

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 923 133**

51 Int. Cl.:

C07K 19/00	(2006.01)	C07K 14/445	(2006.01)
A61K 39/00	(2006.01)	C07K 16/00	(2006.01)
A61K 47/69	(2007.01)	C12N 15/62	(2006.01)
A61K 49/00	(2006.01)	C12N 15/85	(2006.01)
A61K 51/10	(2006.01)	G01N 33/53	(2006.01)
A61K 9/00	(2006.01)	A61K 39/015	(2006.01)
A61K 9/51	(2006.01)	A61K 47/68	(2007.01)
A61P 33/06	(2006.01)	B82Y 5/00	(2011.01)
A61P 35/00	(2006.01)	C07K 16/28	(2006.01)
A61P 37/04	(2006.01)	G01N 33/58	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.08.2018 PCT/CA2018/050954**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.02.2019 WO19023811**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.08.2018 E 18841800 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.03.2022 EP 3661968**

54 Título: **Plataforma de nanopartículas para el suministro de anticuerpos y vacunas**

30 Prioridad:

04.08.2017 US 201762541209 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.09.2022

73 Titular/es:

**THE HOSPITAL FOR SICK CHILDREN (50.0%)
686 Bay Street 3rd Floor
Toronto, Ontario M5G 0A4, CA y
THE GOVERNING COUNCIL OF THE UNIVERSITY
OF TORONTO (50.0%)**

72 Inventor/es:

**JULIEN, JEAN-PHILIPPE;
SICARD, TAYLOR;
SEMESI, ANTHONY;
TREANOR, BEBHINN;
ZHAO, TIAN TIAN y
RUJAS DIEZ, EDURNE**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 923 133 T3

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

DESCRIPCIÓN

Plataforma de nanopartículas para el suministro de anticuerpos y vacunas

5 **Campo**

La presente invención se refiere a nanopartículas. En particular, la presente invención se refiere a proteínas de fusión de subunidades de nanopartículas, a vacunas que comprenden a las nanopartículas y a composiciones y métodos relacionados.

10

Antecedentes

Las nanopartículas han contribuido a los avances en diversas disciplinas. Su uso tiene el potencial de conferir un suministro dirigido; y permite el diseño técnico de micromatrices ordenadas, una liberación lenta y microambientes enjaulados para procesos catalíticos.

15

Las nanopartículas pueden sintetizarse a partir de una diversidad de materiales, incluyendo un polisacárido, liposomas o un nanomaterial inorgánico. Sin embargo, estas plataformas de suministro están asociadas a importantes limitaciones a la hora de fusionar biomoléculas, tales como la reducción de la actividad de las proteínas debido a las duras condiciones de fabricación, productos de degradación no deseados y baja eficacia de encapsulación. Las condiciones o formulaciones inapropiadas pueden tener efectos catastróficos en la estructura y, por tanto, inhibir la función deseada. Por ejemplo, la glucoproteína trimérica gp120, la más fuertemente glucosilada conocida, y los dominios de anticuerpos tienen intervalos de tampón estrictos para ser óptimamente activas.

20

25

Las nanopartículas proteicas son una alternativa atractiva a las tecnologías anteriores; sus componentes básicos son los aminoácidos y la ingeniería genética permite un control exquisito de la composición, el peso molecular y la función. Para la fabricación de nanopartículas que contienen proteínas sensibles y metaestables, el autoensamblaje de proteínas es el método de elección. De hecho, las nanopartículas autoensambladas se forman en condiciones fisiológicas a través de interacciones no covalentes y producen de forma fiable nanocápsulas uniformes y, a menudo, simétricas. Las nanopartículas proteicas autoensamblables poseen tres superficies distintas que pueden modificarse para transmitir funcionalidades adicionales: las superficies exterior, interior y la intersubunidades.

30

Existen numerosos informes sobre la fusión de péptidos con proteínas autoensamblables. Se pueden utilizar péptidos de unión a titanio u oro para adherir selectivamente nanopartículas a estos metales. Sin embargo, las interacciones biológicas a menudo precisan una estructura ternaria y cuaternaria y, por tanto, las proteínas plegadas suelen conferir funciones más amplias que los péptidos. Además, se estima que el 50 % de las proteínas humanas están glucosiladas, y estas modificaciones postraduccionales desempeñan un papel clave en el mantenimiento de la estructura de la proteína, le confieren estabilidad y le proporcionan su función. Solo existen unos pocos ejemplos de fusión genética de glucoproteínas en nanopartículas proteicas.

35

40

Las nanojaulas decoradas en su superficie con antígenos para su uso en vacunas han sido descritas por, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 8.546.337, la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º 2015/0110825, la publicación de solicitud de Patente Internacional N.º WO 2016/109792, Kanekiyo *et al.* (*Nature*, 2013, 499:102-106) y Sliepen *et al.* (*Retrovirology*, 2015, 12:82). Los inventores han demostrado previamente que es posible fusionar genéticamente una carga con el exterior de la proteína lumazina sintasa autoensamblable para su presentación multimérica (60 monómeros) (Jardine *et al.*, *Science*. 10 de mayo de 2013;340(6133):711-6).

45

La publicación de solicitud de patente internacional N.º 2010/0222501 describe un método para fabricar nanopartículas compuestas, en las que una fracción, tal como un anticuerpo, puede unirse a grupos orgánicos que sobresalen de la superficie de las nanopartículas.

50

Choe *et al.* (*Materiales* 2016, 9(12):994) proporcionan una revisión de varios métodos para aislar y dirigirse a anticuerpos utilizando biomateriales ultraespecíficos que imitan la unión de los receptores de Fc a los anticuerpos. Los péptidos de unión a Fc se aplican, por ejemplo, para localizar anticuerpos en nanomateriales y aumentar la semivida de proteínas en suero. En esta revisión, se presentan desarrollos recientes de péptidos de unión a Fc y se analizan sus características de unión y diversas aplicaciones.

55

Khoshnejad *et al.* (*Bioconjugate Chem.*, 2016, 27(3):628-637) describen un estudio en el que se conjugaron anticuerpos monoclonales frente a ICAM-1 y PECAM-1 o sus fragmentos de unión a antígeno monocatenarios (scFv) con nanopartículas de ferritina. Se sugiere que las nanopartículas de ferritina pueden proporcionar una plataforma para dirigirse a moléculas de adhesión endoteliales con vehículos en el intervalo de tamaño de 20 nm.

60

Kang *et al.* (Fourth International Conference on Multifunctional, Hybrid and Nanomaterials, Poster programme, 2015, P1.048) describen una nanojaula de proteína química de una variante de scFv de Trastuzumab y ferritina humana.

65

Carter *et al.* (*Science.*, 1992, 256(5053):105-7) muestran que la interacción con CD19 al mismo tiempo que un

antígeno, produce una respuesta de linfocitos B aumentada frente al antígeno.

Existe una necesidad de desarrollar un producto, composición y/o un método que proporcione al público una alternativa útil.

5

Sumario de la invención

En conformidad con un aspecto, se proporciona una proteína de fusión que comprende:

10 un monómero de nanojaula; y
 un fragmento de anticuerpo unido al monómero de nanojaula, comprendiendo el fragmento de anticuerpo un primer miembro de un par de unión;
 en donde una pluralidad de las proteínas de fusión se autoensambla para formar una nanojaula en la que una pluralidad de los fragmentos de anticuerpo decora la superficie exterior de la nanojaula, por lo que el primer miembro del par de unión está expuesto para interactuar con un segundo miembro del par de unión, comprendiendo además un enlazador entre el monómero de nanojaula y el fragmento de anticuerpo en donde el enlazador comprende de 1 a 30 restos de aminoácido, en donde el monómero de nanojaula es la ferritina, y en donde el primer miembro del par de unión es una porción Fc de un anticuerpo y el segundo miembro del par de unión es un receptor de Fc, y en donde el fragmento de anticuerpo comprende un Fc monocatenario (scFc).

20

La nanojaula puede comprender de aproximadamente 3 a aproximadamente 100 monómeros de nanojaula, tal como 24 o 60 monómeros.

25

De acuerdo con la invención, la proteína de fusión comprende además un enlazador entre el monómero de nanojaula y el anticuerpo o fragmento del mismo, en donde el enlazador es flexible o rígido y comprende de aproximadamente 1 a aproximadamente 30 restos de aminoácido.

En un aspecto, el enlazador comprende de aproximadamente 8 a aproximadamente 16 restos de aminoácido.

30

En un aspecto, el enlazador comprende una repetición de GGS.

En un aspecto, el enlazador comprende cuatro repeticiones de GGS.

35

En un aspecto, la proteína de fusión es un dominio Fc.

En un aspecto, la proteína de fusión comprende además una fracción detectable.

40

En un aspecto, la fracción detectable es una proteína fluorescente, tal como GFP, EGFP, Ametrina y/o una proteína fluorescente a base de flavina, tal como una proteína LOV, tal como iLOV.

En conformidad con un aspecto, se proporciona una nanojaula que comprende al menos una proteína de fusión descrita en el presente documento.

45

En un aspecto, cada monómero de nanojaula comprende la proteína de fusión descrita en el presente documento.

En un aspecto, de aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 80 % de los monómeros de nanojaula comprenden la proteína de fusión descrita en el presente documento.

50

En un aspecto, la nanojaula es multivalente.

En un aspecto, la nanojaula porta una molécula de carga, tal como un agente farmacéutico, un agente de diagnóstico y/o un agente de obtención de imágenes.

55

En un aspecto, la molécula de carga es una proteína y está fusionada con la proteína de fusión de manera que la molécula de carga está contenida internamente en la nanojaula.

En un aspecto, la molécula de carga es una proteína fluorescente, tal como GFP, EGFP, Ametrina y/o una proteína fluorescente a base de flavina, tal como una proteína LOV, tal como iLOV.

60

En un aspecto, la molécula de carga no está fusionada con la proteína de fusión y está contenida internamente en la nanojaula.

En un aspecto, la molécula de carga está contenida internamente para proporcionar epítomos de linfocitos T, pero, opcionalmente, no epítomos de linfocitos B.

65

En un aspecto, la molécula de carga está fusionada con la proteína de fusión y está contenida internamente para

proporcionar epítomos de linfocitos T, pero, opcionalmente, no epítomos de linfocitos B.

En un aspecto, la molécula de carga es una molécula pequeña, radioisótopo o partícula magnética.

5 En un aspecto, la proteína de fusión comprende además un antígeno en la superficie.

En un aspecto, el antígeno se expresa como una proteína de fusión con un monómero de nanojaula.

Además, en el presente documento se describe una vacuna que comprende la nanojaula.

10 En conformidad con un aspecto, se proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión descrita en el presente documento.

15 Además, en el presente documento se describe un vector que comprende la molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento.

Además, en el presente documento se describe una célula hospedadora que comprende el vector descrito en el presente documento y que produce la proteína de fusión descrita en el presente documento.

20 Además, en el presente documento se describe un método para inmunizar a un sujeto, comprendiendo el método administrar la nanojaula descrita en el presente documento o la vacuna descrita en el presente documento.

En conformidad con un aspecto, se proporciona la nanojaula como se reivindica para tratar y/o prevenir una enfermedad o afección.

25 En un aspecto, la enfermedad o afección es cáncer, o una enfermedad autoinmunitaria.

Además, en el presente documento se describe un método para diagnóstico por la imagen, comprendiendo el método administrar la nanojaula descrita en el presente documento a un sujeto, tejido o muestra, en donde la nanojaula comprende un marcador de diagnóstico, tal como una proteína fluorescente o una fracción de obtención magnética de imágenes, y la obtención de imágenes del sujeto, tejido o muestra.

30 La proteína de fusión descrita en el presente documento o la nanojaula descrita en el presente documento se puede utilizar como herramienta de investigación, tal como en FACS o en un ELISA.

35 Las características novedosas de la presente invención resultarán evidentes para los expertos en la materia tras el examen de la siguiente descripción detallada de la invención.

40 **Breve descripción de los dibujos**

La presente invención se entenderá mejor a partir de la siguiente descripción con referencia a las Figuras, en que:

45 las Figuras 1A y 1B muestran cadenas principales de nanopartículas autoensamblables de origen natural de ferritina humana (Figura 1A) o de lumazina sintasa de *Aquifex aeolicus* (Figura 1B) descritas en el presente documento; La Figura 1C muestra un esquema para generar nanopartículas de Fab monocatenario-ferritina que solo precisa la transfección de un plásmido.

50 La Figura 2 muestra un esquema de las construcciones utilizadas para producir las nanopartículas de ferritina (Figura 2A) o lumazina sintasa (Figura 2B) que expresan los Fab de anticuerpo de la presente invención. La Figura 2C muestra una representación esquemática de una nanopartícula de expresión de anticuerpos descrita en el presente documento;

55 la Figura 3 muestra datos que representan la pureza de las nanopartículas de ferritina (Figura 3A) o lumazina sintasa (Figura 3B) que expresan Fab de anticuerpos producidas en conformidad con los métodos de la Figura 2A y 2B según lo determinado mediante cromatografía de afinidad y análisis de SDS-PAGE;

la Figura 4 muestra microfotografías electrónicas de las nanopartículas de ferritina (Figura 4A) o lumazina sintasa (Figura 4B) que expresan Fab de anticuerpos descritas en el presente documento;

60 la Figura 5 muestra datos que representan la afinidad de unión del CD22 al Fab de anticuerpo sin una cadena principal de nanopartícula (Figura 5A), a nanopartículas de ferritina (Figura 5B) o lumazina sintasa (Figura 5C) que expresan Fab de anticuerpos descritas en el presente documento;

65 la Figura 6 muestra datos que demuestran la endocitosis mediada por receptor de dos nanopartículas de ferritina distintas que expresan Fab de anticuerpos (Figura 6A y 6B) en comparación con la ausencia de endocitosis con una nanopartícula de ferritina sola (Figura 6C);

- la Figura 7 muestra datos que representan las capacidades fluorescentes de las nanopartículas de ferritina descritas en el presente documento;
- 5 la Figura 8 muestra la estructura cristalina de las interacciones entre un antígeno de dominio de repetición NANP de CSP (forma siglada *circumsporozoite protein*, proteína del circumsporozoíto) y dos fragmentos de anticuerpos Fab;
- la Figura 9 muestra el modelado esquemático de las interacciones entre un antígeno de dominio de repetición NANP de CSP y un fragmento de anticuerpo Fab y un linfocito B;
- 10 la Figura 10 muestra las secuencias de proteínas de fusión que comprenden un antígeno de dominio de repetición NANP de CSP fusionado con una cadena pesada de Fab con un enlazador de longitudes variables;
- la Figura 11 muestra los datos de una purificación por cromatografía de exclusión por tamaño de las proteínas de fusión de la Figura 10;
- 15 la Figura 12 muestra los datos de una purificación por cromatografía de exclusión por tamaño de un anticuerpo de tipo silvestre correspondiente a las proteínas de fusión de la Figura 10 pero que carece del dominio de repetición NANP de CSP y del enlazador;
- 20 la Figura 13 muestra la cinética de unión a CSP de las proteínas de fusión de la Figura 10 en comparación con la unión por el anticuerpo de tipo silvestre;
- las Figuras 14-16 muestran la afinidad de unión del anticuerpo de tipo silvestre por las proteínas de fusión de la Figura 10;
- 25 la Figura 17 muestra representaciones esquemáticas de la interacción entre el anticuerpo de tipo silvestre y las proteínas de fusión de la Figura 10;
- la Figura 18 muestra datos de una cromatografía de exclusión por tamaño acoplada con dispersión de luz multiángulo para determinar la masa absoluta de la interacción del anticuerpo de tipo silvestre y la proteína de fusión, y un esquema que representa la interacción de un linfocito B que expresa un receptor de IgM específico para la proteína de fusión descrita en el presente documento;
- 30 la Figura 19 muestra nanopartículas diseñadas técnicamente para presentar conjuntamente un Fab estimulante de α -CD19 y antígenos como una plataforma de vacuna;
- 35 la Figura 20 muestra que las nanopartículas se pueden diseñar técnicamente para presentar conjuntamente anticuerpos estimulantes y antígenos;
- 40 la Figura 21 muestra que las nanopartículas biespecíficas están bien plegadas y presentan una alta densidad de Fab y antígenos;
- la Figura 22 muestra que las nanopartículas biespecíficas son funcionales y se unen como se esperaba;
- 45 la Figura 23 muestra que las nanopartículas autopotenciadas son capaces de reforzar la activación de linfocitos B dependiente de Ca^{2+} en comparación con los controles
- la Figura 24 muestra los datos de plegamiento, ensamblaje y elución de una nanopartícula de Fc monocatenario;
- 50 la Figura 25 muestra la maduración de la afinidad de anticuerpos para NANP de PfCSP (forma siglada de *Plasmodium falciparum circumsporozoite protein*, proteína del circumsporozoíto de *Plasmodium falciparum*) humana de alta afinidad. (A) Afinidad de resonancia de plasmón superficial (RPS) y SHM (forma siglada de *somatic hypermutation*, hipermutación somática) de anticuerpos anti-PfCSP seleccionados (marcados) VH3-33/V κ 1-5/KCDR3:8 (verde) y no VH3-33/V κ 1-5/KCDR3:8 (gris) (9). (B a D) Anticuerpos originales y mutados. [(B) y (C)] Reactividad de ELISA para PfCSP. (D) Media (barras) de la inhibición del paso por células hepáticas de Pf de dos a cuatro experimentos independientes (símbolos). ** significativo ($\alpha = 0,01$) para la prueba t de Student bilateral. (E) SHM (barras) silenciosa (gris) y de sustitución (rojo) en anticuerpos VH3-33/V κ 1-5 (n = 63). (F) Uso observado (obs) de aa en comparación con el modelo de referencia (base) (22, 23). (G y H) Mediciones de afinidad por RPS de NANP₃ independientes (puntos) y media (línea). ** significativo ($\alpha = 0,01$) y no significativo (ns) para la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. (A), (B) y (C), un representante de al menos dos experimentos independientes.
- 60 La Figura 26 muestra que la maduración de la afinidad impulsa la unión homotípica a los repeticiones. (A a H) estructura cocrystalina de Fab 1210/NANP₅. (A) Superposición de los cuatro Fab unidos a NANP. (B) Representación superficial de la interacción antígeno-anticuerpo. (C) Detalles del reconocimiento del epítipo central en 1210. Las líneas discontinuas negras indican enlaces de H. (D) Dos Fab 1210 formando complejo con NANP₅. [(E) y (F)] Representación superficial de Fab B (E) y Fab A (F). Los restos implicados en las interacciones homotípicas son de
- 65

