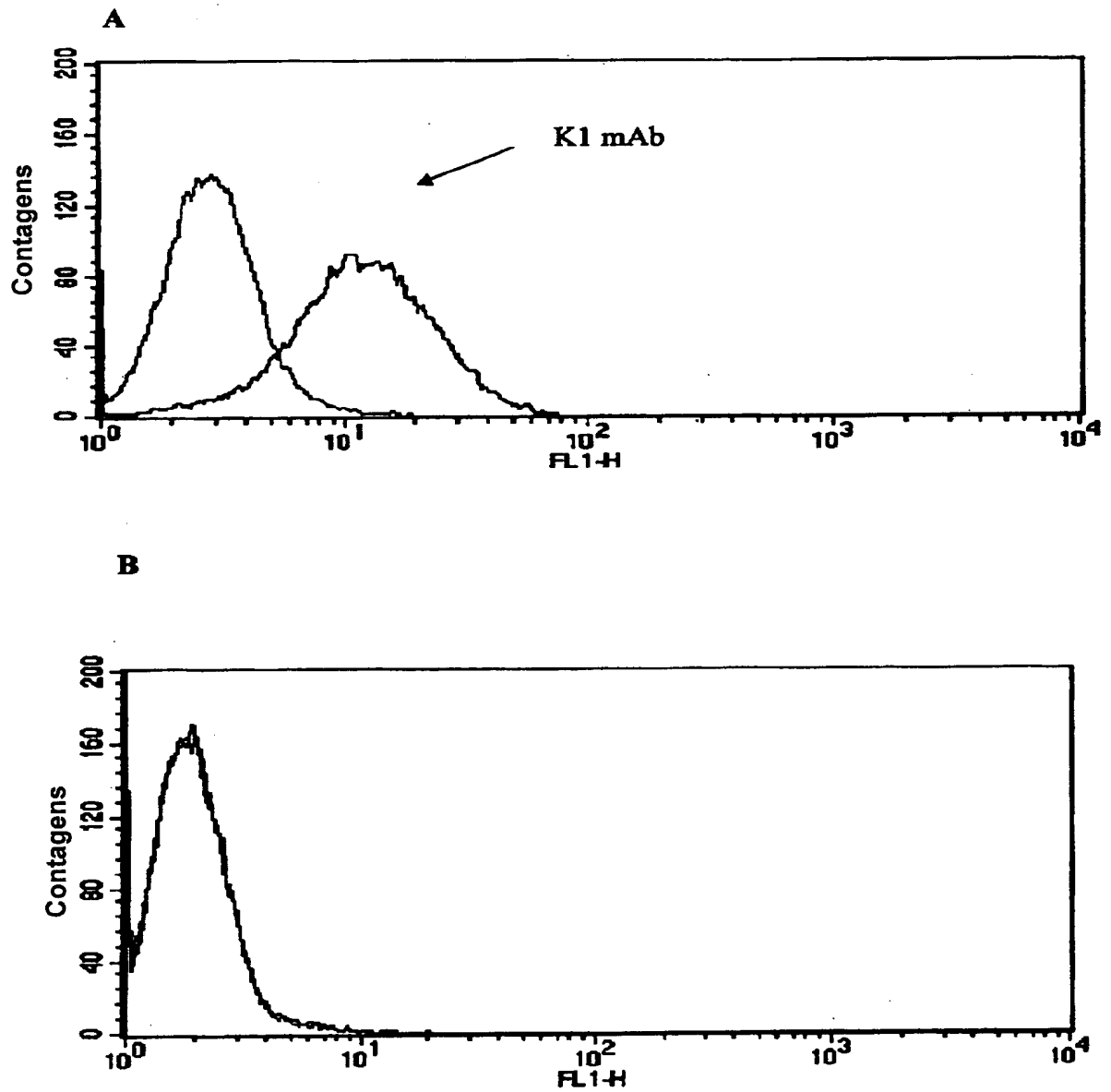
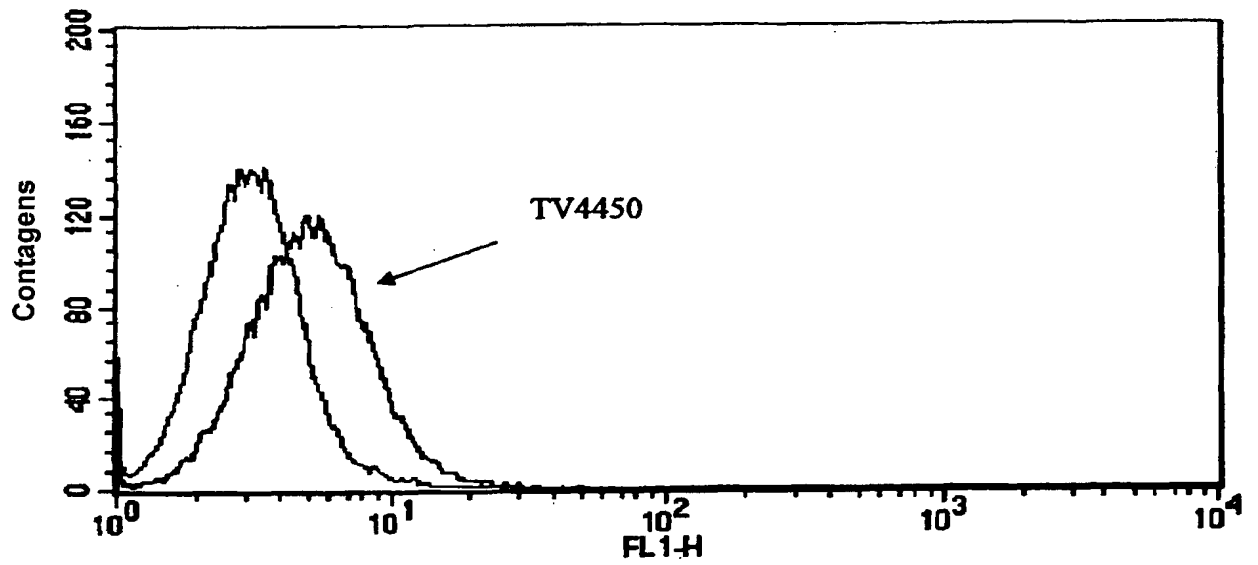


Fig 10 cont.

C



D

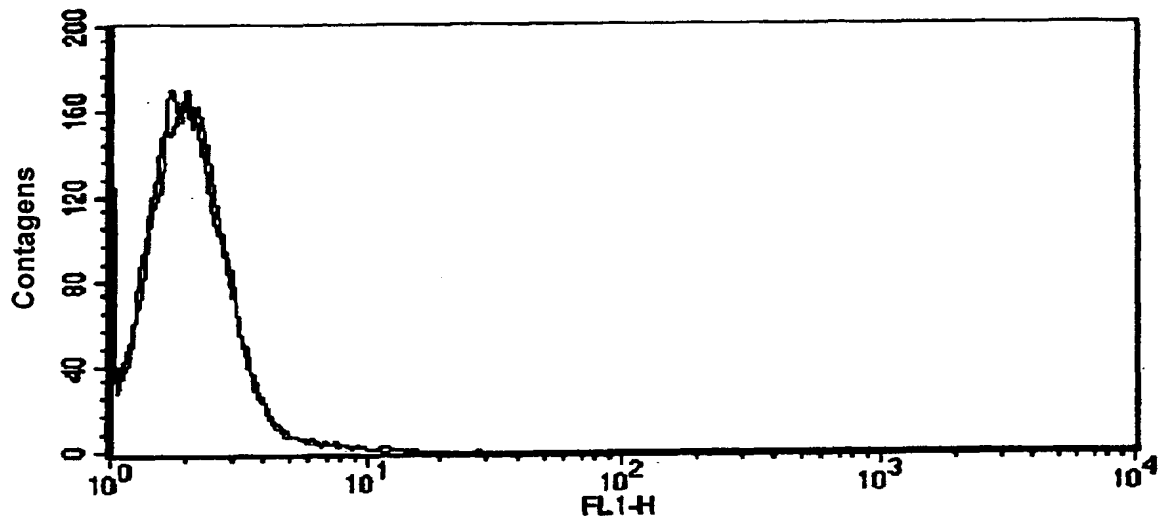


Fig 10 cont.

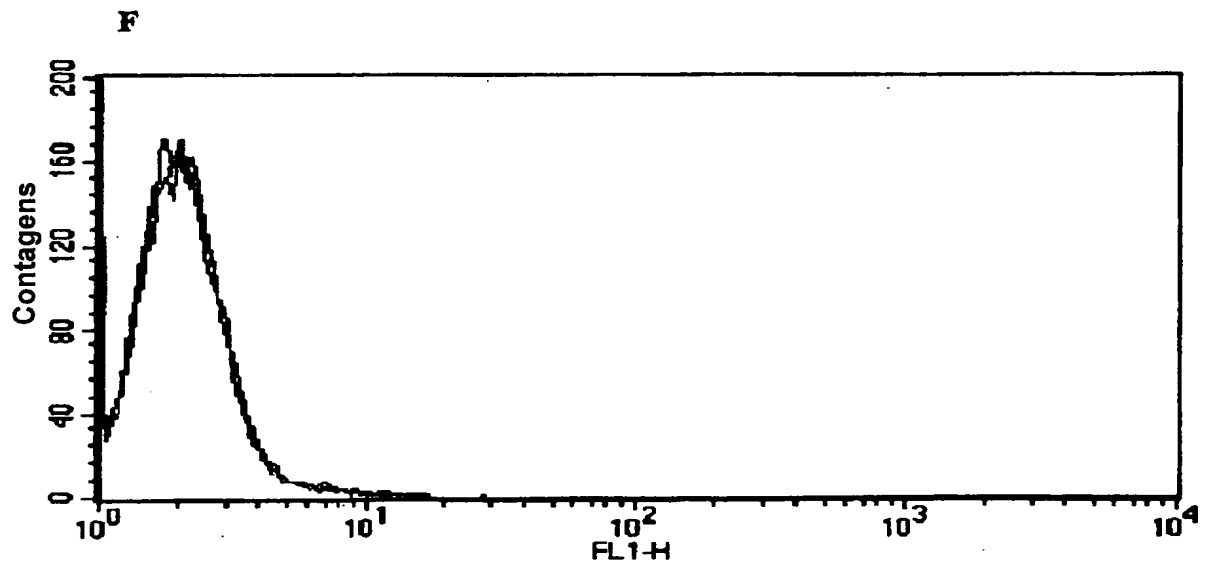
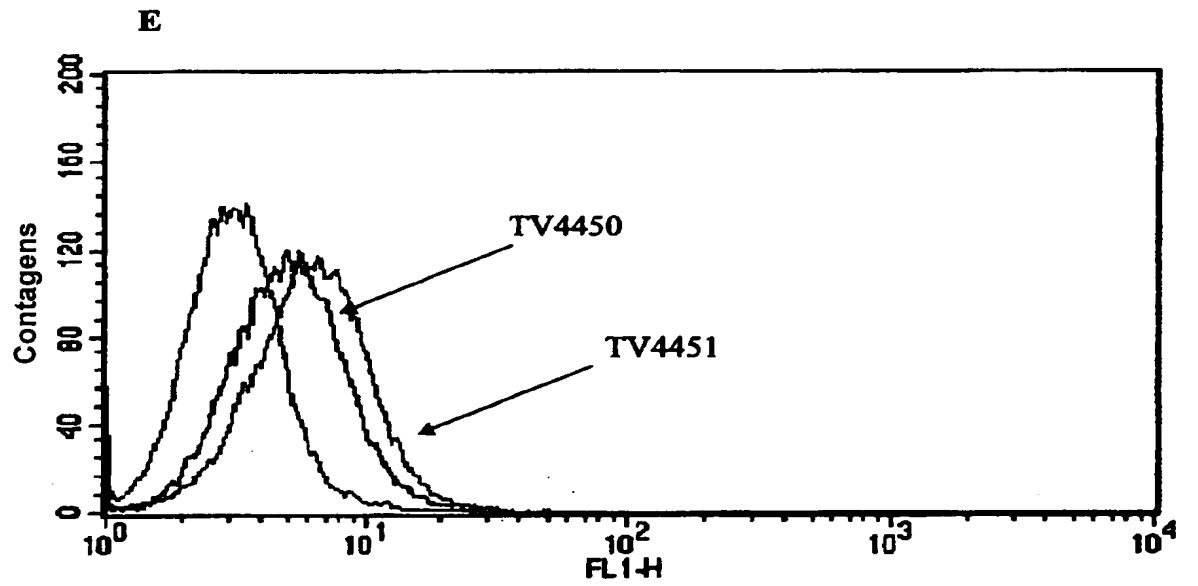