- color gris oscuro. [(G) y (H)] Detalles de las interacciones homotípicas. Los restos de afinidad madurada están marcados en rojo. (I) KD media \pm ETM determinada por calorimetría de titulación isotérmica (CTI). Los puntos representan mediciones de al menos tres experimentos independientes. Prueba de Mann-Whitney unilateral: *P < 0,05, **P < 0,01. (J) Cromatografía de exclusión por tamaño acoplada con dispersión de luz multiángulo (CET-DLMA) para el complejo Fab 1210-PfCSP. La línea roja indica la masa molar media \pm DT de dos mediciones. (K) Promedios de clase bidimensional para el complejo Fab 1210-PfCSP. Las flechas rojas indican los Fab individuales, las líneas rojas indican el ángulo de unión observado en la estructura cristalina (D). Barra de escala, 10 nm.
- La Figura 27 muestra la unión a las repeticiones de NANP₅ por el anticuerpo 1210. A, Los cuatro Fab 1210 enlazados a 2 péptidos NANP₅ en la unidad asimétrica de la estructura cristalina de 1210-NANP₅. B, Superposición de la cadencia de NPNA de las estructuras de 580 (verde azulado; (10)), 663 (verde; (10)), 1210 (amarillo) y del péptido sin ligando (morado; (12)). Se muestra la desviación típica en los ángulos Phi y Psi. C, Superposición de 1210-NANP₅ con el Fab quimérico H.2140/L. 1210 formando complejo con un péptido NANP₃. El 1210 unido al péptido NANP₅ es de color amarillo, y el Fab quimérico y péptido unido NANP₃ son de color gris.
- La Figura 28 muestra el efecto del intercambio de alanina de los restos H.Y52A y H.Y58 sobre la unión al antígeno. Reactividad por ELISA de PfCSP y NANP₅ de los anticuerpos 1210, 2140, 2219 y los mutantes respectivos con intercambios de alanina en las posiciones H.Y52A y H.Y58. Se muestra uno de tres experimentos representativos.
- La Figura 29 muestra la estructura cristalina de 1210-NANP₅. A, Interacciones detalladas de 1210 con NANP₅. Los enlaces de H intermoleculares están coloreados como líneas continuas y los enlaces de H intramoleculares están coloreados en rojo. B, Mapa de omisión de densidad de electrones no sesgado (malla negra) contorneado a 1,0 σ para el péptido NANP₅ unido a dos 1210 Fab. C, Perfil de elución de 1210-NANP₅ examinado por CET/DLMA. La línea roja horizontal corresponde a la masa molar calculada para dos Fab 1210 unidos a NANP₅. D, Perfil de elución de PfCSP de longitud completa examinado por CET/DLMA. La línea roja horizontal corresponde a la masa molar calculada del antígeno eluido.
- La Figura 30 muestra la calorimetría de titulación isotérmica de la unión de 1210 a péptidos de repetición de NANP. A, B, Se muestran datos de CTI sin procesar representativos (panel superior) y las curvas de unión ajustadas (panel inferior) para 1210, 1210_NS, 1210_YY y 1210_GL unidos a NANP₅ (A) y NANP₃ (B). C, Sumario de valores termodinámicos de unión medidos para estas interacciones observadas en (A) y (B). Se informa la media \pm ETM de al menos tres experimentos independientes.
- La Figura 31 muestra la avidéz de unión de 1210 y 1210_YY a PfCSP. Sensogramas de interferometría de biocapa representativos (verde), los mejores ajustes del modelo 1:1 (negro) y la avidéz de unión calculada para (A) IgG 1210 y (B) IgG 1210_YY unidos a PfCSP de longitud completa.
- La Figura 32 muestra la activación de linfocitos B y la inhibición de parásitos. (A a D) señalización de calcio inducida por NANP₅ de 1210 y las variantes. [(A) y (B)] Cinética de reacción y porcentaje de células activadas (A), y superposición de medianas de intensidades de señal (B) a NANP₅ 1 μ g/ml para uno de al menos seis experimentos representativos. [(C) y (D)] Porcentaje de células activadas y mediana del tiempo de activación después de NANP₅ 1 μ g/ml (C) (n = 6 o 7) y 0,1 μ g/ml (D) (n = 3). Los símbolos indican experimentos independientes, las líneas y las barras de error indican la media \pm DT. ** significativo (α = 0,01) y no significativo (ns) para la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. (E y F) Inhibición de parásitos. (E) Valores de CI50 medios \pm DT de al menos tres experimentos independientes para anticuerpos los 1210 (negro) y 2163 (marrón) con indicación de las afinidades por NANP₃. No hay diferencias significativas entre los valores de CI50 debido a los intervalos de confianza extensamente solapantes. (F) Ratones sin parásitos después de la inmunización pasiva con 30 μ g o 100 μ g de 1210 o las variantes 24 horas antes de la inyección subcutánea con esporozoítos con Pb-PfCSP. Los datos muestran uno (100 μ g) o dos (30 μ g) experimentos independientes con cinco ratones por grupo. No hubo diferencias significativas en la supervivencia para las variantes de 1210 (prueba de Mantel-Cox).
- La Figura 33 muestra la inhibición mediada por anticuerpos del paso del Pf por los hepatocitos. A, B, inhibición del paso del Pf por los hepatocitos para 1210 (A), 2163 (B), así como las variantes indicadas. Los valores de CI50 (en g/ml) y los valores del coeficiente de Hill (n) y sus desviaciones típicas se indican encima de cada gráfico. C, afinidades para NANP₃ y coeficiente de Hill para 1210 (negro) y 2163 (marrón) así como las respectivas variantes, como se muestra en (A y B). Las barras de error indican la desviación típica.
- La Figura 34 muestra la maduración de la afinidad antihomotípica en anticuerpos para NANP de PfCSP codificados por IGHV3-23. (A) Afinidad por RPS y SHM de 1450 de todos los anticuerpos anti-PfCSP VH3-23/V κ 1-5 (verde) y no VH3-23/V κ 1-5 (gris) (9). (B) SHM (barras) silenciosa (gris) y de sustitución (rojo) en anticuerpos VH3-23/V κ 1-5 (n = 100). (C a E) estructura cocrystalina de Fab 1450-NANP₅. Modo de unión de cabeza a cabeza (C), interacciones Fab-Fab (D) y Fab-NANP₅ (E). Las líneas discontinuas negras indican enlaces de H. Los restos de afinidad madurada están coloreados de acuerdo con el esquema de uso de aa de la SHM y están marcados en rojo. Uso observado (obs) de aa en comparación con el modelo de referencia (base) (22, 23). (F) Anticuerpos VH3-33/V κ 1-5/KCDR3:8 o VH3-23/V κ 1-5 en linfocitos B de memoria totales (18) y plasmoblastos (PB) CD19+CD27altoCD38alto y linfocitos B de memoria reactivos frente a PfCSP (mem. de CSP) CD19+CD27+ (8, 9). Los puntos representan submuestras de n =

1500 secuencias. Los diagramas de caja muestran la mediana, la desviación típica, la máxima y la mínima de la distribución. *** significativo ($\alpha = 0,001$) para la prueba t de Student bilateral. (G) Frecuencia de anticuerpos VH3-33/V κ 1-5/KCDR3:8 y VH3-23/V κ 1-5 entre PB y mem. de CSP expandidos clonalmente frente a agrupados en singulete (9).

La Figura 35 muestra la unión a repeticiones de NANP₅ por los anticuerpos gI 1450 y 580. A, Representación superficial de parátomos de gI 1450 y 580 (PDB 6AZM, (10)) unidos a NANP₅. B, Interacciones detalladas de 1450 con NANP₅. Los enlaces de H intermoleculares están coloreados como líneas continuas y los enlaces de H intramoleculares están coloreados en rojo.

La Figura 36 muestra la comparación de la estructura de 1210 y el anticuerpo 311 (codificado por IGHV3-33 e IGLV1-40) para NANP inducido por la vacuna RTS,S. Se observan conformaciones de unión al antígeno similares para el reconocimiento del epítipo repetido mínimo NPNANPNANA. De manera análoga a la mutación anti-homotípica H.N56_K en 1210, 311 posee H.N56_R, lo que sugiere que también puede haber experimentado una maduración de afinidad anti-homotípica. A, La cadena Ig κ de 1210 se muestra en verde azulado, la cadena IgH de 1210 se muestra en verde. B, la cadena Ig λ de 311 se muestra en marrón, la cadena IgH de 311 se muestra en morado. Los antígenos de repetición de NANP se muestran en rosa. Los restos mutados están coloreados en amarillo. Los intercambios de AA en las posiciones H.31, H.50 y H.56 están resaltados. C, D, Representación detallada de las interacciones homotípicas de HCDR2 entre los Fab 1210 (C) y 311 (D) unidos a epítipos repetidos vecinos. Para D, la estructura del complejo 311-NANP se duplicó y se alineó estructuralmente con Fab A y Fab B del complejo 1210_NANP₅. Los restos de afinidad madurada H.K56 (C, Fab 1210) y H.R56 (D, Fab 311, (11)) están marcados en rojo.

La Figura 37 muestra la frecuencia de los genes IGHV3-33, IGHV3-30/IGHV3-30-3, IGHV3-30-5. Frecuencia de segmentos génicos de las líneas de estirpe germinal IGHV3-33, IGHV3-30/IGHV3-30-3, IGHV3-30-5 (8,9) determinada por la secuenciación genómica de células mononucleares de sangre periférica. Las secuencias se asignaron al respectivo gen de estirpe germinal basándose en su secuencia de CDR2 como se muestra en la Tabla 1.

La Figura 38 muestra que el antígeno de la vacuna contra el paludismo (NANP de CSP_{5,5}-enlazador-anticuerpo) suscita títulos de IgG que pueden reconocer el antígeno PfCSP de longitud completa.

La Figura 39 muestra la actividad/función de los sueros anti-PfCSP suscitados procedentes de las inmunizaciones de la Figura 25.

Descripción detallada de determinados aspectos

Definiciones

A menos que se explique otra cosa, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto en la materia a la cual pertenece la presente divulgación. Pueden encontrarse definiciones de términos comunes sobre biología molecular en Benjamin Lewin, *Genes V*, publicado por Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew *et al.* (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, publicado por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); y Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8). Aunque pueden utilizarse en la práctica o el ensayo de la presente invención cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento, los materiales y métodos típicos se describen en el presente documento. En la descripción y la reivindicación de la presente invención, se utilizará la siguiente abreviatura.

También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento únicamente tiene el fin de describir aspectos particulares, y no se pretende que sea limitante. En el presente documento se hace referencia a muchas solicitudes de patente, patentes y publicaciones para ayudar a comprender los aspectos descritos.

Para entender el alcance de la presente solicitud, los artículos "un", "una", "el/la" y "dicho/dicha" pretenden hacer referencia a uno o más de los elementos. Adicionalmente, la expresión "que comprende" y sus derivados, como se usa en el presente documento, están destinados a ser términos abiertos que especifican la presencia de las características, elementos, componentes, grupos, elementos integrantes y/o etapas indicadas, pero no excluyen la presencia de otras características, elementos, componentes, grupos, elementos integrantes y/o etapas no indicadas. Lo anterior también se aplica a palabras que tienen significados similares, tales como las expresiones, "que incluye", "que tiene" y sus derivados.

Se entenderá que cualquier aspecto descrito como "que comprende" determinados componentes también puede "consistir en" o "consistir esencialmente en", en donde "que consiste en" tiene un significado cerrado o restrictivo y "que consiste esencialmente en" significa que incluye los componentes especificados pero excluye otros componentes excepto los materiales presentes como impurezas, materiales inevitables presentes como resultado de los procedimientos utilizados para proporcionar los componentes y componentes añadidos con un fin distinto al de lograr el efecto técnico de la invención. Por ejemplo, una composición definida utilizando la expresión "que consiste

esencialmente en" abarca cualquier aditivo, excipiente, diluyente, vehículo y similares conocidos. Normalmente, una composición que consiste esencialmente en un conjunto de componentes comprenderá menos del 5 % en peso, normalmente menos del 3 % en peso, más normalmente menos del 1 %, e incluso más normalmente menos del 0,1 % en peso de un componente (o componentes) no especificado.

5 Se entenderá que cualquier componente definido en el presente documento como incluido puede excluirse explícitamente de la invención reivindicada a modo de condición o limitación negativa.

10 Además, todos los intervalos proporcionados en el presente documento incluyen el final de los intervalos y también cualquiera de los puntos intermedios del intervalo, ya sea que se indique explícitamente o no.

15 Los términos de grado tales como "sustancialmente", "alrededor de" y "aproximadamente", como se usan en el presente documento, significan una cantidad razonable de desviación del término modificado de manera que el resultado final no cambie significativamente. Estos términos de grado deben interpretarse como que incluyen una desviación de al menos \pm el 5 % del término modificado si esta desviación no niega el significado de la palabra que modifica.

20 Se entiende además que todos los tamaños de bases o los tamaños de aminoácidos y todos los valores de peso molecular o masa molecular, proporcionados para los ácidos nucleicos o polipéptidos son aproximados, y se proporcionan para la descripción. Aunque en la práctica o en las pruebas de la presente divulgación pueden utilizarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, a continuación, se describen métodos y materiales adecuados. La abreviatura, "e. g." procede del latín *exempli gratia* y se utiliza en el presente documento para indicar un ejemplo no limitativo. Por tanto, la abreviatura "e.g" es sinónimo de la expresión "por ejemplo". Se pretende que la palabra "o" incluya "y", a menos que el contexto indique claramente otra cosa.

25 Las expresiones "nanopartícula proteica" y "nanojaula" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a una estructura con forma de poliedro de múltiples subunidades, basada en proteínas. Cada una de las subunidades o monómeros de nanojaula está compuesta por proteínas o polipéptidos (por ejemplo, un polipéptido glucosilado) y, opcionalmente de características únicas o múltiples de lo siguiente: ácidos nucleicos, grupos prostéticos, compuestos orgánicos e inorgánicos. Los ejemplos no limitativos de nanopartículas proteicas incluyen nanopartículas de ferritina (véase, por ejemplo, Zhang, Y. *Int. J. Mol. Sci.*, 12:5406-5421, 2011), nanopartículas de encapsulina (véase, por ejemplo, Sutter *et al.*, *Nature Struct. and Mol. Biol.*, 15:939-947, 2008), nanopartículas de azufre oxigenasa reductasa (SOR, forma siglada de *Sulfur Oxygenase Reductase*) (véase, por ejemplo, Ulrich *et al.*, *Science*, 311: 996-1000, 2006), nanopartículas de lumazina sintasa (véase, por ejemplo, Zhang *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 306: 1099-1114, 2001) o nanopartículas de piruvato deshidrogenasa (véase, por ejemplo, Izard *et al.*, *PNAS* 96: 1240-1245, 1999). La ferritina, la encapsulina, la SOR, la lumazina sintasa y la piruvato deshidrogenasa, son proteínas monoméricas que se autoensamblan en un complejo proteico globular que, en algunos casos, consiste respectivamente en 24, 60, 24, 60 y 60 subunidades proteicas. También se producen el carboxisoma, proteínas de bóveda, GroEL, la proteína de choque térmico, la E2P y la proteína de cubierta de MS2. De acuerdo con la invención, el monómero de nanojaula es la ferritina.

45 Una "vacuna" es una composición farmacéutica que induce una respuesta inmunitaria profiláctica o terapéutica en un sujeto. En algunos casos, la respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria protectora. Normalmente, una vacuna induce una respuesta inmunitaria específica de antígeno frente a un antígeno de un patógeno, por ejemplo, un patógeno vírico, o frente a un constituyente celular correlacionado con un proceso patológico. Una vacuna puede incluir un polinucleótido (tal como un ácido nucleico que codifica un antígeno divulgado), un péptido o polipéptido (tal como un antígeno divulgado), un virus, una célula o uno o más constituyentes celulares. En un ejemplo específico, no limitativo, una vacuna induce una respuesta inmunitaria que reduce la gravedad de los síntomas asociados con la infección por paludismo y/o disminuye la carga parasitaria en comparación con un control. En otro ejemplo no limitativo, una vacuna induce una respuesta inmunitaria que reduce y/o previene la infección por paludismo en comparación con un control.

55 El término "anticuerpo", también denominada en la técnica "inmunoglobulina" (Ig), utilizado en el presente documento se refiere a una proteína construida a partir de cadenas polipeptídicas pesadas y ligeras emparejadas; existen diversos isotipos de Ig, incluyendo IgA, IgD, IgE, IgG, tal como IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄, e IgM. Se entenderá que el anticuerpo puede ser de cualquier especie, incluyendo de ser humano, ratón, rata, mono, llama o tiburón. Cuando un anticuerpo se pliega correctamente, cada cadena se pliega en varios dominios globulares distintos unidos por secuencias polipeptídicas más lineales. Por ejemplo, la cadena ligera de inmunoglobulina se pliega en un dominio variable (V_L) y uno constante (CL), mientras que la cadena pesada se pliega en un dominio variable (V_H) y tres constantes (C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}). La interacción de los dominios variables de cadena ligera y pesada (V_H y V_L) da como resultado la formación de una región de unión a antígeno (Fv). Cada dominio tiene una estructura bien establecida familiar para los expertos en la materia.

65 Las regiones variables de cadena ligera y pesada son responsables de la unión al antígeno diana y, por tanto, pueden mostrar una diversidad de secuencia significativa entre anticuerpos. Las regiones constantes muestran una menor diversidad de secuencias y son responsables de la unión a varias proteínas naturales para suscitar acontecimientos

inmunológicos importantes. La región variable de un anticuerpo contiene los determinantes de unión al antígeno de la molécula y, por tanto, determina la especificidad de un anticuerpo por su antígeno diana. La mayor parte de la variabilidad de la secuencia se produce en seis regiones hipervariables, tres por cada cadena pesada y ligera variable; las regiones hipervariables se combinan para formar el sitio de unión a antígeno y contribuyen a la unión y el reconocimiento de un determinante antigénico. La especificidad y afinidad de un anticuerpo por su antígeno está determinada por la estructura de las regiones hipervariables, así como su tamaño, forma y química de la superficie que presentan al antígeno.

Un "fragmento de anticuerpo" como se denominada en el presente documento puede incluir cualquier fragmento de anticuerpo de unión a antígeno adecuado conocido en la técnica. El fragmento de anticuerpo puede ser un fragmento de anticuerpo de origen natural o puede obtenerse mediante la manipulación de un anticuerpo de origen natural o mediante el uso de métodos recombinantes. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo puede incluir, pero no se limita a, un Fv, un Fv monocatenario (scFv; una molécula que consiste en un V_L y un V_H conectados con un enlazador peptídico), un Fc, un Fc monocatenario, un Fab, un F(ab')₂, un anticuerpo de dominio único (sdAb; un fragmento compuesto por un único V_L o V_H), y presentaciones multivalentes de cualquiera de estos.

Por la expresión "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se entiende un anticuerpo que se genera utilizando tecnología de ADN recombinante. El término también debe interpretarse en el sentido de un anticuerpo que se ha generado mediante la síntesis de una molécula de ADN que codifica el anticuerpo, molécula de ADN que expresa una proteína de anticuerpo, o una secuencia de aminoácidos que especifica el anticuerpo, en donde la secuencia de aminoácidos o ADN se ha obtenido utilizando tecnología de secuencia de aminoácidos o ADN sintética que está disponible y se conoce bien en la técnica.

El término "epítopo" se refiere a un determinante antigénico. Un epítopo son los grupos químicos particulares o secuencias peptídicas en una molécula que son antigénicas, es decir, que suscitan una respuesta inmunitaria específica. Un anticuerpo se une específicamente a un epítopo antigénico particular, por ejemplo, en un polipéptido. Los epítomos pueden formarse tanto a partir de aminoácidos contiguos como a partir de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por el plegamiento terciario de una proteína. Los epítomos formados a partir de aminoácidos contiguos normalmente se conservan al exponerlos a disolventes desnaturizantes, mientras que los epítomos formados por plegamiento terciario normalmente se pierden al tratarlos con disolventes desnaturizantes.

Un epítopo normalmente incluye al menos 3, y más habitualmente, al menos 5, aproximadamente 9, aproximadamente 11, o aproximadamente 8 a aproximadamente 12 aminoácidos en una conformación espacial exclusiva. Los métodos para determinar la conformación espacial de los epítomos incluyen, por ejemplo, cristalografía de rayos x y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, por ejemplo, "Epitope Mapping Protocols" en *Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed (1996).

El término "antígeno", como se usa en el presente documento, se define como una molécula que provoca una respuesta inmunitaria. Esta respuesta inmunitaria puede implicar la producción de anticuerpos o la activación de células inmunológicamente competentes específicas, o ambas. El experto en la materia entenderá que cualquier macromolécula, incluyendo virtualmente todas las proteínas o péptidos, puede servir como un antígeno. Adicionalmente, los antígenos pueden obtenerse de ADN recombinante o genómico. Un experto en la materia entenderá que cualquier ADN, que comprenda una secuencia de nucleótidos o una secuencia de nucleótidos parcial que codifique una proteína que suscita una respuesta inmunitaria, por lo tanto, codifica un "antígeno" tal como se usa este término en el presente documento. Adicionalmente, un experto en la materia entenderá que un antígeno no necesita estar codificado únicamente por una secuencia de nucleótidos de longitud completa de un gen. Es evidente que los aspectos descritos en el presente documento incluyen, pero sin limitación, el uso de secuencias de nucleótidos parciales de más de un gen y que estas secuencias de nucleótidos podrían organizarse en diversas combinaciones para suscitar la respuesta inmunitaria deseada. Además, un experto en la materia entenderá que un antígeno no necesita estar codificado por un "gen" en absoluto. Es fácilmente evidente que un antígeno puede sintetizarse u obtenerse a partir de una muestra biológica. Dicha muestra biológica puede incluir, pero no se limita a, una muestra de tejido, una célula o un líquido biológico.