Fig 11

A

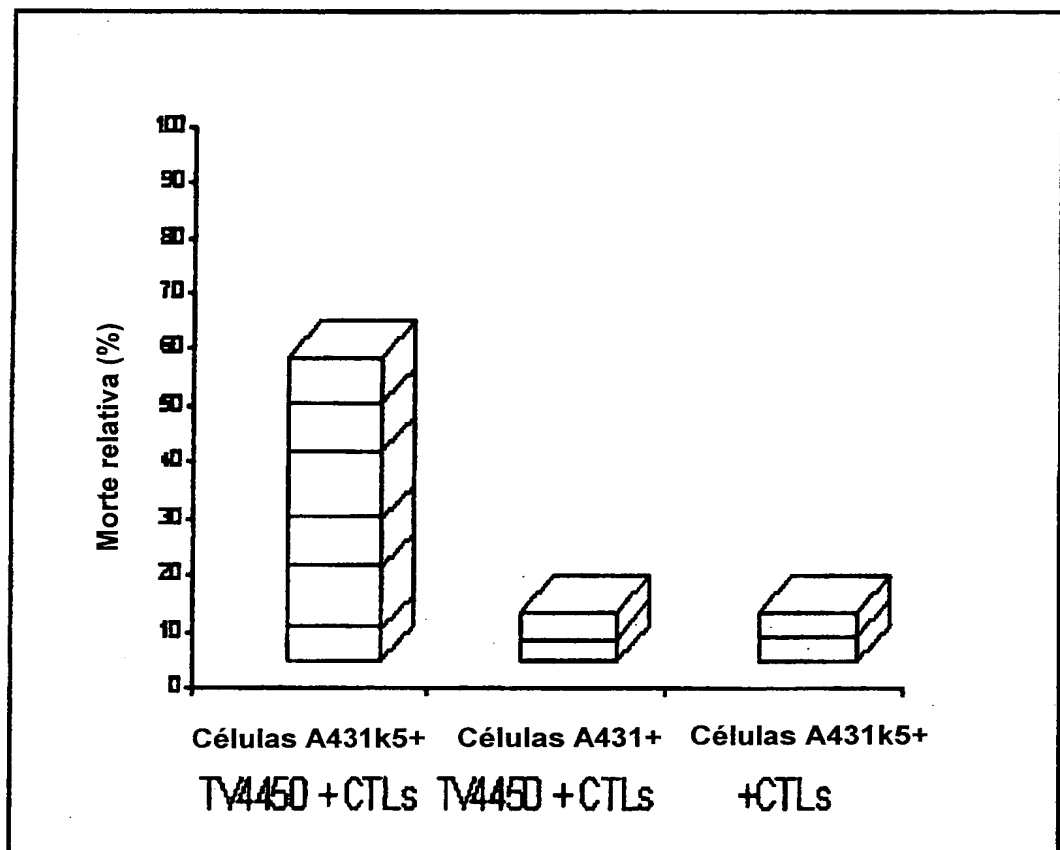


Fig 11 cont.

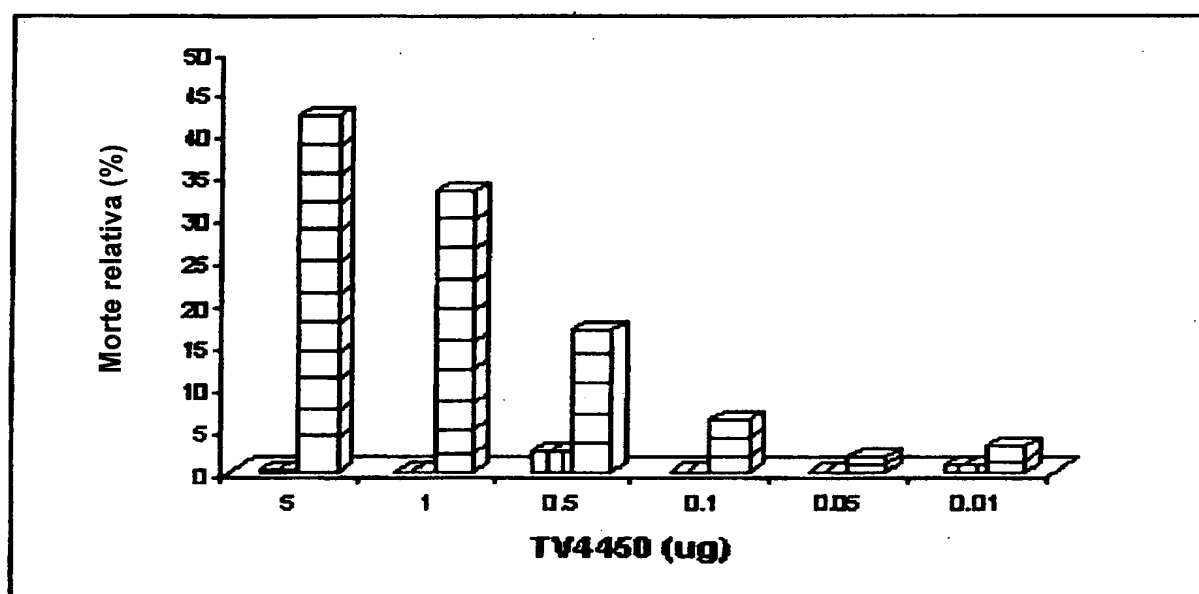
B

Fig 12

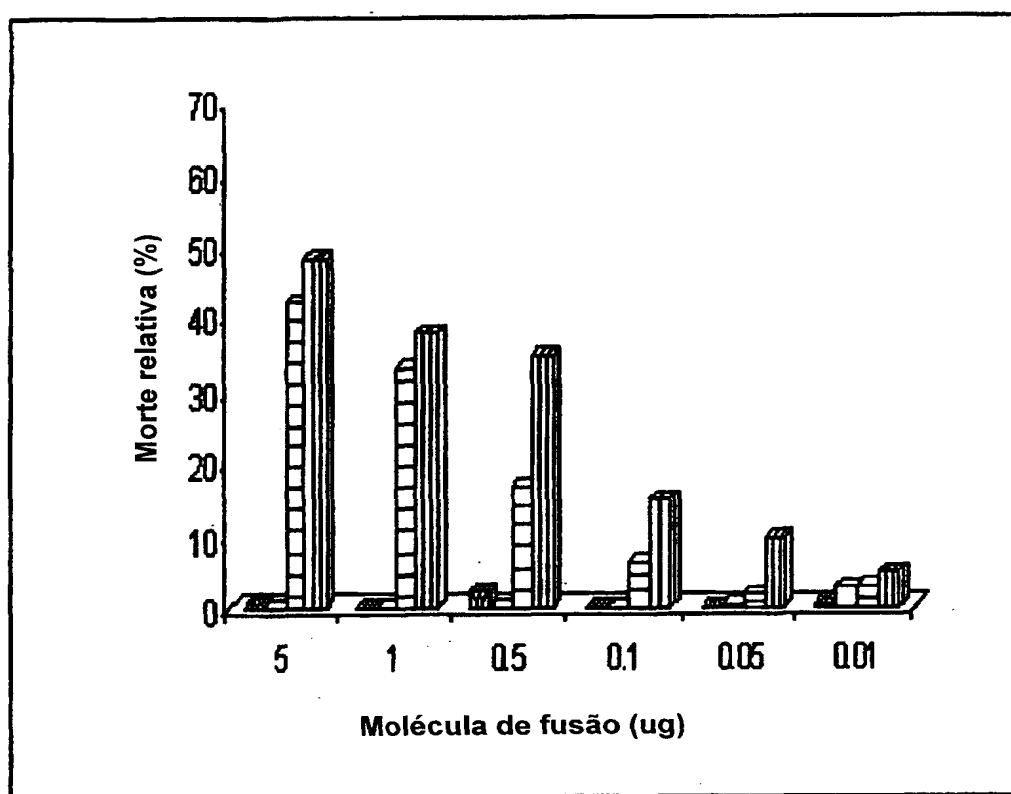
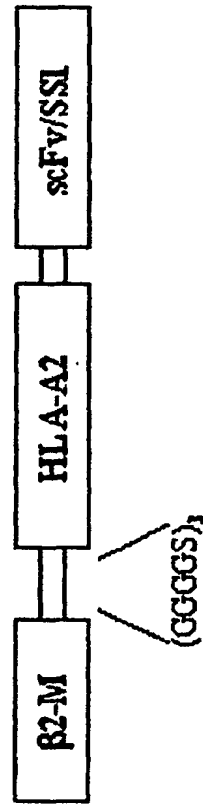