Por tanto, las composiciones descritas en el presente documento pueden ser adecuadas para la protección o el tratamiento de sujetos vertebrados contra una diversidad de patologías tales como, por ejemplo, infecciones víricas, bacterianas, fúngicas o parasitarias, cáncer y enfermedades inmunitarias.

Los antígenos asociados a tumor adecuados para su uso en las composiciones descritas en el presente documento incluyen moléculas mutadas y no mutadas que pueden ser indicativas de un único tipo de tumor, estar compartidas entre varios tipos de tumores, y/o expresarse exclusivamente o sobreexpresarse en células tumorales en comparación con las células normales. Además de proteínas y glucoproteínas, también se han documentado patrones específicos de tumor de expresión de carbohidratos, gangliósidos, glucolípidos y mucinas. Los antígenos ilustrativos asociados a tumor para su uso en las vacunas para el cáncer objeto incluyen productos proteicos de oncogenes, genes supresores de tumores y otros genes con mutaciones o reordenamientos exclusivos de las células tumorales, productos de genes embrionarios reactivados, antígenos oncofetales, antígenos de diferenciación específicos de tejido (pero no específicos de tumor), receptores de factores de crecimiento, restos de carbohidratos de la superficie celular,

- proteínas víricas extrañas y una serie de otras proteínas propias. Las realizaciones específicas de antígenos asociados a tumor incluyen, por ejemplo, antígenos mutados tales como los productos proteicos de los protooncogenes Ras p21, el supresor tumoral p53 y los oncogenes HER-2/neu y BCR-ab1, así como CDK4, MUM1, Caspasa 8 y catenina beta; antígenos sobreexpresados tales como la galectina 4, galectina 9, anhidrasa carbónica, Aldolasa A, PRAMA,
- 5 Her2/neu, ErbB-2 y KSA, antígenos oncofetales tales como la alfafetoproteína (AFP), la gonadotropina coriónica humana (hCG); los autoantígenos tales como el antígeno carcinoembrionario (ACE) y los antígenos de diferenciación de melanocitos tales como Mart 1/Melan A, gp100, gp75, Tirosinasa, TRP1 y TRP2; antígenos asociados a la próstata tales como PSA, PAP, PSMA, PSM-P1 y PSM-P2; productos de genes embrionarios reactivados tales como MAGE 1, MAGE 3, MAGE 4, GAGE 1, GAGE 2, BAGE, RAGE y otros antígenos testiculares de cáncer tales como NY-ESO1,
- 10 SXX2 y SCP1; mucinas tales como Muc-1 y Muc-2; gangliósidos tales como GM2, GD2 y GD3, glucolípidos neutros y glucoproteínas tales como Lewis (y) y globo-H; y glucoproteínas tales como Tn, el antígeno de Thompson-Freidenreich (TF) y sTn. Además, se incluyen como antígenos asociados a tumor en el presente documento células completas y lisados de células tumorales, así como porciones inmunogénicas de los mismos, así como idiotipos de inmunoglobulina expresados en proliferaciones monoclonales de linfocitos B para su uso contra linfomas de linfocitos B. Los antígenos
- 15 asociados a tumor y sus respectivas dianas de células tumorales incluyen, por ejemplo, citoqueratinas, particularmente citoqueratina 8, 18 y 19, como antígenos para el carcinoma. El antígeno de membrana epitelial (AME), EphA1, EphA2, EphA3, EphA4, EphA5, EphA6, EphA7, EphA8, EphA10, EphB1, EphB2, EphB3, EphB4, EphB6, el antígeno embrionario humano (AEH-125), glóbulos de grasa de la leche humana, MBr1, MBr8, Ber-EP4, 17-1A, C26 y T16 también son antígenos de carcinoma conocidos. La desmina y la actina específica de músculo son antígenos de los
- 20 sarcomas miogénicos. La fosfatasa alcalina placentaria, la gonadotropina coriónica humana beta y la alfafetoproteína son antígenos de tumores trofoblásticos y de células germinativas. El antígeno prostático específico es un antígeno de los carcinomas prostáticos, el antígeno carcinoembrionario de adenocarcinomas de colon. HMB-45 es un antígeno de melanomas. En el cáncer de cuello uterino, los antígenos útiles podrían estar codificados por el virus del papiloma humano. La cromagranina-A y la sinaptofisina son antígenos de tumores neuroendocrinos y neuroectodérmicos. De
- 25 particular interés son los tumores agresivos que forman masas tumorales sólidas que tienen áreas necróticas. La lisis de tales células necróticas es una rica fuente de antígenos para las células presentadoras de antígenos y, por tanto, la terapia objeto puede encontrar un uso ventajoso junto con quimioterapia y/o radioterapia convencionales. Los antígenos se pueden obtener de cualquier tumor o línea celular maligna.
- 30 "Que codifica" se refiere a la propiedad inherente de secuencias específicas de nucleótidos en un polinucleótido, tal como un gen, un ADNc o un ARNm, de servir como moldes para la síntesis de otros polímeros y macromoléculas en procesos biológicos que tienen una secuencia de nucleótidos definida (es decir, ARNr, ARNt y ARNm) o una secuencia de aminoácidos definida y las propiedades biológicas resultantes de las mismas. Por tanto, un gen codifica una
- 35 proteína si la transcripción y la traducción del ARNm correspondiente a ese gen producen la proteína en una célula u otro sistema biológico. Tanto la cadena codificante, cuya secuencia de nucleótidos es idéntica a la secuencia de ARNm y por lo general se proporciona en listados de secuencias, como la cadena no codificante, utilizada como molde para la transcripción de un gen o ADNc, pueden denominarse codificantes de la proteína u otro producto de ese gen o ADNc.
- 40 El término "expresión" como se usa en el presente documento se define como la transcripción y/o traducción de una secuencia de nucleótidos particular dirigida por su promotor.
- "Aislado" significa alterado o retirado del estado natural. Por ejemplo, un ácido nucleico o un péptido naturalmente presente en un animal vivo no está "aislado", pero el mismo ácido nucleico o péptido parcial o completamente separado
- 45 de los materiales coexistentes de su estado natural está "aislado". Un ácido nucleico o una proteína aislada pueden existir en forma sustancialmente purificada, o pueden existir en un medio no nativo tal como, por ejemplo, una célula hospedadora.
- A menos que se especifique otra cosa, una "secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos"
- 50 incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones degeneradas entre sí y que codifican la misma secuencia de aminoácidos. La frase secuencia de nucleótidos que codifica una proteína o un ARN también puede incluir intrones en la medida en que la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína puede, en alguna versión, contener un intrón (o intrones).
- 55 La expresión "que modula", como se usa en el presente documento, significa mediar un aumento o disminución detectable en el nivel de una respuesta en un sujeto en comparación con el nivel de una respuesta en el sujeto en ausencia de un tratamiento o compuesto, y/o en comparación con el nivel de una respuesta en un sujeto por lo demás idéntico, pero sin tratar. La expresión abarca alterar y/o afectar una señal o respuesta nativa, mediando así una
- 60 respuesta terapéutica beneficiosa en un sujeto, normalmente, un ser humano.
- La expresión "unido operativamente" se refiere al enlace funcional entre una secuencia reguladora y una secuencia de ácido nucleico heteróloga que da como resultado la expresión de esta última. Por ejemplo, una primera secuencia de ácido nucleico está unida operativamente con una segunda secuencia de ácido nucleico cuando la primera secuencia de ácido nucleico se coloca en una relación funcional con la segunda secuencia de ácido nucleico. Por
- 65 ejemplo, un promotor está unido operativamente a una secuencia codificante si el promotor afecta a la transcripción o expresión de la secuencia codificante. En general, las secuencias de ADN unidas operativamente son contiguas y,

cuando es necesario unir dos regiones codificantes de proteínas, están en el mismo marco de lectura.

La administración "parenteral" de una composición inmunogénica incluye, por ejemplo, inyección subcutánea (s.c.), intravenosa (i.v.), intramuscular (i.m.) o intraesternal, o técnicas de infusión.

5 El término "polinucleótido" como se usa en el presente documento se define como una cadena de nucleótidos. Adicionalmente, los ácidos nucleicos son polímeros de nucleótidos. Por tanto, los ácidos nucleicos y los polinucleótidos como se usan en el presente documento son intercambiables. Un experto en la materia tiene el conocimiento general de que los ácidos nucleicos son polinucleótidos, que pueden hidrolizarse en "nucleótidos" monoméricos. Los
10 nucleótidos monoméricos pueden hidrolizarse en nucleósidos.

Como se usa en el presente documento, los polinucleótidos incluyen, pero sin limitación, todas las secuencias de ácido nucleico que se obtienen por cualquier medio disponible en la técnica, incluyendo, sin limitación, medios recombinantes, es decir, la clonación de secuencias de ácido nucleico de una biblioteca recombinante o un genoma celular, utilizando tecnología de clonación ordinaria y PCR, y similares, y por medios sintéticos.

Como se usan en el presente documento, los términos "péptido", "polipéptido", y "proteína", se usan indistintamente y se refieren a un compuesto comprendido por restos de aminoácido unidos covalentemente por enlaces peptídicos. Una proteína o un péptido debe contener al menos dos aminoácidos, y no se establece ninguna limitación en cuanto al número máximo de aminoácidos que puede comprender la secuencia de una proteína o péptido. Los polipéptidos incluyen cualquier péptido o proteína que comprende dos o más aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos. Como se usa en el presente documento, el término se refiere tanto a cadenas cortas, que también se denominan comúnmente en la técnica péptidos, oligopéptidos y oligómeros, por ejemplo, y a cadenas más largas, que generalmente se denominan en la técnica proteínas, de las cuales hay tres tipos. Los "polipéptidos" incluyen, por
20 ejemplo, fragmentos biológicamente activos, polipéptidos sustancialmente homólogos, oligopéptidos, homodímeros, heterodímeros, variantes de polipéptidos, polipéptidos modificados, derivados, análogos, proteínas de fusión, entre otros. Los polipéptidos incluyen péptidos naturales, péptidos recombinantes, péptidos sintéticos o una combinación de los mismos.

30 Por la expresión "se une específicamente", como se usa en el presente documento con respecto a un anticuerpo, se entiende un anticuerpo que reconoce un antígeno específico, pero no reconoce ni se une sustancialmente a otras moléculas de una muestra. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno de una especie también puede unirse a ese antígeno de una o más especies. Pero, tal reactividad cruzada entre especies no modifica por sí misma la clasificación de un anticuerpo como específico. En otro ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno también puede unirse a distintas formas alélicas del antígeno. Sin embargo, tal reactividad cruzada no modifica por sí misma la clasificación de un anticuerpo como específico. En algunos casos, las expresiones "unión específica" o "que se une específicamente", pueden utilizarse en referencia a la interacción de un anticuerpo, una proteína o un péptido con una segunda especie química, para referirse a que la interacción depende de la presencia de una estructura particular (por ejemplo, un determinante antigénico o epítipo) en la especie química; por ejemplo, un anticuerpo reconoce y se une a una estructura proteínica específica en lugar de a proteínas en general. Si un anticuerpo es específico para el epítipo "A", la presencia de una molécula que contiene el epítipo A (o A libre, sin marcar), en una reacción que contiene "A" marcado y el anticuerpo, reducirá la cantidad de A marcado unido al anticuerpo.

45 Las expresiones "cantidad terapéuticamente eficaz", "cantidad eficaz" o "cantidad suficiente" significa una cantidad suficiente, cuando se administra a un sujeto, incluyendo un mamífero, por ejemplo, un ser humano, para lograr un resultado deseado, por ejemplo, una cantidad eficaz para provocar una respuesta inmunitaria protectora. Las cantidades eficaces de los compuestos descritos en el presente documento pueden variar de acuerdo con factores tales como el inmunógeno, la edad, el sexo y el peso del sujeto. La pautas posológicas o regímenes de tratamiento pueden ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima, como lo entiende un experto en la materia. En aspectos, una cantidad terapéuticamente eficaz de las proteínas de fusión descritas en el presente documento es suficiente para tratar una enfermedad o afección, tal como el cáncer o una enfermedad inmunitaria. Una cantidad terapéuticamente eficaz de las proteínas de fusión descritas en el presente documento también puede ser suficiente para actuar como adyuvante para aumentar la eficacia de una vacuna.

55 Además, un régimen de tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz puede consistir en una única administración o, alternativamente, comprender una serie de aplicaciones. La duración del período de tratamiento depende de una diversidad de factores, tales como el inmunógeno, la edad del sujeto, la concentración del agente, la reactividad del paciente al agente, o una combinación de los mismos. Además, se apreciará que la dosificación eficaz del agente utilizado para el tratamiento puede aumentar o disminuir durante el curso de un régimen de tratamiento específico. Pueden producirse cambios en la dosificación y hacerse evidentes mediante ensayos de diagnóstico convencionales conocidos en la técnica. Las proteínas de fusión descritas en el presente documento pueden, en aspectos, administrarse antes, durante o después del tratamiento con terapias convencionales para la enfermedad o trastorno en cuestión, tal como el cáncer. Por ejemplo, las proteínas de fusión descritas en el presente
60 documento pueden encontrar un uso particular en combinación con inmunoterapias para el tratamiento del cáncer.

65

El término "transfectado" o "transformado" o "transducido" como se usa en el presente documento se refiere a un procedimiento mediante el cual el ácido nucleico exógeno se transfiere o se introduce en la célula hospedadora. Una célula "transfectada" o "transformada" o "transducida" es una que se ha transfectado, transformado o transducido con ácido nucleico exógeno. La célula incluye la célula objeto primaria y su progenie.

5 La expresión "bajo control transcripcional" o "unido operativamente" como se usa en el presente documento significa que el promotor está en la ubicación y orientación correctas en relación con un polinucleótido para controlar el inicio de la transcripción por la ARN polimerasa y la expresión del polinucleótido.

10 Un "vector" es una composición de materia que comprende un ácido nucleico aislado y que puede usarse para suministrar el ácido nucleico aislado al interior de una célula. Se conocen numerosos vectores en la técnica que incluyen, pero no limitado a, polinucleótidos lineales, polinucleótidos asociados con compuestos iónicos o anfífilos, plásmidos y virus. Por tanto, el término "vector" incluye un plásmido de replicación autónoma o un virus. El término también debe interpretarse para incluir compuestos no plasmídicos y no víricos que facilitan la transferencia de ácido nucleico a las células, tales como, por ejemplo, compuestos de polilisina, liposomas y similares. Los ejemplos de vectores víricos incluyen, pero sin limitación, vectores adenovíricos, vectores de virus adenoasociados, vectores retrovíricos y similares.

20 El término "sujeto" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier miembro del reino animal, normalmente un mamífero. El término "mamífero" se refiere a cualquier organismo clasificado como un mamífero, incluyendo los seres humanos, otros primates superiores, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, deportivos o de compañía, tales como perros, gatos, ganado bovino, caballos, ovejas, cerdos, cabras, conejos, etc. Normalmente, el mamífero es un ser humano.

25 La administración "en combinación con" uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye la administración simultánea (concurrente) y consecutiva en cualquier orden.

30 La expresión "farmacéuticamente aceptable" significa que el compuesto o combinación de compuestos es compatible con los ingredientes restantes de una formulación para uso farmacéutico y que, en general, es seguro para administrar a humanos de acuerdo con las normas gubernamentales establecidas, incluidas las promulgadas por la Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos.

35 La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye, pero no se limita a, disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos, agentes isotónicos y/o retardantes de la absorción, y similares. El uso de vehículos farmacéuticamente aceptables es bien conocido.

40 El término "adyuvante" se refiere a un compuesto o mezcla que está presente en una vacuna y potencia la respuesta inmunitaria frente a un antígeno presente en la vacuna. Por ejemplo, un adyuvante puede potenciar la respuesta inmunitaria frente a un polipéptido presente en una vacuna como se contempla en el presente documento, o frente a un fragmento inmunogénico o variante del mismo como se contempla en el presente documento. Un adyuvante puede servir como un depósito tisular que libera lentamente el antígeno y también como un activador del sistema linfóide que potencia de forma no específica la respuesta inmunitaria. Los ejemplos de adyuvantes que pueden emplearse incluyen adyuvante MPL-TDM (monofosforil lípido A/dicorinomicolato de trehalosa sintético, por ejemplo, disponible de GSK Biologics). Otro adyuvante adecuado es el adyuvante inmunoestimulante AS021/AS02 (GSK). Estos adyuvantes inmunoestimulantes están formulados para proporcionar una fuerte respuesta de linfocitos T e incluyen QS-21, una saponina de *Quillay saponaria*, el ligando TL4, un monofosforil lípido A, juntos en un vehículo lipídico o liposómico. Otros adyuvantes incluyen, pero sin limitación, adyuvantes de copolímeros de bloques no iónicos (por ejemplo, CRL 1005), fosfatos de aluminio (por ejemplo, AIPO.sub.4), R-848 (un adyuvante de tipo Th1), imiquimod, PAM3CYS, poly (I:C), loxoribina, BCG (bacilo Calmette-Guérin) y *Corynebacterium parvum*, oligodesoxinucleótidos (ODN) CpG, antígenos derivados de la toxina colérica (por ejemplo, CTA 1-DD), adyuvantes de lipopolisacárido, adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, saponina, geles minerales, tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas, tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite o hidrocarburo en agua (por ejemplo, MF59 disponible de Novartis Vaccines o Montanide ISA 720), hemocianinas de lapa californiana y dinitrofenol.

55 Las "variantes" son proteínas de fusión biológicamente activas, anticuerpos, o fragmentos de los mismos que tienen una secuencia de aminoácidos que difiere de una secuencia de comparación en virtud de una inserción, delección, modificación y/o sustitución de uno o más restos de aminoácido dentro de la secuencia comparativa. Las variantes generalmente tienen menos del 100 % de identidad de secuencia con la secuencia comparativa. Habitualmente, sin embargo, una variante biológicamente activa tendrá una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente el 70 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia comparativa, tal como al menos aproximadamente el 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia. Las variantes incluyen fragmentos peptídicos de al menos 10 aminoácidos que conservan cierto nivel de actividad biológica de la secuencia de comparación. Las variantes incluyen también polipéptidos en donde se añaden uno o más restos de aminoácido en el extremo N o C, o dentro de, la secuencia comparativa. Las variantes también incluyen polipéptidos

en los que se delecionan varios restos de aminoácido y se sustituyen opcionalmente por uno o más restos de aminoácido. Las variantes también pueden modificarse covalentemente, por ejemplo, por sustitución por una fracción que no sea un aminoácido de origen natural o mediante la modificación de un resto de aminoácido para producir un aminoácido de origen no natural.

5 El "porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos" se define en el presente documento como el porcentaje de restos de aminoácido en la secuencia candidata que son idénticos a los restos en la secuencia de interés, tales como los polipéptidos de la invención, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. Ninguna de las extensiones, delecciones o inserciones N-terminales, C-terminales o internas
10 en la secuencia candidata se interpretará como que afecta a la identidad u homología de secuencia. Los métodos y los programas de ordenador para el alineamiento son bien conocidos en la técnica, tales como "BLAST".

15 "Activo" o "actividad" para los fines del presente documento se refiere a una actividad biológica y/o inmunológica de las proteínas de fusión descritas en el presente documento, en donde actividad "biológica" se refiere a una función biológica (ya sea inhibidora o estimulante) provocada por las proteínas de fusión.

Las proteínas de fusión descritas en el presente documento pueden incluir modificaciones. Dichas modificaciones incluyen, pero sin limitación, la conjugación a fracciones indicadoras detectables. Además, se incluyen modificaciones que prolongan la semivida (por ejemplo, pegilación). Las proteínas y los agentes no proteicos pueden conjugarse con las proteínas de fusión mediante métodos conocidos en la técnica. Los métodos de conjugación incluyen enlace directo, enlace a través de enlazadores unidos covalentemente y miembros de pares de unión específica (por ejemplo, avidina-biotina). Dichos métodos incluyen, por ejemplo, el descrito por Greenfield *et al.*, Cancer Research 50, 6600-6607 (1990), y los descritos por Amon *et al.*, Adv. Exp. Med. Biol. 303, 79-90 (1991) y por Kiseleva et al, Mol. Biol. (USSR)25, 508-514 (1991).
20
25

Proteínas de fusión

30 En el presente documento se describen proteínas de fusión. Las proteínas de fusión comprenden un monómero de nanojaula y un anticuerpo o fragmento del mismo unido al monómero de nanojaula, comprendiendo el anticuerpo o fragmento del mismo un epítipo de unión a antígeno. Una pluralidad de proteínas de fusión se autoensamblan para formar una nanojaula en la que una pluralidad de los anticuerpos o fragmentos de los mismos decoran la superficie exterior de la nanojaula, por lo que el epítipo de unión a antígeno se expone para interactuar con un antígeno.

35 En un aspecto de la invención, las proteínas de fusión comprenden un monómero de nanojaula y un fragmento de anticuerpo unido al monómero de nanojaula de ferritina, comprendiendo el fragmento de anticuerpo una porción Fc de un anticuerpo, en donde el fragmento de anticuerpo comprende un Fc monocatenario (scFc). Una pluralidad de proteínas de fusión se autoensamblan para formar una nanojaula en la que una pluralidad de fragmentos de anticuerpo decora la superficie exterior de la nanojaula, por lo que la porción Fc de un anticuerpo se expone para interactuar con un receptor de Fc.
40

En aspectos típicos, la nanojaula comprende de aproximadamente 3 a aproximadamente 100 monómeros de nanojaula, tales como de aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 55, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96 o 98 a aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 55, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98 o 100 monómeros nanojaula, tal como 24 o 60 monómeros. El monómero de la nanojaula es la ferritina. Las Figuras 1A y 1B muestran imágenes de nanojaulas autoensamblables.
45

50 Las proteínas de fusión, acuerdo con las reivindicaciones comprenden un enlazador entre el monómero de nanojaula y el fragmento de anticuerpo. Este enlazador permite que tanto el monómero de nanojaula como el anticuerpo o fragmento del mismo adopten conformaciones favorables para el autoensamblaje y la función del anticuerpo, una vez que se expresa la proteína. El enlazador puede ser flexible o rígido.

55 El enlazador comprende de aproximadamente 1 a aproximadamente 30 restos de aminoácido, tal como de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 o 29 a aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 restos de aminoácido, tal como de aproximadamente 8 a aproximadamente 16 restos de aminoácido, tal como 8, 10 o 12 restos de aminoácido.
60

El enlazador puede ser de cualquier secuencia de aminoácidos que no interfiera con la unión del antígeno a su sitio de unión a antígeno en el anticuerpo. En un ejemplo típico, el enlazador comprende una repetición de GGS y, más normalmente, el enlazador comprende aproximadamente 2, 3, 4, 5 o 6 repeticiones de GGS, tal como aproximadamente 4 repeticiones de GGS.
65

De acuerdo con la invención, el fragmento de anticuerpo comprende un scFc. La proteína de fusión puede comprender

además un enlazador.

También se describe en el presente documento una proteína de fusión asociada con una cadena ligera y/o una cadena pesada de Fab, que se pueden producir por separado o de forma contigua a la proteína de fusión.

5 Las proteínas de fusión descritas en el presente documento pueden encontrar un uso alternativo como agentes terapéuticos o de diagnóstico. Por tanto, el anticuerpo o fragmento del mismo puede ser específico en aspectos, por ejemplo, para un antígeno tumoral o un autoantígeno.

10 Una secuencia sustancialmente idéntica puede comprender una o más mutaciones conservativas de aminoácidos. Es conocido en la técnica que una o más mutaciones conservativas de aminoácido con respecto a una secuencia de referencia pueden dar lugar a un péptido mutante sin cambios sustanciales en las propiedades fisiológicas, químicas o funcionales en comparación con la secuencia de referencia; en tal caso, las secuencias de referencia y mutantes se considerarían polipéptidos "sustancialmente idénticos". La mutación conservativa de aminoácidos puede incluir la adición, delección o sustitución de un aminoácido; una sustitución de aminoácido conservativa se define en el presente documento como la sustitución de un resto de aminoácido por otro resto de aminoácido con propiedades químicas similares (por ejemplo, tamaño, carga o polaridad).

20 En un ejemplo no limitativo, una mutación conservativa puede ser una sustitución de aminoácido. Dicha sustitución conservativa de aminoácidos puede sustituir un aminoácido básico, neutro, hidrófobo o ácido por otro del mismo grupo. Por el término "aminoácido básico" se entiende aminoácidos hidrófilos que tienen un valor de pK de cadena lateral superior a 7, que normalmente tienen carga positiva a pH fisiológico. Los aminoácidos básicos incluyen histidina (His o H), arginina (Arg o R) y lisina (Lys o K). Por el término "aminoácido neutro" (también "aminoácido polar"), se entiende aminoácidos hidrófilos que tienen una cadena lateral que no está cargada a pH fisiológico, pero que tiene al menos un enlace en el que el par de electrones compartido en común por dos átomos es retenido más estrechamente por uno de los átomos. Los aminoácidos polares incluyen serina (Ser o S), treonina (Thr o T), cisteína (Cys o C), tirosina (Tyr o Y), asparagina (Asn o N) y glutamina (Gln o Q). La expresión "aminoácido hidrófobo" (también "aminoácido no polar") pretende incluir aminoácidos que presentan una hidrofobicidad mayor que cero de acuerdo con la escala de hidrofobicidad de consenso normalizada de Eisenberg (1984). Los aminoácidos hidrófobos incluyen prolina (Pro o P), isoleucina (Ile o I), fenilalanina (Phe o F), valina (Val o V), leucina (Leu o L), triptófano (Trp o W), metionina (Met o M), alanina (Ala o A) y glicina (Gly o G).

25 "Aminoácido ácido" se refiere a aminoácidos hidrófilos que tienen un valor de pK de cadena lateral de menos de 7, que normalmente tienen carga negativa a pH fisiológico. Los aminoácidos ácidos incluyen glutamato (Glu o E) y aspartato (Asp o D).

30 La identidad de secuencia se utiliza para evaluar la similitud de dos secuencias; se determina calculando el porcentaje de restos que son iguales cuando las dos secuencias están alineadas para una máxima correspondencia entre las posiciones de los restos. Para calcular la identidad de secuencia puede utilizarse cualquier método conocido; por ejemplo, hay disponible un programa informático para calcular la identidad de la secuencia. Sin ánimo de ser limitante, la identidad de secuencia puede calcularse mediante un programa informático tal como el servicio BLAST2 del NCBI mantenido por el Instituto Suizo de Bioinformática (y como se encuentra en ca.expasy.org/tools/blast/), BLAST-P, Blast-N, o FASTA-N, o cualquier otro programa informático apropiado conocido en la técnica.

35 45 Las secuencias sustancialmente idénticas de la presente invención pueden ser al menos el 85 % idénticas; en otro ejemplo, las secuencias sustancialmente idénticas pueden ser al menos el 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 % (o cualquier porcentaje entre ellas) idénticas a nivel de aminoácido con las secuencias descritas en el presente documento. En aspectos específicos, las secuencias sustancialmente idénticas conservan la actividad y especificidad de la secuencia de referencia. En una realización no limitativa, la diferencia en la identidad de secuencia puede deberse a una mutación (o mutaciones) conservativas de aminoácido.

50 Los polipéptidos o proteínas de fusión de la presente invención también pueden comprender secuencias adicionales para ayudar en su expresión, detección o purificación. Puede utilizarse cualquiera de tales secuencias o etiquetas conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, y sin ánimo de ser limitante, las proteínas de fusión pueden comprender una secuencia de direccionamiento o señal (por ejemplo, pero no limitado a, ompA), una etiqueta de detección, los casetes de etiquetas ilustrativos incluyen la etiqueta Estrep, o cualquier variante de la misma; véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 7.981.632, la etiqueta His, la etiqueta Flag que tiene el motivo de secuencia DYKDDDDK, la etiqueta Xpress, la etiqueta Avi, la etiqueta de Calmodulina, la etiqueta de poliglutamato, la etiqueta HA, la etiqueta Myc, la etiqueta Nus, la etiqueta S, la etiqueta SBP, Softag 1, Softag 3, la etiqueta V5, la proteína de unión a CREB (PUC), la glutatión S-transferasa (GST), la proteína de unión a maltosa (PUM), la proteína verde fluorescente (GFP), la etiqueta de tiorredoxina, o cualquier combinación de los mismos; una etiqueta de purificación (por ejemplo, pero no limitado a, una His₅ o His₆), o una combinación de los mismos.

55 60 En otro ejemplo, la secuencia adicional puede ser un sitio de reconocimiento de biotina tal como el descrito por Cronan *et al.* en WO 95/04069 o Voges *et al.* en WO/2004/076670. Como conocen también los expertos en la materia, las secuencias enlazadoras pueden utilizarse junto con las secuencias o etiquetas adicionales.

De manera más específica, un casete de etiqueta puede comprender un componente extracelular que puede unirse específicamente a un anticuerpo con alta afinidad o aidez. Dentro de una estructura de proteína de fusión monocatenaria, un casete de etiqueta puede ubicarse (a) inmediatamente amino-terminal con respecto a una región conectora, (b) interpuesto entre y conectando módulos enlazadores, (c) inmediatamente carboxi-terminal con respecto a un dominio de unión, (d) interpuesto entre y conectando un dominio de unión a un dominio efector, (e) interpuesto entre y conectando subunidades de un dominio de unión, o (f) en el extremo amino de una proteína de fusión monocatenaria. En determinadas realizaciones, uno o más aminoácidos de unión pueden estar dispuestos entre y conectando un casete de etiqueta con una porción hidrófoba, o dispuestos entre y conectando un casete de etiqueta con una región conectora, o dispuestos entre y conectando un casete de etiqueta con un módulo enlazador, o dispuestos entre y conectando un casete de etiqueta con un dominio de unión.

También se incluyen en el presente documento proteínas de fusión aisladas o purificadas, polipéptidos o fragmentos de los mismos inmovilizados en una superficie utilizando diversas metodologías; por ejemplo, y sin ánimo de ser limitante, los polipéptidos pueden unirse o acoplarse a la superficie a través de acoplamiento de etiqueta His, unión a biotina, unión covalente, adsorción y similares. La superficie sólida puede ser cualquier superficie adecuada, por ejemplo, pero no limitado a, la superficie del pocillo de una placa de microtitulación, canales de chips sensores de resonancia de plasmón superficial (RPS), membranas, perlas (tales como perlas de base magnética o de sefarosa u otra resina cromatográfica), vidrio, una película, o cualquier otra superficie útil.

En otros aspectos, las proteínas de fusión pueden estar unidas a una molécula de carga; las proteínas de fusión pueden suministrar la molécula de carga a un sitio deseado y pueden unirse a la molécula de carga utilizando cualquier método conocido en la técnica (tecnología recombinante, conjugación química, quelación, etc.). La molécula de carga puede ser cualquier tipo de molécula, tal como un agente terapéutico o de diagnóstico. Por ejemplo, y sin ánimo de ser limitante en modo alguno, el agente terapéutico puede ser un radioisótopo, que pueden utilizarse para radioinmunoterapia; una toxina, tal como una inmunotoxina; una citocina, tal como una inmunocitocina; una citotoxina; un inductor de la apoptosis; una enzima; un anticuerpo anti-cáncer para inmunoterapia; o cualquier otra molécula terapéutica adecuada conocida en la técnica. Como alternativa, un agente de diagnóstico puede incluir, pero de ninguna manera se limita a un radioisótopo, una etiqueta paramagnética tal como el gadolinio o el óxido de hierro, un fluoróforo, un fluorocromo o colorante de infrarrojo cercano (IRC) (tal como Cy3, Cy5.5, Alexa680, Dylight680 o Dylight800), una etiqueta de afinidad (por ejemplo, biotina, avidina, etc.), fusionada con una molécula basada en proteína detectable, o cualquier otro agente adecuado que pueda detectarse mediante métodos de obtención de imágenes. En un ejemplo específico, no limitativo, la proteína de fusión puede unirse a un agente fluorescente tal como FITC o puede fusionarse genéticamente con la Proteína Verde Fluorescente Potenciada (EGFP, forma siglada de *Enhanced Green Fluorescent Protein*).

En algunos aspectos, la molécula de carga es una proteína y está fusionada con la proteína de fusión de manera que la molécula de carga está contenida internamente en la nanojaula. En otros aspectos, la molécula de carga no está fusionada con la proteína de fusión y está contenida internamente en la nanojaula. La molécula de carga es normalmente una proteína, una molécula pequeña, un radioisótopo o una partícula magnética.

Las proteínas de fusión descritas en el presente documento se unen específicamente a sus dianas. La especificidad del anticuerpo, que se refiere al reconocimiento selectivo de un anticuerpo por un epítipo particular de un antígeno, de los anticuerpos o fragmentos descritos en el presente documento, se puede determinar basándose en la afinidad y/o la aidez. La afinidad, representada por la constante de equilibrio para la disociación de un antígeno con un anticuerpo (K_D), mide la fuerza de unión entre un determinante antigénico (epítipo) y un sitio de unión de anticuerpo. La aidez es la medida de la fuerza de unión entre un anticuerpo y su antígeno. Los anticuerpos normalmente se unen con una K_D de 10^{-5} a 10^{-11} M. Cualquier K_D mayor que 10^{-4} M se considera generalmente que indica una unión no específica. Cuanto menor sea el valor de K_D , más fuerte es la fuerza de unión entre un determinante antigénico y el sitio de unión del anticuerpo.

También se describen en el presente documento nanojaulas que comprenden al menos una proteína de fusión según se reivindica. Se entenderá que las nanojaulas pueden autoensamblarse a partir de múltiples proteínas de fusión idénticas, de múltiples proteínas de fusión distintas (y por lo tanto ser multivalente), de una combinación de proteínas de fusión y proteínas de tipo silvestre, y cualquier combinación de las mismas. Por ejemplo, las nanojaulas pueden estar decoradas con al menos una de las proteínas de fusión reivindicadas en combinación con al menos un anticuerpo anti-cáncer para inmunoterapia. En aspectos típicos, de aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 80 % de los monómeros de nanojaula comprenden la proteína de fusión descrita en el presente documento.

Además, en el presente documento se describen moléculas de ácido nucleico que codifican las proteínas de fusión y los polipéptidos descritos en el presente documento, así como vectores que comprenden las moléculas de ácido nucleico y células hospedadoras que comprenden los vectores.

Los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión descritas en el presente documento incluyen polinucleótidos con secuencias de ácido nucleico que son sustancialmente las mismas que las secuencias de ácido nucleico de los polinucleótidos de la presente invención. Una secuencia de ácido nucleico "sustancialmente la misma" se define en el

presente documento como una secuencia con al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 % de identidad con otra secuencia de ácido nucleico cuando las dos secuencias están alineadas de forma óptima (con inserciones o eliminaciones de nucleótidos apropiadas) y se comparan para determinar coincidencias exactas de nucleótidos entre las dos secuencias.

Las fuentes adecuadas de los ADN que codifican fragmentos de anticuerpos incluyen cualquier célula, tal como hibridomas y células de bazo, que expresa el anticuerpo de longitud completa. Los fragmentos pueden utilizarse por sí mismos como equivalentes de anticuerpos, o pueden recombinarse en equivalentes, como se describe anteriormente. Las deleciones y recombinaciones de ADN descritas en esta sección pueden llevarse a cabo por métodos conocidos, tales como los descritos en las solicitudes de patente publicadas enumeradas anteriormente en la sección titulada "Equivalentes funcionales de anticuerpos" y/u otras técnicas convencionales de ADN recombinante, tales como las descritas a continuación. Otra fuente de los ADN son los anticuerpos monocatenarios producidos a partir de una biblioteca de presentación de fagos, como se conoce en la técnica.

Adicionalmente, se proporcionan vectores de expresión que contienen las secuencias polinucleotídicas descritas previamente unidas operativamente a una secuencia de expresión, un promotor y una secuencia potenciadora. Se han desarrollado una diversidad de vectores de expresión para la síntesis eficaz del polipéptido de anticuerpo en sistemas procarióticos, tales como bacterias, y eucarióticos, incluyendo, pero no limitado a, los sistemas de cultivo de levaduras y células de mamífero. Los vectores de la presente invención pueden comprender segmentos de secuencias de ADN cromosómico, no cromosómico y sintético.

Puede utilizarse cualquier vector de expresión adecuado. Por ejemplo, los vectores de clonación procarióticos incluyen plásmidos de *E. coli*, tal como colEI, pCRI, pBR322, pMB9, pUC, pKSM y RP4. Los vectores procarióticos también incluyen derivados de ADN de fago tales como M13 y otros fagos filamentosos de ADN monocatenario. Un ejemplo de vector útil en levadura es el plásmido 2 μ . Los vectores adecuados para la expresión en células de mamífero incluyen derivados bien conocidos de SV-40, adenovirus, secuencias de ADN obtenidas de retrovirus y vectores lanzadera obtenidos de la combinación de vectores de mamífero funcionales, tales como los descritos anteriormente, y plásmidos funcionales y ADN de fago.

Se conocen en la técnica vectores de expresión eucarióticos adicionales (por ejemplo, P. J. Southern y P. Berg, *J. Mol. Appl. Genet.*, 1:327-341 (1982); Subramani et al, *Mol. Cell. Biol.*, 1: 854-864 (1981); Kaufmann y Sharp, "Amplification And Expression of Sequences Cotransfected with a Modular Dihydrofolate Reductase Complementary DNA Gene", *J. Mol. Biol.*, 159:601-621 (1982); Kaufmann y Sharp, *Mol. Cell. Biol.*, 159:601-664 (1982); Scahill et al., "Expression And Characterization Of The Product Of A Human Immune Interferon DNA Gene In Chinese Hamster Ovary Cells", *Proc. Nat'l Acad. Sci USA*, 80:4654-4659 (1983); Urlaub y Chasin, *Proc. Nat'l Acad. Sci USA*, 77:4216-4220, (1980)).

Los vectores de expresión normalmente contienen al menos una secuencia de control de la expresión que está unida operativamente a la secuencia o fragmento de ADN a expresar. La secuencia de control se inserta en el vector para controlar y regular la expresión de la secuencia de ADN clonada. Los ejemplos de secuencias de control de expresión útiles son el sistema lac, el sistema trp, el sistema tac, el sistema trc, principales regiones operadoras y promotoras del fago lambda, la región de control de la proteína de la cubierta fd, los promotores glucolíticos de levadura, por ejemplo, el promotor de la 3-fosfoglicerato cinasa, los promotores de la fosfatasa ácida de levadura, por ejemplo, Pho5, los promotores de los factores de apareamiento alfa de la levadura y los promotores obtenidos del polioma, adenovirus, retrovirus y virus de simio, por ejemplo, los promotores temprano y tardío o SV40, y otras secuencias conocidas para controlar la expresión de genes de células procariotas o eucariotas y sus virus o combinaciones de los mismos.

Además, en el presente documento se describen células hospedadoras recombinantes que contienen los vectores de expresión descritos anteriormente. Las proteínas de fusión descritas en el presente documento pueden expresarse en líneas celulares distintas de los hibridomas. Los ácidos nucleicos, que comprenden una secuencia que codifica un polipéptido de acuerdo con la invención, puede utilizarse para la transformación de una célula hospedadora de mamífero adecuada.

Las líneas celulares de preferencia particular se seleccionan basándose en el alto nivel de expresión, la expresión constitutiva de la proteína de interés y contaminación mínima de las proteínas del hospedador. Las líneas celulares de mamífero disponibles como hospedadoras para la expresión son bien conocidas en la técnica e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas, tales como, pero no limitado a, células de ovario de hámster chino (CHO), células de riñón de hámster bebé (BHK), y muchas otras. Las células eucariotas adicionales adecuadas incluyen levaduras y otros hongos. Los hospedadores procariotas útiles incluyen, por ejemplo, *E. coli*, tal como *E. coli* SG-936, *E. coli* HB 101, *E. coli* W3110, *E. coli* X1776, *E. coli* X2282, *E. coli* DHI y *E. coli* MRC1, *Pseudomonas*, *Bacillus*, tales como *Bacillus subtilis* y *Streptomyces*.