Fig 13

A. scHLA-A2/SS1(scFv)



B. M1/scHLA-A2/SS1(scFv)

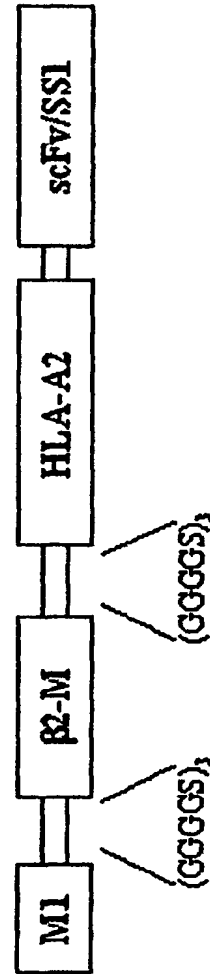


Fig 14

ATGGGCATTCTGGGCTTCGTGTTTACCCCTGGGGCGGAGGAGGATCCGGTGGCGGAGGTTCAGGAGCGGTG
 GATCGATCCAGCGTACTCCAAAGATTTCAGGTTTACTCACGTCTATCCAGCAGAGAAATGAAAGTCAAATTTCTCT
 GAATTGCTATGTCTGGGTTTATCCATCCGACATTGAAGTTGACTTACTGAAGAATGGAGAGAAATTGAAA
 AAGTGGAGCAATTCAGACTTGCTTTTTCAAGGACTGGTCTTTCTATCTCTTGTACTACTGAATTCACCCCC
 ACTGAAAAGATGAGTATGCCCTGCCGTGTGAACCATGTGACTTTGTACAGCCCAAGATAGTTAAGTGGGATC
 GCGACATGGGTGGCGGTGAAGCGCGGTGAGGCTCTGGTGGAGTGGCAGCGGCTCTCACTCCATGAG
 GTATTTCTCACATCCGTGTCCCGGCCCGCGGGAGCCCGCTTCATCGCAGTGGGCTACGTGGACG
 ACACGCAGTTCGTGCGGTTGACAGCGACCGCGGAGCCAGAGGATGGAGCCGGCGCGCGGTGATAGA
 GCAGAGGGTCCGGAGTATTGGACGGGAGACACGGAAAGTGAAGGCCCACTCACAGACTCACCGAGTGG
 ACCTGGGACCCCTGCGCGGCTACTAACACAGAGCGAGCGGTTCTCACACCGTCCAGAGGATGTATGGC
 TCGACGTGGGTCCGACTGGCGCTTCTCCGGGTACCACTGACGCTACGCGTACGACGGCAAGGATTACAT
 CGCCCTGAAAGAGGACCTGCGCTCTTGACCGCGCGGACATGGCAGCTCAGACCAACCAAGCAAGTGGG
 AGCGGCCCATGTAGCGGAGCAGTTGAGAGCCTACCTGGAGGGCACGTGCGTGGAGTGGCTCCGCAGATAC
 CTGGAGAACGGGAAGAGACGCTGCAGCGCACGGACGCCCCCAACGCACATGACTCACCGCTGTCTC
 TGACCATGAAGCCACCTGAGGTGCTGGGCCCTGAGCTTCTACCTGCGGAAATCACACTGACCTGGCAGCG
 GGATGGGAGGACCAACCCAGGACACGGAGCTCGTGGAGACCAAGGCTGCAGGGATGGAACCTTCCAG
 AAGTGGCGGCTGTGGTGCCTTCTGGACAGGAGCAGAGATACACCTGCCATGTGCAGCATGAGGGTTT
 GCCCAAGCCCCCTCACCTGAGATGGAGGCTTCCGGAGGTCAAGTACAACTGCAGCATCTGGCCTGAGC
 TGGAGAAGCCTGGCGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGTTACTCATTCACTGGCTACACCATGAA
 CTGGGTGAAGCAGAGCCATGGAAGAGCCTTGAGTGGATTGGACTTATTACTCCTTACAAATGGTCTTAGC
 TACAACCAGAAGTTCAGGGGCAAGGCCACATTAACTGTAGACAAGTCAATCCAGCACAGCCTACATGGACCTCC
 TCAGTCTGACATCTGAAGACTCTGCAGTCTATTCTGTGCAAGGGGGGTACGACGGGAGGGTTTGGACTA
 CTGGGGCCAAAGGACCAAGTCCAGTCTCCTCAGGTGTAGCGGTTCAAGCGCGGTGCTCTGGCGGT
 GCGGATCGGACATCGAGCTCACTCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAGTCAACATG
 ACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAATTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGTCAAGGACCTCCCCAAAAGAT
 GGATTTATGACACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCAGGTCCGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGAACCTCTTA
 CTCTCTCACAAATCAGCAGCGTGGAGGCTGAAGATGATGCAACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAAGCACCCCT
 CTCACGTTGGTCTGGGACAAAGTTGGAATAAATAATGA