Estas presentes células hospedadoras recombinantes pueden utilizarse para producir proteínas de fusión cultivando las células en condiciones que permitan la expresión del polipéptido y purificando el polipéptido a partir de la célula hospedadora o del medio que rodea a la célula hospedadora. El direccionamiento del polipéptido expresado para la secreción en las células hospedadoras recombinantes puede facilitarse mediante la inserción de una señal o secuencia

codificante de un péptido líder secretor (véase, Shokri *et al.*, (2003) Appl Microbiol Biotechnol. 60(6): 654-664, Nielsen *et al.*, Prot. Eng., 10:1-6 (1997); von Heinje *et al.*, Nucl. Acids Res., 14:4683-4690 (1986)) en el extremo 5' del gen que codifica el anticuerpo de interés. Estos elementos de péptidos líder secretores pueden obtenerse de secuencias procaríóticas o eucarióticas. Por consiguiente, de manera conveniente, se utilizan péptidos líder secretores, que son aminoácidos unidos al extremo N-terminal de un polipéptido para dirigir el movimiento del polipéptido fuera del citosol de la célula hospedadora y la secreción en el medio.

Las proteínas de fusión descritas en el presente documento pueden fusionarse con restos de aminoácido adicionales. Dichos restos de aminoácido pueden ser una etiqueta peptídica para facilitar, por ejemplo, el aislamiento. Además, se contemplan otros restos de aminoácido para la dirección selectiva de los anticuerpos a órganos o tejidos específicos.

Se entenderá que se puede generar un nanojaula de Fab mediante cotransfección de HC-ferritina y LC. De manera alternativa, se pueden utilizar nanojaulas de Fab monocatenario-ferritina que solo precisan la transfección de un plásmido, tal como se muestra en la Figura 1C. Esto se puede hacer con enlazadores de distintas longitudes entre LC y HC, por ejemplo, de 60 o 70 aminoácidos. Cuando se utilizan Fab monocatenarios, puede asegurarse que la cadena pesada y la cadena ligera estén emparejadas. Las etiquetas (por ejemplo, Flag, HA, myc, His6x, Estrep, etc.) también se pueden añadir en el extremo N de la construcción o dentro del enlazador para facilitar la purificación como se ha descrito anteriormente. Además, puede utilizarse un sistema de etiqueta para asegurarse de que muchos Fab distintos estén presentes en la misma nanopartícula utilizando etapas de cromatografía de afinidad en serie/aditiva cuando se cotransfectan distintos plásmidos de nanopartículas de Fab. Esto proporciona multiespecificidad a las nanopartículas. Si se desea, pueden insertarse sitios de proteasas (por ejemplo, TEV, 3C, etc.) para escindir enlazadores y etiquetas después de la expresión y/o purificación. Un ejemplo de tal construcción es para el Fab 10E8 anti-VIH ampliamente neutralizante:

YELTQETGVSVALGRTVTITCRGDSLRSYASWYQKKPGQAPILLFYGKNNRPSGVPDRFS
 GSASGNRASLTISGAQAEDDAEYYCSSRDKSGSRLSVFGGGKTLTVLSQPKAAPSVTLFPP
 SSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLT
 PEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECGGSSGSGSGSTGENLYFQGSAGTTGTSAS
 TSGYPYDVPDYAGGGGSAGGTATLEVLFGQPSSGSSSSGGTGEVQLVESGGGLVKPGGG
 LRLSCSASGFDNNAWMTWVRQPPGKGLEWVGRITGPGEGWSVDYAAPVEGRFTISRLN
 SINFLYLEMNNLRMEDSGLYFCARTGKYYDFWSGYPPGEEYFQDWGRGTLVTVSSASTKG
 PSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS
 SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCSRGGGGGGSGGSGGSGGSMSSQI
 RQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDRDDVALEGVSHFFRELAEEKREGYERL
 LKMQNQRGGRALFQDIKKAPEDEWGKTPDAMKAAMALEKKNLQALLDLHALGSARTDPHL
 CDFLETHFLDEEVKLIKMGDHLTNLHRLGGPEAGLGEYLFERLTLRHD

En el presente documento también se describen métodos de vacunación de sujetos mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de las proteínas de fusión descritas en el presente documento a un mamífero que lo necesite, normalmente un mamífero joven, una cría de mamífero o recién nacido de mamífero. Terapéuticamente eficaz significa una cantidad eficaz para producir el efecto terapéutico deseado, tal como proporcionar una respuesta inmunitaria protectora frente al antígeno en cuestión.

Puede utilizarse cualquier vía adecuada para administrar las proteínas de fusión y las nanojaulas descritas en el presente documento. Las vías de administración incluyen, por ejemplo, la administración oral, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea o intramuscular.

Se entiende que las proteínas de fusión descritas en el presente documento, cuando se utilicen en un mamífero con fines de profilaxis o tratamiento, se administrarán en forma de una composición que comprende adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, por ejemplo, uno o más de agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de los mismos. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden también comprender cantidades mínimas de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que potencian la vida útil o la eficacia de las proteínas de unión. Las composiciones de la inyección pueden, como es bien sabido en la técnica, formularse de manera que proporcione una liberación rápida, sostenida o retardada del principio activo tras su administración al mamífero.

Aunque los anticuerpos humanos son particularmente útiles para la administración a seres humanos, también pueden administrarse a otros mamíferos. El término "mamífero", como se usa en el presente documento, pretende incluir, pero no se limita a, seres humanos, animales de laboratorio, mascotas domésticas y animales de granja.

5 También se incluyen en el presente documento kits de vacunación, que comprenden una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de una proteína de fusión descrita en el presente documento. Los kits pueden contener, además, por ejemplo, cualquier adyuvante adecuado. Los kits pueden incluir instrucciones.

10 La divulgación anterior describe en general la presente invención. Puede obtenerse una comprensión más completa haciendo referencia a los siguientes ejemplos específicos. Estos ejemplos se proporcionan solo con fines ilustrativos y no se pretende que sean limitantes, a menos que se especifique otra cosa. Por tanto, la invención no debe interpretarse de ninguna manera como limitada a los siguientes ejemplos, sino que, en cambio, debe interpretarse que abarca todas y cada una de las variaciones que se hagan evidentes como resultado de la enseñanza proporcionada en el presente documento.

15 Los siguientes ejemplos no incluyen descripciones detalladas de métodos convencionales, tales como los empleados en la construcción de vectores y plásmidos, la inserción de genes que codifican polipéptidos en tales vectores y plásmidos, o la introducción de plásmidos en células hospedadoras. Dichos métodos son bien conocidos por los expertos en la materia y se describen en numerosas publicaciones, incluida Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

20 Sin más descripción, se cree que un experto en la materia puede, utilizando la descripción anterior y los siguientes ejemplos ilustrativos, fabricar y utilizar los compuestos de la presente invención y practicar los métodos reivindicados. Los ejemplos divulgados en el presente documento, que no caen dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas, no forman parte de la invención y se proporcionan simplemente como ejemplos de referencia.

Ejemplos

30 **Ejemplo 1: Diseño de construcciones, clonación, expresión y purificación de nanopartículas**

Diseño de construcciones y clonación

35 Se obtuvo la secuencia de aminoácidos de la cadena L de la ferritina humana (Uniprot: P02792) y se añadió un enlazador de GGS_{4x} de 12 aminoácidos a los extremos N y C. Secuencia arriba del enlazador N-terminal, se añadió una etiqueta de afinidad StrepTag II para facilitar la purificación por afinidad, y se añadieron sitios de restricción AflII y XbaI para facilitar la clonación secuencia abajo. Adicionalmente, se añadieron sitios de restricción NheI y KpnI secuencia abajo con respecto al enlazador C-terminal (Figura 2A). De manera similar, se obtuvo la secuencia de aminoácidos de la lumazina sintasa de *Thermotoga maritima* (Uniprot: Q9X2E5) y se flanqueó con enlazadores de GGS_{4x} N y C-terminales. Se añadieron sitios de restricción AgeI y NheI al extremo N de esta construcción, y se añadieron sitios AflII y XbaI al extremo C, seguido de una StrepTag II (Figura 2B). Se optimizaron los codones de ambas construcciones para la expresión humana, se sintetizaron las construcciones y se clonaron en el vector de expresión pHLsec. La cadena pesada del Fab Epratuzumab (HC de Epratuzumab) o del Fab Denintuzumab (HC de Denintuzumab) se clonó en el extremo N de las construcciones de ferritina (Figura 2A) y lumazina sintasa (Figura 2B) utilizando los sitios de restricción mencionados anteriormente. Además, eGFP e iLOV se clonaron en el extremo C de la ferritina utilizando los sitios de restricción NheI y KpnI.

Expresión y purificación de nanopartículas

50 Las construcciones de HC de Fab-nanopartículas, la LC de Fab y la nanopartícula no conjugada (donde el Fab es denintuzumab o epratuzumab como ejemplos, y la nanopartícula es ferritina (Figura 2A) o lumazina sintasa (Figura 2B)), se cotransfectaron transitoriamente en células HEK293F (Thermo Fisher Scientific) en una relación 1:1:1. Las células se dividieron en cultivos de 200 ml a $0,8 \times 10^6$ células ml⁻¹. Se filtraron 50 µg de ADN y se mezclaron en una relación de 1:1 con el reactivo de transfección FectoPRO (Polyplus Transfections), y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 min. A continuación, se añadió la solución de ADN:FectoPRO directamente a las células, y las células se incubaron a 37 °C, 180 rpm, CO₂ al 8 % en un agitador Multitron Pro (Infors HT) durante 6-7 días.

60 Las células se recogieron mediante centrifugación a 6.371 xg durante 20 min y se conservaron y filtraron los sobrenadantes utilizando un filtro Steritop de 0,22 µm (EMD Millipore). Los sobrenadantes se pasaron a través de una columna de afinidad StrepTrap (GE Healthcare) a 4 ml min⁻¹. La columna se lavó con tampón Tris 20 mM pH 9,0, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM antes de la elución con Tris 20 mM pH 9,0, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM y destiotiotina 10 mM. Las fracciones que contenían nanopartículas eluidas se agruparon, concentraron y separaron en una columna de exclusión por tamaño Superose 6 Increase (GE Healthcare) a 0,5 ml min⁻¹ en tampón Tris 20 mM pH 9,0, NaCl 150 mM para lograr la homogeneidad del tamaño. Los datos que demuestran la pureza de las nanopartículas de ferritina (Figura 3A) y lumazina sintasa (Figura 3B) que expresan Fab de anticuerpo se muestran mediante perfiles de elución (arriba) y transferencias de Western (abajo).

Se utilizó el mismo protocolo para producir partículas de Ferritina-GFP/iLOV, con la excepción de que las células HEK293F se transfectaron solo con construcciones de ferritina-GFP/iLOV.

5 **Ejemplo 2: Microscopía electrónica de tinción negativa nanopartículas de ferritina y lumazina sintasa que expresan Fab de anticuerpo**

Se describe la producción de microfotografías electrónicas de las nanopartículas de ferritina (Figura 4A) y lumazina sintasa (Figura 4B) que expresan Fab de anticuerpo. Las nanopartículas purificadas se tiñeron con formiato de uranilo al 2 %. Se recopiló manualmente un conjunto de datos que consiste en 20-50 imágenes con un microscopio electrónico FEI Tecnai F20 de emisión de campo que funciona a 200 kV y una exposición de electrones de $30 \text{ e}^- \text{ \AA}^{-2}$. Las imágenes se adquirieron con una cámara de dispositivo de carga acoplada (CCD, forma siglada de *charge-coupled device*) Orius (Gatan Inc.) con un aumento calibrado de 34.483 x, lo que dio como resultado un tamaño de píxel de 2,61 Å en la muestra de ensayo y se utilizó un recorrido de desenfoque de aproximadamente 0,75 a 2 µm. Se seleccionaron manualmente un total de ~ 1000 imágenes de partículas con EMAN2. La clasificación bidimensional de imágenes de partículas se realizó con 50 clases permitidas.

20 **Ejemplo 3: Afinidades de unión de las nanopartículas de ferritina y lumazina sintasa que expresan Fab de anticuerpo**

Las afinidades de unión del Fab de epratuzumab Fab (Figura 5A), de epratuzumab-ferritina (Figura 5B) y de epratuzumab-lumazina sintasa (Figura 5C) a CD22 se midieron mediante interferometría de biocapa (IBC) utilizando el sistema Octet RED96 BLI (Pall ForteBio). Los biosensores de Ni-NTA se hidrataron en tampón de cinética 1x (PBS 1X, pH 7,4, tween al 0,002 %, BSA al 0,01 %) y se cargaron con CD22 25 ng µl⁻¹ (Uniprot: P20273) durante 300 s a 1.000 rpm. A continuación, los biosensores se transfirieron a pocillos que contenían tampón de cinética 1x para los valores de referencia durante 60 s antes de transferirlos a pocillos que contenían una dilución seriada de Fab/nanopartículas. La fase de asociación de 180 s fue seguida posteriormente por una etapa de disociación de 180 s en cinético 1x. El análisis se realizó con el programa informático Octet, con un modelo de ajuste 1:1.

30 **Ejemplo 4: Endocitosis mediada por receptor de nanopartículas de Fab que expresan anticuerpo**

Las nanopartículas de anticuerpo-ferritina (Figura 6A y 6B) o de ferritina sola (Figura 6C) (0,5 mg ml⁻¹ - 1 mg ml⁻¹) se etiquetaron en una relación de 10:1 v/v con Alexa Fluor-647 (4 mg ml⁻¹) (Thermo Fisher Scientific) durante 1 h. A continuación, las nanopartículas se dializaron durante 8 h en 2 l de PBS 1x, cambiando el tampón de diálisis 3 veces. Se utilizaron 5 µg ml⁻¹ de nanopartículas dializadas, marcadas para tratar células Bjab humanas (1x10⁶ células ml⁻¹) durante 5, 10 o 30 min. Después del tiempo de internalización deseado, las células se lavaron 3 veces y se dispensaron en una cámara Lab-Tek II (Nalge Nunc International). Las imágenes se capturaron utilizando un microscopio confocal de disco giratorio WaveFX-XI (Quorum Technologies) equipado con un objetivo de inmersión en aceite de 63x y una cámara EM-CCD (forma siglada de *electron-multiplying CCD*, dispositivo de carga acoplada multiplicador de electrones) (Hamamatsu Photonics). Se adquirieron imágenes del plano central de las células y las imágenes se procesaron y analizaron utilizando el programa informático Volocity (Improvision).

45 **Ejemplo 5. Las nanopartículas pueden fabricarse fluorescentes mediante la conjugación interna de una proteína fluorescente**

La clonación, expresión, purificación y ME es como se ha descrito anteriormente. Además, eGFP e iLOV se clonaron en el extremo C de la ferritina utilizando los sitios de restricción NheI y KpnI. Con respecto a la producción de partículas de Ferritina-GFP/iLOV, el protocolo es como se ha descrito anteriormente, con la excepción de que las células HEK293F se transfectaron solo con construcciones de ferritina-GFP/iLOV. La tinción se realizó como se describe anteriormente en el Ejemplo 2. La fluorescencia de las nanopartículas de ferritina-GFP/iLOV se midió con un transiluminador a una longitud de onda de 365 nm (Figura 7).

Ejemplo 6: Expresión y purificación de la proteína de fusión CSP-NPNA5,5-enlazador-1210

Las proteínas de fusión se construyeron y purificaron de la siguiente manera. Para empezar, se clonaron 5,5x repeticiones de NPNA de CSP seguidas de un enlazador de GGS flexible de 8, 10 o 12 restos en el extremo N de la secuencia del Fab del HC de 1210 en un vector de expresión pcDNA3.4 TOPO. NPNA de CSP 5,5-8x-Fab 1210 (Figura 10A), NPNA de CSP 5,5-10x-Fab 1210 (Figura 10B) y NPNA de CSP 5,5-12x-Fab 1210 (Figura 10C) se produjeron mediante expresión transitoria en células HEK293F mediante cotransfección con el gen de Lc de 1210 (Figura 10D) en un vector de expresión pcDNA3.4 TOPO utilizando el reactivo de transfección FectoPRO (Polyplus). La purificación se realizó mediante cromatografía de afinidad KappaSelect (GE Healthcare). Los Fab se purificaron adicionalmente mediante cromatografía de exclusión por tamaño (Superdex 200 Increase 10/300 GL, GE Healthcare; véanse la Figura 11 y 12).

65 **Ejemplo 7: Las proteínas de fusión no se unen a CSP, pero los anticuerpos de tipo silvestre las reconocen y se unen a ellas**

La determinación de la unión a CSP se realizó de la siguiente manera. Se realizaron experimentos de interferometría de biocapa (Octet RED96, ForteBio) para determinar si NPNA de CSP 5,5-enlazador-Fab 1210 podía reconocer a CSP, o si el sitio de unión de CSP estaba ocluido por NPNA 5,5 (Figura 13). La CSP recombinante se diluyó a 10 µg/ml en tampón de cinética (PBS, pH 7,4, BSA al 0,01 % (p/v), Tween-20 al 0,002 %) e se inmovilizó en biosensores de Ni-NTA (NTA) (ForteBio). Tras el establecimiento de unos valores de referencia estables con ligando cargado en tampón de cinética, los biosensores se sumergieron en pocillos que contenían Fab 1210, NPNA de CSP 5,5-8x-Fab 1210, NPNA de CSP 5,5-10x-Fab 1210 y NPNA de CSP 5,5-12x-Fab 1210. Luego, las puntas se volvieron a sumergir en tampón de cinética para controlar la constante de disociación.

La determinación de la afinidad de unión de los anticuerpos de tipo silvestre por las proteínas de fusión se realizó utilizando calorimetría de titulación isotérmica (CTI) de la siguiente manera. Los experimentos de titulación calorimétrica se realizaron con un microcalorímetro Auto-iTC200 MicroCalorimeter (MicroCal) a 25 °C. Las proteínas se dializaron frente a Tris 20 mM, NaCl 150 mM pH 8,0 durante una noche a 4 °C. NPNA de CSP 5,5-8x-Fab 1210, NPNA de CSP 5,5-10x-Fab 1210 y NPNA de CSP 5,5-12x-Fab 1210 (10 µM) de la celda calorimétrica se titularon con Fab 1210 (92 µM) en 15 inyecciones sucesivas de 2,5 µl. Los datos experimentales se analizaron de acuerdo con un modelo de unión 1:1 en Origin 7.0 y se muestran en las Figuras 14-16.

Ejemplo 8: Cromatografía de exclusión por tamaño-dispersión de luz multiángulo (CET-DLMA)

La determinación de la masa absoluta de la interacción anticuerpo-proteína de fusión se realizó de la siguiente manera. Los cocomplejos Fab 1210/NPNA de CSP 5,5-enlazador-Fab 1210 recuperados de la CTI se cargaron en un Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare), acoplado en línea en un sistema de cromatografía AKTA Pure (GE Healthcare) con los siguientes sistemas de detección calibrados: (i) detector MiniDawn Treos MALS (Wyatt); (ii) detector de dispersión de luz cuasielástica (QELS, DLCE) (Wyatt); y (iii) detector de índice de refracción (IR) Optilab T-reX (Wyatt). El procesamiento de datos se realizó utilizando el programa informático ASTRA (Wyatt) y se muestra en la Figura 18A.

Ejemplo 9. Las nanopartículas de Fab que expresan anticuerpos potencian la activación de los linfocitos B cuando se presentan conjuntamente con antígenos

Se clonó el trómero de Env de BG505 SOSIP en el extremo N de la ferritina utilizando los sitios de restricción AgeI y XbaI. Se obtuvo la secuencia de aminoácidos de eOD-GT6 y se añadió al extremo C de la lumazina sintasa, separados por un enlazador de GGS_{4x} y un sitio de restricción NheI. Se añadió una StrepTag II al extremo C de la construcción para facilitar la purificación por afinidad. Se optimizaron los codones de toda la construcción para la expresión en mamífero, se sintetizó y clonó en el vector de expresión pHLsec utilizando las enzimas de restricción AgeI y XhoI (Figura 19). La nanopartícula de HC de Fab, la LC de Fab y la nanopartícula de antígeno (donde Fab es denintuzumab, el antígeno es BG505 SOSIP o eODGT6 y la nanopartícula es ferritina o lumazina sintasa) se cotransfectaron transitoriamente en HEK293F (Thermo Fisher Scientific) como se describe en los ejemplos anteriores y se purificaron utilizando protocolos idénticos como se describe anteriormente, con la excepción de que las nanopartículas que contenían BG505 también se purificaron por afinidad con agarosa con Galanthus Nivalis Lectin (GNL) utilizando un lavado con cloruro de sodio 500 mM y elución con α-metilmanósido 1 M. La microscopía electrónica de tinción negativa fue como se describe en ejemplos anteriores. La interferometría de biocapa fue como se describe en ejemplos anteriores y utilizó CD19mVenus y Fab VRC01 como ligandos recubiertos en biosensores de Ni-NTA y Fab anti-ser humano para detectar respectivamente la unión a nanopartículas de denintuzumab y nanopartículas de BG505/eODGT6. Para ensayos de flujo de calcio (Figura 23), se incubaron células Bjab (1x10⁶ células) con 1 µM de colorante Fluo-4 (Life Technologies) en HBSS durante 30 min. Las células se lavaron dos veces con 5 ml de PBS 1X y se resuspendieron en 500 µl de RPMI, en hielo. Antes de la adquisición, las células se calentaron en un baño a 37 °C durante 5 min y se adquirieron en alto durante 30 s en el canal de FITC de un BD LSR Fortess Cell Analyzer para establecer los valores de referencia. Luego se añadieron a las células las cantidades indicadas de nanopartículas y se mezclaron rápidamente, después de lo cual se adquirieron los datos durante 5-10 min, o hasta que la señal volvió a los valores de referencia. Los datos se analizaron en FlowJo para establecer la intensidad media, que se trazó con respecto al tiempo.

Ejemplo 10: Diseño de nanopartículas de Fc monocatenario

Se diseñó una nanopartícula de Fc monocatenario utilizando la siguiente secuencia, donde la negrita indica el dominio Fc, la fuente normal indica el enlazador y el subrayado representa la ferritina:

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
 GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS
 DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSSGSGSGST
 GTSSSGTGTSAGTTGTSASTSGSGSGGGGGSGGGGSAGGTATAGASSGSGSSGSSSSG
 GTGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW
 YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
 VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSRGGGGG
 SGGSGSGSGSMSSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDRDDVALEGVSH
FFRELAEEKREGYERLLKMQNQRRGGRALFQDIKKPAEDEWKGKTPDAMKAAMALEKKLNQA
LLDLHALGSARTDPHLCDFLETHFLDEEVKLIKMGDHLTNLHRLGGPEAGLGEYLFERLTL
RHD

El dominio Fc del anticuerpo está plegado correctamente, como lo demuestra su capacidad para unirse a una columna de Proteína A. La elución se puede lograr con un pH bajo o con MgCl₂ 3 M, como se muestra en la Figura 24. Las nanopartículas de Fc monocatenario están correctamente ensambladas, como se muestra por un pico monodisperso en la cromatografía de exclusión por tamaño.

Ejemplo 11: La maduración de la afinidad antihomotípica mejora las respuestas de los linfocitos B humanos contra un epítipo repetitivo

RESUMEN

La maduración de la afinidad selecciona linfocitos B que expresan variantes de anticuerpos mutados somáticamente con propiedades de unión a antígeno mejoradas para la protección frente a los patógenos invasores. Los inventores determinaron el mecanismo molecular subyacente a la selección clonal y maduración de la afinidad de linfocitos B humanos que expresan anticuerpos protectores contra la proteína del circumsporozoíto del parásito del paludismo *Plasmodium falciparum* (PfCSP). Los inventores muestran con detalle molecular que la naturaleza repetitiva de PfCSP facilita las interacciones homotípicas directas entre dos anticuerpos monoclonales unidos a repeticiones de PfCSP, mejorando así la afinidad por el antígeno y la activación de los linfocitos B. Estos datos proporcionan una explicación del mecanismo de la fuerte selección de mutaciones somáticas que median las interacciones de anticuerpos homotípicas después de la exposición repetida al parásito en seres humanos. Los hallazgos de los inventores demuestran un modo distinto de maduración de la afinidad mediada por antígeno para mejorar las respuestas de anticuerpos frente a PfCSP y presumiblemente a otros antígenos repetitivos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Genotipado

El estudio fue aprobado por el comité de ética de la facultad de medicina y las clínicas universitarias de la Universidad de Tubinga y se adhirió estrictamente a las Prácticas correctas de investigación clínica y a los principios de la Declaración de Helsinki. El ensayo clínico del que se obtuvieron las muestras se registró como <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02115516> y el número 2013-003900-38 en la base de datos EudraCT y se llevó a cabo con FDA IND 15862 y con aprobación del Instituto Paul Ehrlich (8, 9). El ADN genómico se extrajo de sangre entera. Los segmentos de la familia génica IGHV3 se amplificaron utilizando cebadores con código de barras. Los amplicones se agruparon y se prepararon para la secuenciación utilizando el kit de preparación de bibliotecas sin PCR TruSeq (Illumina). La secuenciación se realizó en un secuenciador MiSeq utilizando un protocolo de extremos emparejados de 300-300 pb. Las lecturas de secuenciación se ensamblaron con PandaSeq (24) y se asignaron a los donantes mediante la identificación por código de barras.

Mutagénesis dirigida al sitio

La mutagénesis dirigida al sitio en los plásmidos que codifican anticuerpos se realizó utilizando el kit de mutagénesis dirigida al sitio Q5 (Qiagen).

Producción de anticuerpos y Fab

Para la producción de IgG, Las regiones variables de IGH e IGK se clonaron en vectores de expresión secuencia arriba de las regiones constantes de IGK e IGG1 humanas, respectivamente, como se ha descrito previamente (25).

- 5 Los anticuerpos monoclonales recombinantes se expresaron en células HEK293F (ThermoFisher Scientific) y las concentraciones de anticuerpos purificados con proteína G Sepharose (GE Healthcare) se determinaron mediante ELISA como se describió anteriormente (9, 10). Los Fab se generaron por digestión de IgG con papaína, se purificaron mediante cromatografía de Proteína A seguida de cromatografía de intercambio catiónico (MonoS, GE Healthcare) y cromatografía de exclusión por tamaño (Superdex200 Increase 10/300 GL, GE Healthcare). Para los estudios de CTI,
- 10 las regiones variables de IGH e IGK se clonaron en vectores de expresión pcDNA3.4 TOPO inmediatamente secuencia arriba de las regiones constantes de IGK e CH1 humanas, respectivamente. Los Fab se expresaron transitoriamente en células HEK293F (ThermoFisher Scientific) y se purificaron mediante cromatografía de afinidad KappaSelect (GE Healthcare) y cromatografía de exclusión por tamaño (Superdex 200 Increase 10/300 GL, GE Healthcare).

15 Producción de antígenos

- Se realizaron ELISA contra NANP₅ (Alfa Diagnóstico Internacional), NANP₃ (PSL GmbH, Heidelberg) o PfCSP con un truncamiento N-terminal expresada en *E. coli* como se describió anteriormente (10, 26). Para la IBC, CET-DLMA y ME de tinción negativa de única partícula, se clonó PfCSP (cepa NF54) de longitud completa en pcDNA3.4-TOPO para la
- 20 expresión transitoria en células HEK293F. PfCSP se purificó a través de HisTrap Ni/NTA (GE Healthcare) y cromatografía de exclusión por tamaño (Superdex 200 Increase 10/300 GL, GE Healthcare).

Resonancia de plasmón superficial

- 25 Las mediciones de resonancia de plasmón superficial se realizaron en un instrumento BIACORE T200 (GE Healthcare) acoplado con un chip sensor serie S CM5 (GE Healthcare). Se utilizó HEPES diez milimolar con NaCl 150 mM a pH 7,4 como tampón de ejecución, como se describe (9). Los anticuerpos anti-IgG de ser humano se inmovilizaron en el chip utilizando un kit de captura de anticuerpos humanos basado en el acoplamiento de aminas. Se capturaron concentraciones iguales de anticuerpo de muestra y de control de isotipo en la muestra y en las celdas de flujo de referencia, respectivamente. Se inyectó tampón de ejecución durante 20 min a una velocidad de 10 µl/min para
- 30 estabilizar las celdas de flujo. Se inyectó NANP₃ a 0,015, 0,09, 0,55, 3,3 y 20 µM en tampón de ejecución a una velocidad de 30 µl/min. Las celdas de flujo se regeneraron con MgCl₂ 3 M. Los datos se ajustaron mediante análisis cinético en equilibrio utilizando el programa informático BIACORE T200 V2.0.

35 Cristalización y determinación de la estructura

- El 1210 purificado y los Fab H.2140/K.1210 quiméricos se concentraron a 12 mg/ml y se diluyeron a 10 mg/ml con NANP₅ (10 mg/ml) y NANP₃ (10 mg/ml), respectivamente, en una relación molar de 1:5 antes de los ensayos de cristalización. El Fab 1450 purificado y NANP₅ se mezclaron en una relación molar de 3:1 y el exceso de Fab 1450 se purificó mediante cromatografía de exclusión por tamaño (Superdex 200 Increase 10/300 GL, GE Healthcare). A
- 40 continuación, 1450-NANP₅ purificado se concentró a 6 mg/ml antes de los ensayos de cristalización. Los cocristales 1210-NANP₅ se crecieron en PEG 3350 al 20 % (p/v) y citrato de sodio 0,2 M y se crioprotegieron en etilenglicol al 15 % (p/v). Los cocristales de Fab quimérico H.2140/K.1210 formando complejo con NANP₃ se crecieron en PEG 4000 al 20 % (p/v), cloruro de sodio 0,6 M y MES 0,1 M pH 6,5 y se crioprotegieron en glicerol al 15 % (p/v). Los cocristales 1450-NANP₅ se crecieron en PEG 3350 al 22,5 % (p/v) y citrato de hidrógeno de diamonio 0,2 M y se crioprotegieron en etilenglicol al 15 % (p/v). Los datos se recopilaron en la línea de luz 08ID-1 en Canadian Light Source (CLS) o en la línea de luz 23-ID en Advanced Photon Source (APS), se procesaron y se cambió su escala utilizando XDS (27). Las estructuras se determinaron por reemplazo molecular utilizando Phaser (28). El perfeccionamiento de las
- 50 estructuras se llevó a cabo con phenix.refine (29) y las repeticiones de perfeccionamiento con Coot (30). Se accedió al programa informático a través de SBGrid (31).

Calorimetría de titulación isotérmica

- Los experimentos de titulación calorimétrica se realizaron con un instrumento Auto-iTC200 (Malvern) a 25 °C. Las proteínas se dializaron frente a Tris 20 mM pH 8,0 y cloruro de sodio 150 mM durante una noche a 4 °C. Los péptidos NANP₅ y NANP₃ se diluyeron en tampón de diálisis a 2-3 µM y se añadieron a la celda calorimétrica, que se tituló con los Fab 1210, 1210_GL, 1210 H.D100Ymut_K.N92Ymut(1210_YY) y 1210_H.K56_Nrev_K.N93_Srev(1210_NS) (100 µM) en 15 inyecciones sucesivas de 2,5 µl. Los experimentos se realizaron al menos tres veces y se informaron la media y error típico de la media (Fig. 30). Los datos experimentales se analizaron de acuerdo con un modelo de unión
- 60 1:1 mediante Origin 7.0. El análisis estadístico se realizó utilizando una prueba de Mann/Whitney unilateral en Prism.

Estudios de unión de interferometría de biocapa

- Se realizaron experimentos de IBC (Octet RED96, ForteBio) para determinar la avidéz de unión de las IgG 1210 y 1210_YY para PfCSP de longitud completa. PfCSP de longitud completa se diluyó a 10 µg/ml en tampón de cinética (PBS, pH 7,4, BSA al 0,01 % (p/v) y Tween20 al 0,002 %) e se inmovilizó en biosensores de Ni/NTA (NTA) (FortéBio).

Después del establecimiento de unos valores de referencia estables con ligando cargado en tampón de cinética, los biosensores se sumergieron en pocillos que contenían series de dilución al doble de IgG. Luego, las puntas se volvieron a sumergir en tampón de cinética para controlar la constante de disociación. Los datos cinéticos se analizaron utilizando el programa informático Data Analysis 9.0 de FortéBio y las curvas se ajustaron a un modelo de unión 1:1.

5

Cromatografía de exclusión por tamaño-dispersión de luz multiángulo (CET/DLMA)

El péptido NANP5 se cocomplejó con un exceso molar de tres veces de Fab 1210 y se cargó en un Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare), acoplado en línea a un sistema de cromatografía AKTA Pure (GE Healthcare) con los siguientes sistemas de detección calibrados: (i) detector MiniDawn Treos MALS (Wyatt); (ii) Detector de dispersión de luz cuasielástica (QELS, DLCE) (Wyatt); y (iii) detector de índice de refracción (IR) Optilab T-reX (Wyatt). Se cargaron trescientos treinta microgramos de PfCSP de longitud completa en un Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare), acoplado en línea con un HPLC Agilent Technologies 1260 Infinity II con los sistemas de detección descritos anteriormente. Se cocomplejó PfCSP de longitud completa (5 μ M) con un exceso molar de 20 veces de Fab 1210 (100 μ M) y se cargaron 100 μ l o 400 μ l en un Superose 6 Increase 10/300 GL (GE Healthcare) en línea con un HPLC Agilent Technologies 1260 Infinity II con los sistemas de detección descritos anteriormente. El procesamiento de datos se realizó utilizando el programa informático ASTRA (Wyatt).

10

15

Microscopía electrónica de transmisión con tinción negativa

20

Se recubrieron rejillas de Cu de malla 400 con colodión y se evaporó sobre las rejillas una fina capa continua de carbono. Se descargó el brillo de las rejillas de carbono de acuerdo con protocolos convencionales. Se aplicó una gota de 3 μ l de Fab 1210 cocomplejados con PfCSP de longitud completa en una rejilla de carbono con el brillo descargado. Después de 20 s, la rejilla se secó y se añadieron 3 μ l de solución de formiato de uranilo al 1 % (p/v) tres veces durante dos tandas de 5 s y una final de 18 s, con secados intermedios. Los datos se recopilaron en un FEI Tecnai 20 que se hizo funcionar a 200 kV. Se recogieron ciento veinte imágenes con un valor de desenfoque de entre 1 y 3 μ m. Inicialmente, se seleccionaron manualmente un total de 1080 imágenes de partículas con Relion 2.0 (32) y se realizó una clasificación bidimensional de imágenes de partículas con 10 clases permitidas. Posteriormente, las mejores seis clases bidimensionales que comprenden 947 imágenes de partículas se usaron para la selección automática de 13.146 imágenes de partículas de 120 microfotografías y la clasificación bidimensional se realizó con 50 clases permitidas.

25

30

Transducción retroviral de células TKO-EST

Se reconstituyeron células pre-B murinas con triple deficiencia de Rag2, λ 5 y SLP-65 TKO-EST, que carecen de expresión endógena de BCR, con genes de cadena ligera y pesada de Ig mediante transducción retroviral (33). Para la generación de partículas víricas, se clonaron construcciones que codificaban regiones variables completas de IGHM e IGK en las cadenas principales de los vectores pMIZCC y pMIZYN (34). Se sembraron $1,8 \times 10^5$ células de empaquetamiento viral Phoenix-Eco por pocillo en placas de cultivo de seis pocillos en medio de Dulbecco modificado de Iscove completo (IMDM, que incluía SFT al 5 %, Lglutamina 2 mM, 0,5 ml de β -mercaptoetanol y penicilina/estreptomina). Veinticuatro horas después, las células se transfectaron con 0,5 μ g de plásmido de cadena pesada y 0,5 μ g de cadena ligera, en 100 μ l de IMDM puro utilizando 3 μ l de reactivo GeneJuice y se incubaron durante 48 h a 37 °C y CO₂ al 8 %. Se recogieron los sobrenadantes y las partículas víricas se purificaron utilizando un filtro de 0,45 μ m. Se añadió 1 μ l/ml de polibreno a la suspensión de partículas víricas. En paralelo, se transfirieron 2×10^5 células TKO-EST a un tubo de 1,5 ml y se centrifugaron (366 x g, 4 °C, 5 min). Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento celular en 800 μ l de la suspensión de partículas víricas. Las células TKO-EST se sometieron a transducción por centrifugación a 366 x g y 37 °C. Después de 3 h, el medio se sustituyó con IMDM completo recién preparado complementado con IL-7 y las células se sembraron en placas de seis pocillos.

35

40

45

Medición del flujo de Ca²⁺

50

El flujo de Ca²⁺ se midió como se describe en (33). Después de la transducción vírica, se cargaron células 1×10^6 células TKO-EST durante 45 min a 37 °C con el colorante sensible al calcio Indo-1 AM (Molecular Probes). La solución de tinción de Indo-1 se preparó mezclando 25 μ l de la solución madre de Indo-1 (preparada diluyendo 50 μ g de Indo-1 en 25 μ l de DMSO) con 25 μ l de ácido plurónico F-127 y 113 μ l de STF, y se incubó (5 min, oscuridad, TA). Las células cargadas con Indo se lavaron en 5 ml de IMDM SFT al 1 %, se resuspendieron en 500 μ l de IMDM SFT al 1 % y se transfirieron a tubos de FACS. Cada muestra se precalentó individualmente durante 10 min a 37 °C en una placa caliente antes de la medición. Después de registrar valores de referencia del flujo de Ca²⁺ en un citómetro LSR durante 30 s, se añadieron 5 μ l de la solución de antígeno que contenía 4-hidroxitamoxifeno (4-OHT, concentración final: 2 μ M) y se registró el flujo de Ca²⁺ en respuesta al antígeno durante 6 min. La expresión de Ig en superficie en las distintas líneas celulares fue comparable cuando se midió en FACS mediante la unión de anticuerpos anti-IgM y anti-IgK marcados con fluorescencia. Se confirmó la funcionalidad comparable de todas las líneas celulares tras la estimulación con 4-OHT y el anticuerpo α -Igk (1 μ g/ml).

55

60

Ensayo de paso de Pf

65

Los ensayos de paso de Pf se realizaron en un formato de placa de 96 pocillos como se describe (9, 10). En resumen,

se preincubaron 75.000 esporozoítos de Pf obtenidos de glándulas salivales de mosquito *Anopheles coluzzii* hembra con distintas concentraciones de anticuerpos monoclonales durante 30 min antes de la incubación con hepatocitos humanos HC-04 en presencia de dextrano/rodamina 0,5 mg/ml (Molecular Probes). Se utilizaron esporozoítos no tratados y dextrano/rodamina solos como control positivo y para determinar la señal de fondo experimental, respectivamente. Tras la fijación con paraformaldehído (PFA) al 1 %, el porcentaje de positivas para dextrano positivo (es decir, células atravesadas) se midió utilizando un citómetro de flujo LSR II. Se restó la señal de fondo de todas las mediciones. La inhibición del paso se determinó basándose en la velocidad de paso observada para los esporozoítos no tratados. Se agruparon los datos de cada anticuerpo de al menos tres experimentos independientes y la curva de titulación se ajustó usando una función de Hill de tres parámetros.

Imunizaciones e infecciones de ratones

Todos los experimentos con animales fueron aprobados por la LAGeSo, Berlín, Alemania (H0027/12). Las inmunizaciones y las infecciones se realizaron como describió anteriormente (9, 10). En resumen, ratones hembra C57BL/6 de 8 semanas de edad (5 por grupo) se inmunizaron pasivamente por vía intraperitoneal con 100 µg o 30 µg de anticuerpo monoclonal humano anti-PfCSP o un control de isotipo (mGO53 (35)) en 100 µl de PBS. Veinticuatro horas posinmunización pasiva, se infectaron los ratones con 5.000 esporozoítos transgénicos para PfCSP de *Plasmodium berghei* (Pb-PfCSP) (10) mediante inyección subcutánea en la base de la cola. Se analizaron frotis de sangre teñidos con Giemsa diariamente desde el día 3 hasta el día 12 posinfección. Se contaron al menos 100 campos microscópicos para declarar la positividad parasitaria.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los esporozoítos del parásito del paludismo humano *Plasmodium falciparum* (Pf) expresan una proteína de superficie, la proteína del circumsporozoito (PfCSP), con una región de repetición de NANP central inmunodominante (1-3). Los anticuerpos contra la repetición pueden mediar la protección frente a la infección por Pf en modelos animales (4-6). Sin embargo, la protección mediada por anticuerpos anti-NANP no se logra fácilmente a través de la vacunación. Por tanto, la inducción de anticuerpos protectores para NANP de PfCSP es un objetivo importante en el desarrollo de vacunas preeritrocíticas (7). Recientemente, los inventores demostraron que la respuesta de linfocitos B de memoria para PfCSP anti-NANP en voluntarios sin exposición a Pf después de la exposición repetida a esporozoítos vivos de Pf bajo profilaxis con cloroquina maduró predominantemente a través de la selección clonal y la expansión de potentes anticuerpos de línea germinal codificados por IGHV3-33 e IGKV1-5 inhibidores de Pf con k de inmunoglobulina (Ig) de 8 aminoácidos (aa) de longitud que determina la región determinante de la complementariedad (CDR)3 (KCDR3:8) (8, 9).