Fig 15

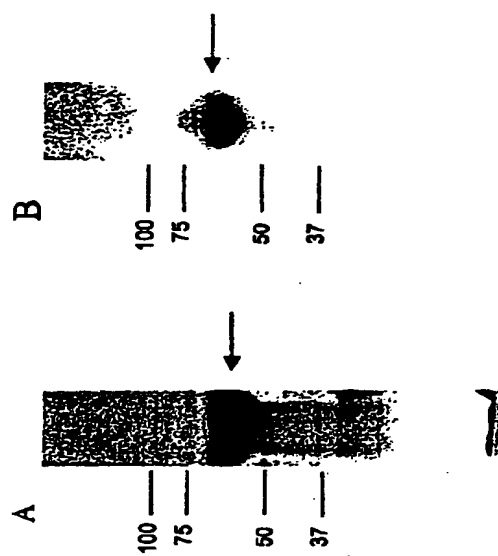


Fig 16

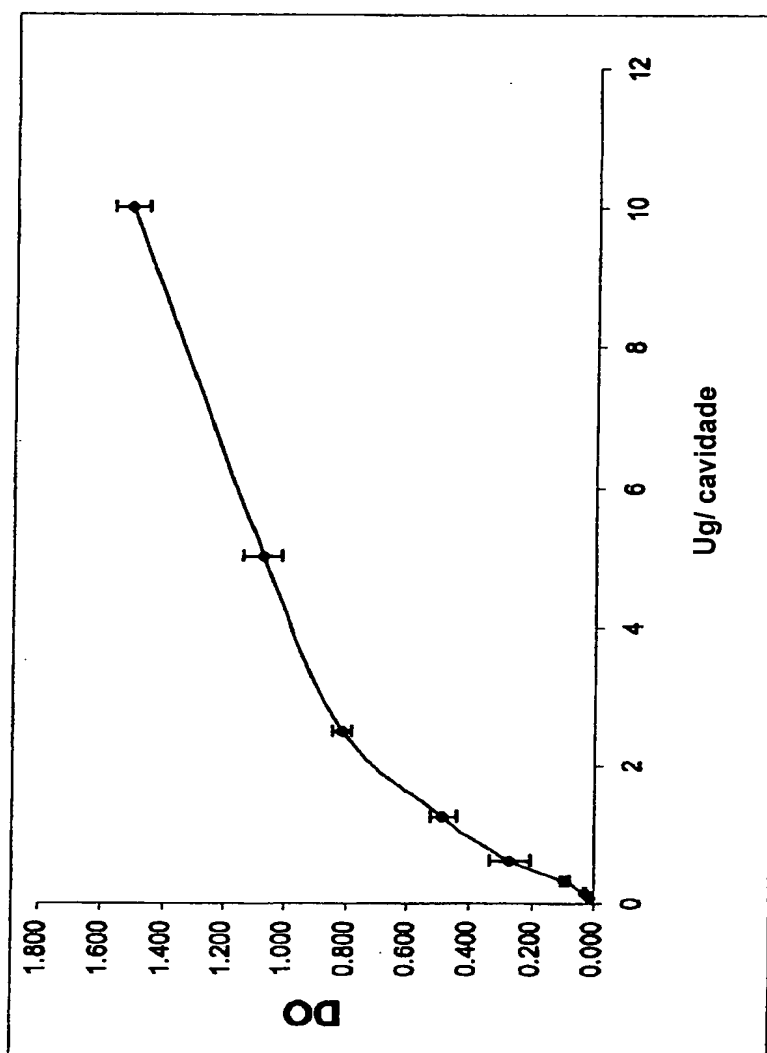


Fig 17

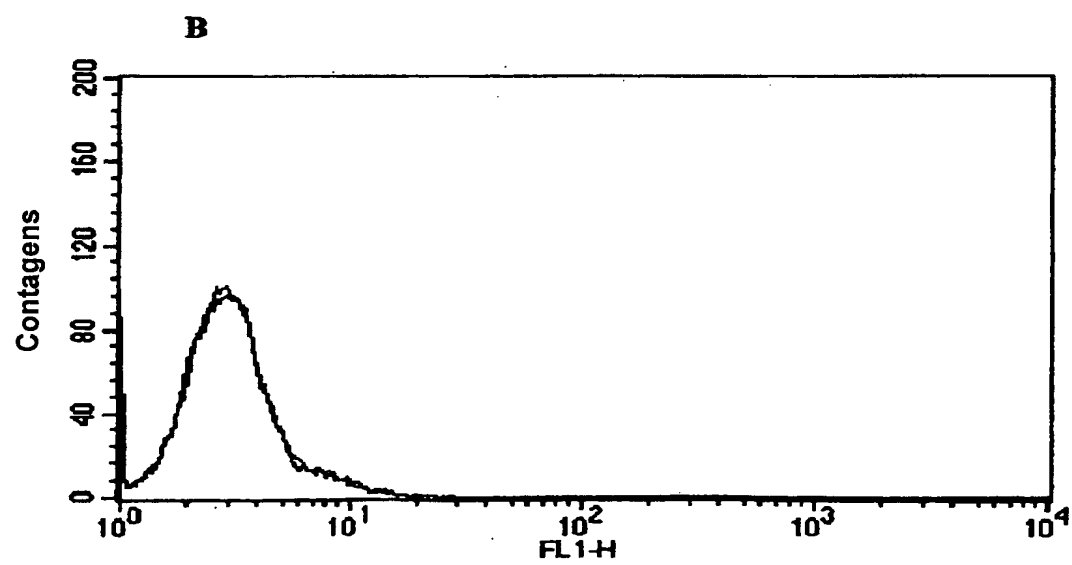
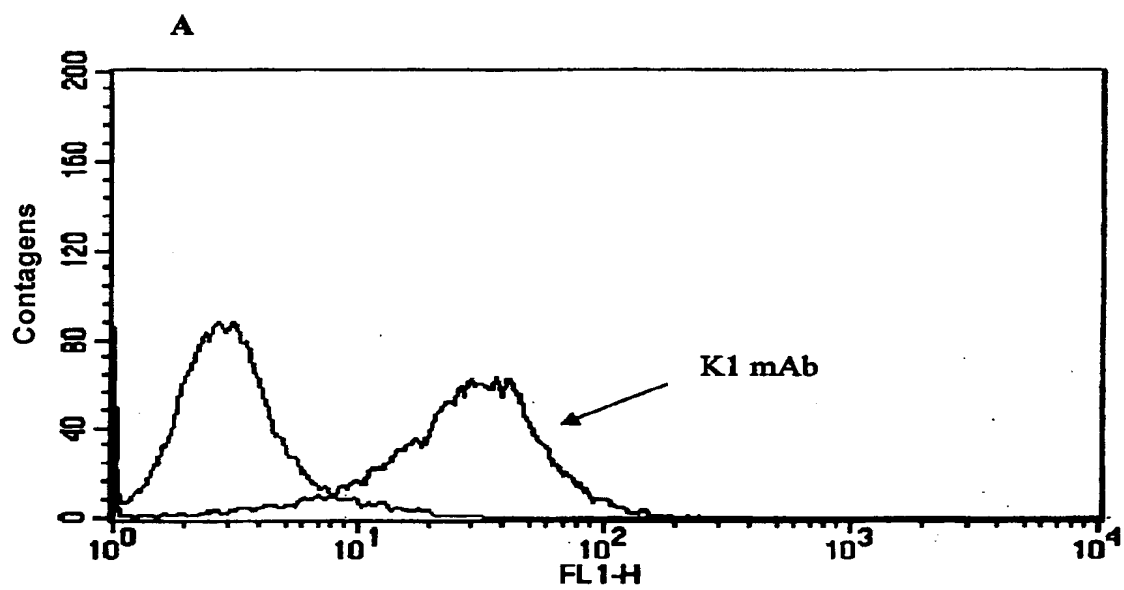