En este caso, los inventores analizaron cinco anticuerpos representativos de línea germinal o de baja mutación con afinidades informadas en un péptido de 5 monómeros de NANP (NANP₅) de entre 10⁻⁶ y 10⁻⁹ M (Fig. 25A y Tabla 1) (9). La unión al antígeno se anuló cuando la Vk1-5 de Ig original se sustituyó por Vk2-28, o cuando las cadenas pesadas de Ig (IgH) nativas se emparejaron con una cadena ligera Vk1-5 con una KCDR3 de 9 aa de longitud (Fig. 25B), lo que demuestra la importancia de estas características específicas del gen de Ig en el reconocimiento de los antígenos.

Tabla 1. Características de los genes de anticuerpos VH3-33/VK1-5/K:8.

Acm	IGHV	IGHJ	H CDR3	IGKV	IGKJ	KCDR3	Isotipo	SHM de sustitución	
								H	K
2290	IGHV3-33	IGHJ3	ARVQDSEYGGNSGAFDI	IGKV1-5	IGKJ4	QQYNSYFT	IGHM	0	0
1210	IGHV3-33	IGHJ3	ARVRDSSDYGGDAFDI	IGKV1-5	IGKJ1	QQYNNYWT	IGHM	2	3
2163	IGHV3-33	IGHJ4	ARVQTTTGGGSCCPFDY	IGKV1-5	IGKJ1	QQYNSYWT	IGHM	0	0
2219	IGHV3-33	IGHJ3	ARVQDSEYGGNSGVFDI	IGKV1-5	IGKJ4	QQYNSYFT	IGHM	4	1
2140	IGHV3-33	IGHJ5	AKVGEQVGDSSGYDDH	IGKV1-5	IGKJ5	QQYKSFWT	IGHG1	4	1

Todos los anticuerpos VH3-33/Vk1-5/KCDR3:8 estaban codificados por el alelo IGHV3-33*01 (9). IGHV3-33*01 difiere de tres segmentos genéticos por lo demás muy similares (IGHV3-30, IGHV3-30-3 e IGHV3-30-5) en la posición 52 de la CDR 2 de IgH (HCDR), que codifica estrictamente un triptófano y no serina o arginina (Tabla 2). Los mutantes H.W52_S y H.W52_R de los anticuerpos seleccionados, incluyendo un mutante H.W52_A en el anticuerpo 2140 y un doble mutante (H.W52_R, H.V50_F) para imitar los alelos IGHV3-30*02 e IGHV3-30-5*02, mostraron todos una reactividad reducida con las repeticiones de PfCSP asociada con una actividad inhibitoria del parásito reducida *in vitro* (Fig. 25, C y D).

Tabla 2. Restos de HCDR2 codificados por distintos IGHV3-33, IGHV3-30, Alelos IGHV3-30-3 e IGHV3-30-5.

Gen*	Alelo (o alelos)*	50	51	52	52A
<i>IGHV3-33</i>	01,02,03,04,06	V	I	W	Y
<i>IGHV3-33</i>	05	V	I	S	Y
<i>IGHV3-30</i>	01,03,04,05,06,07,08,09,10, 11,12,13,14,15,16,17,18,19	V	I	S	Y
<i>IGHV3-30-3</i>	01,02,03	V	I	S	Y
<i>IGHV3-30-5</i>	01	V	I	S	Y

*De acuerdo a <http://www.imgt.org/genedb/>.

5 La mayoría de los linfocitos B VH3-33/V κ 1-5/KCDR3:8 reactivos con NANP pertenecían a agrupamientos celulares diversificados por hipermutación somática (SHM) y expandidos clonalmente con una fuerte selección de mutaciones de sustitución en HCDR1 (H.S31) y HCDR2 (H.V50, H.N56), así como KCDR3 (K.S93), probablemente como resultado de la maduración de la afinidad (Fig. 25, E y F) (9). La introducción de mutaciones faltantes (mut) o retromutación (rev) en las posiciones H.V50 y, en menor medida, H.S31, reveló un papel en la unión a un péptido NANP₃ mínimo (10, 11) como se demostró para el anticuerpo de línea germinal 2163 y el anticuerpo de baja mutación 1210 (Fig. 25, G y H).
10 Por lo contrario, intercambios en las posiciones H.N56 y K.S93, ya sea solos (1210_H.K56_N^{rev}, 1210_K.N93_S^{rev}, 2163_H.N56_K^{mut}) o en combinación (1210_NS, 2163_KN), no mostraron un efecto significativo (Fig. 25, G y H). Por tanto, la maduración de la afinidad frente a la repetición explicó la fuerte selección de solo dos de las cuatro mutaciones de sustitución características en los anticuerpos anti-NANP VH3-33/V κ 1-5/KCDR3:8.

15 A continuación, los inventores determinaron la estructura cocrystalina del fragmento de unión a antígeno (Fab) de 1210 con NANP₅ (Fig. 26, Fig. 27A, y Tablas 3 a 4). El epítipo central de NANP contenía un giro β de tipo I y una conformación alargada (Fig. 26, A y C, y la Fig. 27B), de manera similar a NANP unido a un anticuerpo quimérico IgH 2140/Ig κ 1210 y en línea con observaciones previas (Fig. 27C y Tabla 5) (10-14). Los átomos de la cadena principal en KCDR3 se colocaron de manera óptima para mediar los enlaces de H con la repetición, probablemente contribuyendo a la fuerte selección de los KCDR3 de 8 aa de largo (Fig. 26, B y C, y Tablas 3 y 8). Los restos de la
20 línea germinal VH3-33 mediaron la mayoría de los contactos con el antígeno, en particular, H.V50 y H.W52 (el resto codificado exclusivamente por los alelos IGHV3-33), así como H.Y52A y H.Y58 en HCDR2 (Tabla 3 y Fig. 28) (15). La maduración de la afinidad en H.V50 y H.S31 puede explicarse por las interacciones de van der Waals fortalecidas con la repetición (Fig. 26C).

Tabla 3. Tabla de contactos entre NANP₅ y los Fab 1210.

NANP ₅ (BSA Å ²)	Interacción	1210 A	1210 B
Ala2 (A-9 B-30)			
Ala	VDW	H-Tyr58	H-Tyr100A
Ala ^N	HB		H-Tyr100A ^{OH}
Asn3 (A-43 B-10)			
Asn	VDW	H-Tyr58, H-Trp52, H-Tyr100A, H-Tyr100B	H-Tyr100A
Pro4 (A-123 B-0)			
Pro	VDW	K-Tyr94, K-Trp96, H-Trp52, H-Tyr58	
Asn5 (A-123 B-0)			
Asn	VDW	K-Tyr91, K-Asn92, K-Asn93, K-Tyr94, K-Trp96, H-Tyr100A, H-Tyr100B, H-Gly100C	
Asn ^{Oδ1}	HB	K-Tyr94 ^N	
Asn ^{Nδ2}	HB	K-Asn92 ^O	
Asn ^O	HB	H-Gly100C ^N	
Ala6 (A-28 B-16)			
Ala	VDW	H-Trp52, H-Tyr100A, H-Tyr100B, H-Gly100C	H-Tyr100A
Asn7 (A-72 B-0)			
Asn	VDW	H-Trp52, H-Val95, H-Ser98, H-Ser99, H-Asp100, H-Tyr100A, H-Tyr100B, H-Gly100C	
Asn ^N	HB	H-Tyr100A ^O	
Asn ^{Nδ2}	HB	H-Ser98 ^O , H-Asp100 ^O	
Asn ^O	HB	H-Trp52 ^{Ne1}	
Pro8 (A-124 B-0)			
Pro	VDW	H-Tyr32, H-Gly33, H-His35, H-Val50, H-Ile51, H-Trp52, H-Tyr52A, H-Val95, H-Gly100C	
Pro ^O	HB	H-Tyr52A ^N	
Asn9 (A-108 B-0)			
Asn	VDW	H-Asn31, H-Tyr32, H-Gly33, H-Tyr52A, H-Val95, H-Arg96, H-Asp97, H-Ser98	
Asn ^{Oδ1}	HB	H-Gly33 ^N	
Asn ^{Nδ2}	HB	H-Val95 ^O , H-Arg96 ^O	

		H-Asp97 ^{Oδ1}	
Ala10 (A-73 B-12)			
Ala	VDW	H-Asn31, H-Tyr32, H-Tyr52A, H-Asp97, H-Ser98	H-Tyr58
Ala ^N	HB	H-Asn31 ^O	
Asn11 (A-26 B-27)			
Asn	VDW	H-Ser98, H-Ser99, H-Asp100, H-Tyr100A, H-Tyr100B	H-Trp52, H-Tyr58, H-Tyr100B
Asn ^{Nδ2}	HB	H-Ser99 ^O , H-Asp100 ^O	
Pro12 (A-7 B-115)			
Pro	VDW	H-Ser99	K-Tyr94, K-Trp96, H-Trp52, H-Tyr58
Asn13 (A-17 B-121)			
Asn	VDW	H-Ser99	K-Tyr91, K-Asn92, K-Asn93, K-Tyr94, K-Trp96, H-Tyr100B, H-Gly100C
Asn ^{Oδ1}	HB	K-Tyr94 ^N	
Asn ^{Nδ2}	HB	K-Tyr94 ^O	
Asn ^O	HB	H-Gly100C ^N	
Ala14 (A-0 B-27)			
Ala	VDW	H-Trp52, H-Tyr100A, H-Tyr100B, H-Gly100C	
Asn15 (A-0 B-71)			
Asn	VDW	H-Trp52, H-Val95, H-Arg96, H-Ser98, H-Asp100, H-Tyr100A, H-Tyr100B, H-Gly100C	
Asn ^N	HB	H-Tyr100A ^O	
Asn ^{Nδ2}	HB	H-Ser98 ^O , H-Asp100 ^O	
Asn ^O	HB	H-Trp52 ^{Nε1}	
Pro16 (A-0 B-125)			
Pro	VDW	H-Asn31, H-Tyr32, H-Gly33, H-Val50, H-Ile51, H-Trp52, H-Tyr52A, H-Val95, H-Gly100C	
Pro ^O	HB	H-Tyr52A ^N	
Asn17 (A-0 B-107)			
Asn	VDW	H-Asn31, H-Tyr32, H-Gly33, H-Tyr52A, H-Val95, H-Arg96, H-Asp97, H-Ser98	
Asn ^{Oδ1}	HB	H-Gly33 ^N	

Asn ^{No2}	HB	H-Val95 ^O , H-Arg96 ^O , H-Asp97 ^{Oδ1}
Ala18 (A-0 B-68)		
Ala	VDW	H-Ser30, H-Asn31, H-Tyr32, H-Tyr52A
Ala ^N	HB	H-Asn31 ^O
Asn19 (A-0 B-51)		
Asn	VDW	H-Ser98, H-Ser99, H-Asp100, H-Tyr100A
Asn ^{No2}	HB	H-Ser99 ^O

HB: enlace de hidrógeno (límite de 3,89 Å)

VDW: van der Waals (límite de 5,0 Å)

5

Tabla 4. Tabla de contactos entre el Fab 1210 A y el Fab 1210 B.

Fab 1210 (A) (BSA Å ²)	Interacción	Fab 1210 (B)
H-Tyr52A (32)		
H-Tyr	VDW	H-Lys56
H-Tyr ^{OH}	HB	H-Lys56 ^{Nε}
H-Lys56 (30)		
H-Lys	VDW	H-Tyr100A
H-Ser99 (54)		
H-Ser	VDW	K-Asn92, K-Asn93, H-Tyr100B
H-Ser ^{Oγ}	HB	K-Asn92 ^O , K-Asn93 ^{Oδ1}
H-Ser ^O	HB	H-Tyr100B ^{OH}
H-Asp100 (45)		
H-Asp	VDW	K-Ser30, K-Trp32, K-Asn92, H-Tyr100B
H-Asp ^{Oδ2}	HB	K-Ser30 ^{Oγ} , K-Asn92 ^{No2}
H-Tyr100A (104)		
H-Tyr	VDW	K-Trp32, H-100Asp, H-Tyr100A, H-Tyr100B

10

HB: enlace de hidrógeno (límite de 3,89 Å)

VDW: van der Waals (límite de 5,0 Å)

Tabla 5. Tabla de contactos entre NANP₃ y el Fab quimérico H.2140/K.1210.

NANP ₃ (BSA Å ²)	Interacción	Fab H.2140 / K.1210
Ala2 (37)		
Ala	VDW	H-Lys56, H-Tyr58
Asn3 (12)		
Asn	VDW	K-Asn92, K-Asn93, H-Trp52, H-Tyr58
Asn ^{Oδ1}	WMHB	K-Asn92 ^O , K-Asn93 ^O
Asn ^{Nδ2}	WMHB	H-Ser100C ^{Oγ}
Asn ^O	WMHB	H-Tyr58 ^{OH}
Pro4 (117)		
Pro	VDW	K-Asn93, K-Tyr94, K-Trp96, H-Ile50, H-Trp52, H-Tyr58
Asn5 (132)		
Asn	VDW	K-Tyr91, K-Asn92, K-Asn93, K-Tyr94, K-Trp96, H-Asp100B, H-Ser100C, H-Ser100D
Asn ^{Oδ1}	HB	K-Tyr94 ^N
Asn ^{Nδ2}	HB	K-Tyr91 ^O , L-Tyr94 ^O , H-Ser100D ^O
Asn ^O	HB	H-Ser100D ^N
Ala6 (14)		
Ala	VDW	H-Trp52, H-Ser100D
Asn7 (35)		
Asn	VDW	H-Trp52, H-Glu97, H-Asp100B, H-Ser100D
Asn ^{Nδ2}	WMHB	H-Glu97 ^O , H-Asp100B ^O
Asn ^O	HB	H-Trp52 ^{Ne1}
Pro8 (121)		
Pro	VDW	H-Tyr32, H-Gly33, H-Ile50, H-Ile51, H-Trp52, H-Tyr52A, H-Val95, H-Ser100D
Pro ^O	HB	H-Gly33 ^N , H-Tyr52A ^N
Asn9 (85)		
Asn	VDW	H-Ser31, H-Tyr32, H-Gly33, H-Tyr52A, H-Val95, H-Gly96, H-Glu97, H-Ser100D
Asn ^{Oδ1}	HB	H-Gly33 ^N
Asn ^{Nδ2}	WMHB	H-Glu97 ^O , H-Ser100D ^{Oγ}
Ala10(62)		
Ala	VDW	H-Ser30, H-Ser31, H-Tyr32, H-Tyr52A
Ala ^N	HB	H-Ser31 ^O

- 5 HB: enlace de hidrógeno (límite de 3,89 Å)
 WMHB: enlace de hidrógeno mediado por agua (límite de 3,89 Å)
 VDW: van der Waals (límite de 5,0 Å)

Tabla 6. Tabla de contactos entre NANP₅ y los Fab 1450

NANP ₃ (BSA Å ²)	Interacción	1450 A	1450 B
Asn1 (A-64 B-0)			
Asn	VDW	K-Lys50, H-Phe98	
Ala2 (A-65 B-0)			
Ala	VDW	K-Trp32, H-Phe98, H-Cys99, H-Ser100	
Asn3 (A-132 B-0)			
Asn	VDW	K-Tyr91, H-Glu95, H-Gly96, H-Gly97, H-Phe98, H-Cys99, H-Ser100, H-Cys100D, H-Tyr100E, H-Tyr100F, H-Tyr100G	
Asn ^N	HB	H-Phe98 ^O	
Asn ^{NO2}	HB	H-Glu95 ^{NO2} , H-Gly96 ^O , H-Phe98 ^O	
Pro4 (A-122 B-0)			
Pro	VDW	K-Trp32, H-Tyr91, H-Gly92, H-Cys100D, H-Tyr100E	
Pro ^O	HB	H-Tyr100E ^N	
Asn5 (A-45 B-18)			
Asn	VDW	H-Ser100A, H-Cys100D, H-Thr100C, H-Tyr100E	H-Ser100
Asn ^{OS1}	HB	H-Ser100A ^{Oy}	
Asn ^{NO2}	HB		H-Ser100 ^{Oy}
Ala6 (A-93 B-0)			
Ala	VDW	H-Tyr58, H-Thr100C, H-Cys100D, H-Tyr100E	
Ala ^N	HB	H-Thr100C ^O	
Asn7 (A-18 B-17)			
Asn	VDW	H-Thr100C	H-Phe98, H-Ser100
Pro8 (A-3 B-30)			
Pro	VDW		K-Lys50
Pro ^O	HB		K-Lys50 ^{NE1}
Asn9 (A-0 B-28)			
Asn	VDW		K-Lys50, H-Phe98
Ala10 (A-0 B-46)			
Ala	VDW		H-Trp32, H-Phe98, H-Ser100
Asn11 (A-0 B-126)			
Asn	VDW		H-Trp32, K-Tyr91, H-Glu95, H-Gly96, H-Gly97, H-Phe98,

			H-Cys99, H-Cys100D, H-Tyr100E, H-Tyr100F, H-Tyr100G
Asn ^N	HB		H-Phe98 ^O
Asn ^{N62}	HB		H-Glu95 ^{N62} , H-Gly96 ^O , H-Phe98 ^O
Pro12 (A-0 B-127)			
Pro	VDW		K-Trp32, K-Tyr91, H-Cys100D, H-Tyr100E
Pro ^O	HB		H-Tyr100E ^N
Asn13 (A-31 B-50)			
Asn	VDW	H-Ser100, H-Ser100A	H-Cys99, H-Ser100, H-Ser100A, H-Thr100C, H-Cys100D, H-Tyr100E
Asn ^{N62}	HB	H-Ser100 ^{Oγ}	
Asn ^{O61}	HB		H-Ser100A ^N , H-Ser100A ^{Oγ}
Ala14 (A-0 B-84)			
Ala	VDW		H-Tyr58, H-Thr100C, H-Cys100D, H-Tyr100E
Ala ^N	HB		H-Thr100C ^O
Asn15 (A-0 B-20)			
Asn	VDW		H-Tyr58, H-Tyr100E
Asn ^O	HB		H-Tyr58 ^{OH}
Pro16 (A-0 B-31)			
Pro	VDW		H-Asp56, H-Tyr58, H-Thr100C
Asn17 (A-0 B-79)			
Asn	VDW		H-Gly55, H-Asp56, H-Thr57, H-Tyr58
Asn ^N	HB		H-Asp56 ^{O62}
Asn ^{O61}	HB		H-Thr57 ^N
Asn ^{N62}	HB		H-Thr57 ^{Oγ1}

HB: enlace de hidrógeno (límite de 3,89 Å)

VDW: van der Waals (límite de 5,0 Å)

5

Tabla 7. Tabla de contactos entre el Fab 1450 A y el Fab 1450 B.

Fab 1450 (A) (BSA Å ²)	Interacción	Fab 1450 (B)
K-Asn30 (33)		
Asn	VDW	K-Asn30
Asn ^{N62}	HB	K-Asn30 ^{O61}
H-Ser100 (25)		
Ser	VDW	H-Ser100, H-Ser100A
H-Ser100A (40)		
Ser	VDW	H-Ser100, H-Ser100A
H-Ala100B (7)		
Ala	VDW	H-Ser100

10

HB: enlace de hidrógeno (límite de 3,89 Å)

VDW: van der Waals (límite de 5,0 Å)

Tabla 8. BSA y sumario de contactos para las estructuras cristalinas.