Fig 17 continued

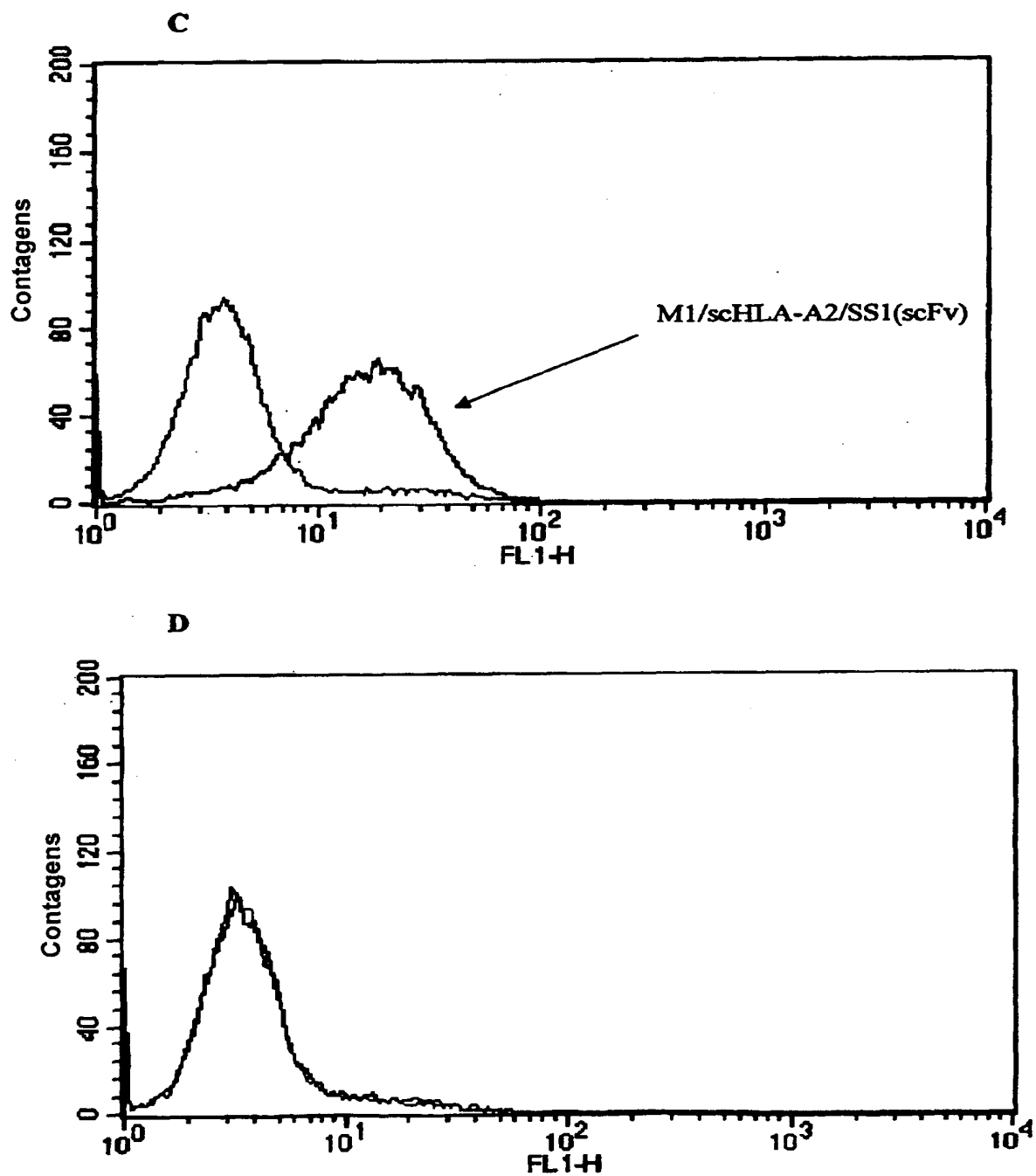
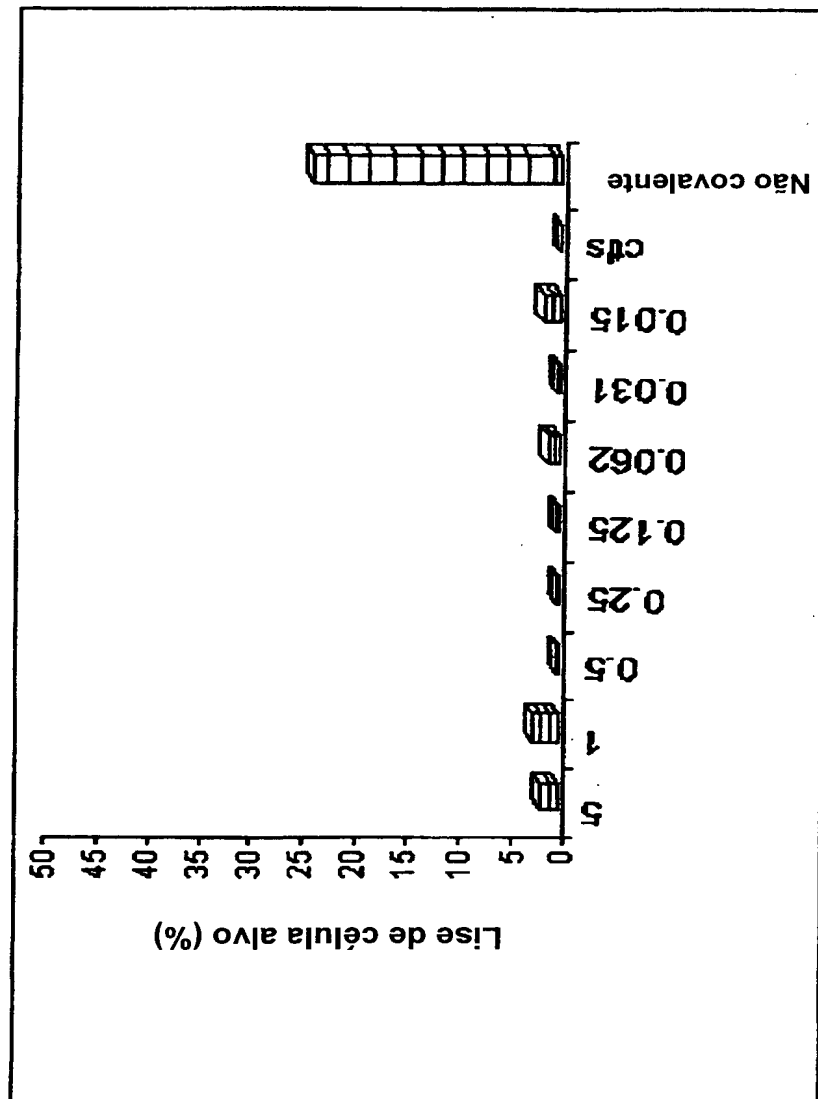


Fig 18



RESUMO

“PROTEÍNA DE FUSÃO, COMPOSIÇÃO, CONSTRUÇÃO DE ÁCIDO NUCLEICO, VETOR, CÉLULA TRANSFORMADA, PREPARAÇÃO ISOLADA DE CORPOS DE INCLUSÃO BACTERIALMENTE EXPRESSADOS, PROCESSO PARA PRODUZIR UMA PROTEÍNA DE FUSÃO, E, MÉTODOS PARA MATAR SELETIVAMENTE UMA CÉLULA DE TUMOR E PARA TRATAR UMA CÉLULA DE TUMOR QUE EXPRESSA MESOTELINA EM SUA SUPERFÍCIE”

Esta invenção provê proteínas de fusão compreendendo aminoácidos consecutivos que, começando no término amino da proteína, correspondem a aminoácidos consecutivos presentes em (i) um peptídeo limitado a MHC de citomegalovírus humano, (ii) um primeiro ligador de peptídeo, (iii) uma β -2 microglobulina humana, (iv) um segundo ligador de peptídeo, (v) uma cadeia HLA-A2 de uma molécula de MHC de classe I humana, (vi) um terceiro ligador de peptídeo, (vii) uma região variável de uma cadeia pesada de um fragmento scFv de um anticorpo, e (viii) uma região variável de uma cadeia leve deste fragmento scFv, em que os aminoácidos consecutivos que correspondem a (vii) e (viii) são ligados juntos diretamente por uma ligação peptídeo ou por aminoácidos consecutivos que correspondem a um quarto ligador de peptídeo, em que o anticorpo do qual o fragmento scFv é derivado especificamente liga a mesotelina. Esta invenção provê construções de ácido nucleico codificando os mesmos, processos para produzir os mesmos, composições e usos dos mesmos.