Molécula fuente	Molécula diana	Enlaces de H			BSA (Å ²)		
		Cadena H	Cadena K	Total	Cadena H	Cadena K	Total
1210 (A)	NANP₅	13		15	533	140	673
1210 (B)	NANP₅	13	2	15	585	122	707
1210 (A)	1210 (B)	6	0	6	259	0	259
H.2140/K.1210	NANP₃	7	3	10	439	130	569
1450 (A)	NANP₅	8	0	8	369	149	518
1450 (B)	NANP₅	13	1	14	460	141	601
1450 (A)	1450 (B)	0	1	1	75	33	108

- 5 Notablemente, la estructura cristalina de los inventores también reveló que dos Fab 1210 (designados 1210 Fab A y Fab B) se unieron a un péptido NANP₅ en una configuración de cabeza a cabeza en un ángulo de 133° (Fig. 26D y Fig. 29). Este modo de unión único condujo a seis enlaces de H anticuerpo-anticuerpo homotípicos que proporcionaron 263 Å² de área de superficie oculta (BSA, forma siglada de *buried surface area*) entre los dos Fab y ~120 Å² adicionales de BSA entre los Fab y la repetición (Fig. 26, E y F, y Tablas 3, 4 y 8). Dos mutaciones altamente seleccionadas, H.N56_K y K.S93_N (Fig. 25, E y F), formaron enlaces de H con H.Y52A y H.S99 en el Fab opuesto, estabilizando así la configuración cabeza a cabeza (Fig. 26, G y H). La KCDR3 de 8 aa de longitud hizo contacto de manera óptima con la HCDR3 de la molécula 1210 opuesta, proporcionando otra explicación para la restricción de longitud en KCDR3.
- 10
- 15 Para investigar las interacciones homotípicas, los inventores midieron a continuación la afinidad del Fab por NANP₅ y NANP₃ para 1210, 1210_NS (que carece de las mutaciones seleccionadas implicadas en la unión homotípica), un mutante 1210 H.D100_Ymut/K.N92_Ymut (1210_YY, diseñado para alterar la unión cabeza a cabeza a través de bloqueos estéricos) y la línea germinal 1210 (1210_GL) (Fig. 26I y fig. 30). En comparación con 1210, 1210_YY y 1210_NS mostraron una afinidad significativamente más débil para NANP₅, pero no para NANP₃, mientras que 20 1210_GL fue significativamente peor en la unión a ambos péptidos (Fig. 26I y Fig. 30) (16). Estos datos sugieren que solo 1210 reconoció de forma eficaz la repetición en una configuración de unión cabeza a cabeza homotípica de alta afinidad. Un análisis de PfCSP de longitud completa con 38 repeticiones de NANP confirmó esta hipótesis. Aproximadamente doce Fab 1210 se unieron a PfCSP y reconocieron la repetición de NANP en una configuración de unión cabeza a cabeza similar a la estructura cristalina de Fab 1210-NANP₅ (Fig. 26, J y K, y la Fig. 29D) (11, 17).
- 25 Adicionalmente, 1210_YY, con su capacidad restringida para participar en interacciones de anticuerpos homotípicos, mostró una menor avidez de unión a PfCSP de longitud completa que 1210 (Fig. 31). Por tanto, la maduración de la afinidad selecciona mutaciones que mejoran las interacciones de anticuerpos homotípicos, aumentando así indirectamente la unión a NANP de PfCSP.
- 30 Para comprender mejor la selección de SHM a nivel celular, los inventores midieron el grado de activación de linfocitos B en respuesta a NANP₅ de líneas de linfocitos B transgénicos que expresan 1210 o receptores de linfocitos B (BCR) variantes (Fig. 32, A a D). La señalización del BCR se retrasó en las células que expresaban 1210_GL en comparación con 1210. Este efecto fue aún más pronunciado en las células con el mutante 1210_YY. Como se esperaba, 1210_V50Imut con alta afinidad por las repeticiones medió señales más fuertes que 1210, especialmente con bajas 35 concentraciones de antígeno, mientras que 1210_NS no mostró diferencias significativas (Fig. 32D). Por tanto, tanto la unión directa a NANP como las interacciones de anticuerpos homotípicos estimulan la activación de los linfocitos B. A pesar de una diferencia de dos logaritmos en las afinidades por NANP₃ (Fig. 25, G y H) y el variado potencial de estos anticuerpos para participar en interacciones homotípicas, todos mostraron capacidades similares para inhibir los esporozoítos de Pf *in vitro* (Fig. 32E y Fig. 33). Asimismo, todos los anticuerpos confirieron niveles similares de 40 protección dependiente de la dosis contra el desarrollo de parásitos en el estadio sanguíneo después de la inmunización pasiva en ratones, presumiblemente debido a los fuertes efectos de la avidez (Fig. 32F). Estos datos proporcionan una explicación del mecanismo de la fuerte selección *in vivo* de mutantes de anticuerpos anti-homotípicos por maduración de la afinidad, independientemente de su eficacia protectora como anticuerpos solubles.
- 45 Los anticuerpos de VH3 dominan la respuesta de memoria anti-PfCSP (9, 11, 14). Además de VH3-33/Vκ1-5/KCDR3:8, los inventores observaron en su selección un agrupamiento de anticuerpos de linfocitos B de memoria reactivos con NANP VH3-23/Vκ1-5 altamente mutados y con afinidad madurada (Fig. 34, A y B) (9). Aunque el modo de unión a NANP₅ de un anticuerpo VH3-23/Vκ1-5 representativo, 1450, fue distinto de 1210, también reconoció a NANP₅ en una configuración cabeza a cabeza, estando los HCDR3 en yuxtaposición directa y los restos K.N30 con 50 afinidad madurada formando un enlace de H entre Fab A y Fab B (Fig. 34, C a E; Fig. 35, A y B; y Tablas 6 y 7). El análisis de secuencias del agrupamiento de anticuerpos VH3-23/Vκ1-5 confirmó el enriquecimiento de los intercambios de aa que participan directamente en interacciones anticuerpo-antígeno, en contactos anticuerpo-anticuerpo, o favorecen una conformación de parátomos de 1450 óptima para el reconocimiento del epítipo NANP (Fig. 34B).

Después de la inmunización con PfSPZ-CVac de personas que nunca habían padecido paludismo, ~ el 15 % de los linfocitos B de memoria reactivos con PfCSP mostraron características de secuencia de VH3-33/Vκ1-5/KCDR3:8 o VH3-23/Vκ1-5 (Fig. 34F) (18). Además, estas células estaban fuertemente enriquecidas en el grupo de linfocitos B de memoria anti-PfCSP expandidos en comparación con la población no expandida (Fig. 34G). Por tanto, la maduración de la afinidad anti-homotípica se observa después de la exposición repetida al esporozoito Pf (9) en los anticuerpos VH3-33 de baja mutación y alta afinidad, así como en anticuerpos de menor afinidad que utilizan otras combinaciones de genes. Es probable que este fenómeno también tenga lugar en las respuestas de linfocitos B suscitadas por la vacunación contra la malaria con RTS,S (fig. 36) (11).

Por tanto, la maduración de la afinidad anti-homotípica, además de la maduración de la afinidad anticuerpo-antígeno tradicional, estimula la fuerte expansión clonal y la selección competitiva de linfocitos B reactivos con PfCSP en seres humanos. Incluso en ausencia de maduración de la afinidad, los anticuerpos VH3-33/Vκ1-5/KCDR3:8 son moléculas de unión a NANP moderadas a fuertes y potentes inhibidores de Pf. Esto depende críticamente de H.W52 en HCDR2. Debido a que IGHV3-33 está ubicado en una región de polimorfismo estructural del locus IGH, las frecuencias de haplotipos, especialmente en zonas endémicas para Pf, pueden determinar la inducción eficaz de respuestas anti-repeticiones de PfCSP humorales protectoras tras la vacunación (19). De hecho, un donante del estudio de los inventores fue negativo para IGHV3-33 (Fig. 37). Los inventores proponen que la maduración de la afinidad anti-homotípica puede ser una propiedad generalizable de las respuestas de linfocitos B si un antígeno repetitivo (palúdico u otro) acerca dos anticuerpos para optimizar la unión y estimular el agrupamiento de moléculas de inmunoglobulina de superficie a través de interacciones homotípicas (20, 21).

REFERENCIAS

1. F. Zavala, A. H. Cochrane, E. H. Nardin, R. S. Nussenzweig, V. Nussenzweig, Circumsporozoite proteins of malaria parasites contain a single immunodominant region with two or more identical epitopes. *J. Exp. Med.* 157, 1947-1957 (1983).

2. J. B. Dame, J. L. Williams, T. F. McCutchan, J. L. Weber, R. A. Wirtz, W. T. Hockmeyer, W. L. Maloy, J. D. Haynes, I. Schneider, D. Roberts, G. S. Sanders, E. P. Reddy, C. L. Diggs, L. H. Miller, Structure of the gene encoding the immunodominant surface antigen on the sporozoite of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science* 225, 593-599 (1984).

3. V. Enea, J. Ellis, F. Zavala, D. E. Arnot, A. Asavanich, A. Masuda, I. Quakyi, R. S. Nussenzweig, DNA cloning of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite gene: Amino acid sequence of repetitive epitope. *Science* 225, 628-630 (1984).

4. P. Potocnjak, N. Yoshida, R. S. Nussenzweig, V. Nussenzweig, Monovalent fragments (Fab) of monoclonal antibodies to a sporozoite surface antigen (Pb44) protect mice against malarial infection. *J. Exp. Med.* 151, 1504-1513 (1980).

5. N. Yoshida, R. S. Nussenzweig, P. Potocnjak, V. Nussenzweig, M. Aikawa, Hybridoma produces protective antibodies directed against the sporozoite stage of malaria parasite. *Science* 207, 71-73 (1980).

6. L. Foquet, C. C. Hermsen, G.-J. van Gemert, E. Van Braeckel, K. E. Weening, R. Sauerwein, P. Meuleman, G. Leroux-Roels, Vaccine-induced monoclonal antibodies targeting circumsporozoite protein prevent *Plasmodium falciparum* infection. *J. Clin. Invest.* 124, 140-144 (2014).

7. E. M. Riley, V. A. Stewart, Immune mechanisms in malaria: New insights in vaccine development. *Nat. Med.* 19, 168-178 (2013).

8. B. Mordmüller, G. Surat, H. Lagler, S. Chakravarty, A. S. Ishizuka, A. Lalremruata, M. Gmeiner, J. J. Campo, M. Esen, A. J. Ruben, J. Held, C. L. Calle, J. B. Mengue, T. Gebu, J. Ibáñez, M. Sulyok, E. R. James, P. F. Billingsley, K. C. Natasha, A. Manoj, T. Murshedkar, A. Gunasekera, A. G. Eappen, T. Li, R. E. Stafford, M. Li, P. L. Felgner, R. A. Seder, T. L. Richie, B. K. L. Sim, S. L. Hoffman, P. G. Kremsner, Sterile protection against human malaria by chemoattenuated PfSPZ vaccine. *Nature* 542, 445-449 (2017).

9. R. Murugan, L. Buchauer, G. Triller, C. Kreschel, G. Costa, G. Pidelaserra Martí, K. Imkeller, C. E. Busse, S. Chakravarty, B. K. L. Sim, S. L. Hoffman, E. A. Levashina, P. G. Kremsner, B. Mordmüller, T. Höfer, H. Wardemann, Clonal selection drives protective memory B cell responses in controlled human malaria infection. *Sci. Immunol.* 3, eaap8029 (2018).

10. G. Triller, S. W. Scally, G. Costa, M. Pissarev, C. Kreschel, A. Bosch, E. Marois, B. K. Sack, R. Murugan, A. M. Salman, C. J. Janse, S. M. Khan, S. H. I. Kappe, A. A. Adegnik, B. Mordmüller, E. A. Levashina, J.-P. Julien, H. Wardemann, Natural parasite exposure induces protective human anti-malarial antibodies. *Immunity* 47, 1197-1209.e10 (2017).

11. D. Oyen, J. L. Torres, U. Wille-Reece, C. F. Ockenhouse, D. Emerling, J. Glanville, W. Volkmuth, Y. Flores-Garcia, F. Zavala, A. B. Ward, C. R. King, I. A. Wilson, Structural basis for antibody recognition of the NANP repeats in *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 114, E10438-E10445 (2017).
- 5 12. A. Ghasparian, K. Moehle, A. Linden, J. A. Robinson, Crystal structure of an NPNArepeat motif from the circumsporozoite protein of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Chem. Commun.* 14, 174-176 (2006).
- 10 13. N. K. Kisalu, A. H. Idris, C. Weidle, Y. Flores-Garcia, B. J. Flynn, B. K. Sack, S. Murphy, A. Schön, E. Freire, J. R. Francica, A. B. Miller, J. Gregory, S. March, H.-X. Liao, B. F. Haynes, K. Wiehe, A. M. Trama, K. O. Saunders, M. A. Gladden, A. Monroe, M. Bonsignori, M. Kanekiyo, A. K. Wheatley, A. B. McDermott, S. K. Farney, G.-Y. Chuang, B. Zhang, N. Kc, S. Chakravarty, P. D. Kwong, P. Sinnis, S. N. Bhatia, S. H. I. Kappe, B. K. L. Sim, S. L. Hoffman, F. Zavala, M. Pancera, R. A. Seder, A human monoclonal antibody prevents malaria infection by targeting a new site of vulnerability on the parasite. *Nat. Med.* 24, 408-416 (2018).
- 15 14. J. Tan, B. K. Sack, D. Oyen, I. Zenklusen, L. Piccoli, S. Barbieri, M. Foglierini, C. S. Fregni, J. Marcandalli, S. Jongo, S. Abdulla, L. Perez, G. Corradin, L. Varani, F. Sallusto, B. K. L. Sim, S. L. Hoffman, S. H. I. Kappe, C. Daubenberger, I. A. Wilson, A. Lanzavecchia, A public antibody lineage that potently inhibits malaria infection through dual binding to the circumsporozoite protein. *Nat. Med.* 24, 401-407 (2018).
- 20 15. La importancia de H.Y52A y H.Y58 para la reactividad con las repeticiones se confirmó mediante mutaciones de alanina en los anticuerpos 1210, 2140 y 2219 (Fig. 29).
- 25 16. Todos los anticuerpos reconocieron a NANP₅ y NANP₃ con estequiometrías de unión de ~ 2 y ~ 1, respectivamente, demostrando que NANP₅ pero no NANP₃ más corto permite la unión de dos Fab.
- 30 17. C. R. Fisher, H. J. Sutton, J. A. Kaczmarek, H. A. McNamara, B. Clifton, J. Mitchell, Y. Cai, J. N. Dups, N. J. D'Arcy, M. Singh, A. Chuah, T. S. Peat, C. J. Jackson, I. A. Cockburn, T-dependent B cell responses to *Plasmodium* induce antibodies that form a high-avidity multivalent complex with the circumsporozoite protein. *PLOS Pathog.* 13, e1006469 (2017).
- 35 18. B. J. DeKosky, T. Kojima, A. Rodin, W. Charab, G. C. Ippolito, A. D. Ellington, G. Georgiou, In-depth determination and analysis of the human paired heavy- and light- chain antibody repertoire. *Nat. Med.* 21, 86-91 (2015).
- 40 19. C. T. Watson, K. M. Steinberg, J. Huddleston, R. L. Warren, M. Malig, J. Schein, A. J. Willsey, J. B. Joy, J. K. Scott, T. A. Graves, R. K. Wilson, R. A. Holt, E. E. Eichler, F. Breden, Complete haplotype sequence of the human immunoglobulin heavychain variable, diversity, and joining genes and characterization of allelic and copy-number variation. *Am. J. Hum. Genet.* 92, 530-546 (2013).
- 45 20. T. Hattori, D. Lai, I. S. Dementieva, S. P. Montañó, K. Kurosawa, Y. Zheng, L. R. Akin, K. M. Świst-Rosowska, A. T. Grzybowski, A. Koide, K. Krajewski, B. D. Strahl, N. L. Kelleher, A. J. Ruthenburg, S. Koide, Antigen clasping by two antigen-binding sites of an exceptionally specific antibody for histone methylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, 2092-2097 (2016).
- 50 21. H. M. Davies, S. D. Nofal, E. J. McLaughlin, A. R. Osborne, Repetitive sequences in malaria parasite proteins. *FEMS Microbiol. Rev.* 41, 923-940 (2017).
- 55 22. G. Yaari, J. A. Vander Heiden, M. Uduman, D. Gadala-Maria, N. Gupta, J. N. H. Stern, K. C. O'Connor, D. A. Hafler, U. Laserson, F. Vigneault, S. H. Kleinstein, Models of somatic hypermutation targeting and substitution based on synonymous mutations from high-throughput immunoglobulin sequencing data. *Front. Immunol.* 4, 358 (2013).
- 60 23. N. T. Gupta, J. A. Vander Heiden, M. Uduman, D. Gadala-Maria, G. Yaari, S. H. Kleinstein, Change-O: A toolkit for analyzing large-scale B cell immunoglobulin repertoire sequencing data. *Bioinformatics* 31, 3356-3358 (2015).
- 65 24. A. P. Masella, A. K. Bartram, J. M. Truszkowski, D. G. Brown, J. D. Neufeld, PANDAseq: Paired-end assembler for Illumina sequences. *BMC Bioinformatics* 13, 31 (2012).
25. T. Tiller, E. Meffre, S. Yurasov, M. Tsuiji, M. C. Nussenzweig, H. Wardemann, Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning. *J. Immunol. Methods* 329, 112-124 (2008).
26. K. Tewari, B. J. Flynn, S. B. Boscardin, K. Kastenmueller, A. M. Salazar, C. A. Anderson, V. Soundarapandian, A. Ahumada, T. Keler, S. L. Hoffman, M. C. Nussenzweig, R. M. Steinman, R. A. Seder, Poly(I:C) is an effective adjuvant for antibody and multifunctional CD4+ T cell responses to *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein (CSP) and α DEC-CSP in non human primates. *Vaccine* 28, 7256-7266 (2010).
27. W. Kabsch, XDS. *Acta Crystallogr. D* 66, 125-132 (2010).

28. A. J. McCoy, R. W. Grosse-Kunstleve, P. D. Adams, M. D. Winn, L. C. Storoni, R. J. Read, Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* 40, 658-674 (2007).
- 5 29. P. D. Adams, P. V. Afonine, G. Bunkóczi, V. B. Chen, I. W. Davis, N. Echols, J. J. Headd, L.-W. Hung, G. J. Kapral, R. W. Grosse-Kunstleve, A. J. McCoy, N. W. Moriarty, R. Oeffner, R. J. Read, D. C. Richardson, J. S. Richardson, T. C. Terwilliger, P. H. Zwart, PHENIX: A comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. D* 66, 213-221 (2010).
- 10 30. P. Emsley, B. Lohkamp, W. G. Scott, K. Cowtan, Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D* 66, 486-501 (2010).
31. A. Morin, B. Eisenbraun, J. Key, P. C. Sanschagrín, M. A. Timony, M. Ottaviano, P. Sliz, Collaboration gets the most out of software. *Elife* 2, e01456 (2013).
- 15 32. S. H. W. Scheres, A Bayesian view on cryo-EM structure determination. *J. Mol. Biol.* 415, 406-418 (2012).
33. S. Meixlsperger, F. Köhler, T. Wossning, M. Reppel, M. Müschen, H. Jumaa, Conventional light chains inhibit the autonomous signaling capacity of the B cell receptor. *Immunity* 26, 323-333 (2007).
- 20 34. F. Köhler, E. Hug, C. Eschbach, S. Meixlsperger, E. Hobeika, J. Kofer, H. Wardemann, H. Jumaa, Autoreactive B cell receptors mimic autonomous pre-B cell receptor signaling and induce proliferation of early B cells. *Immunity* 29, 912-921 (2008).
- 25 35. H. Wardemann, S. Yurasov, A. Schaefer, J. W. Young, E. Meffre, M. C. Nussenzweig, Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science* 301, 1374-1377 (2003)

Ejemplo 12: Experimentos de inmunización

- 30 La Figura 38 muestra que el antígeno de la vacuna contra el paludismo (NANP de CSP_{5,5}-enlazador-anticuerpo) suscita títulos de IgG que pueden reconocer el antígeno PfCSP de longitud completa. Como se esperaba, la respuesta se puede reforzar y aumenta a través de las tres dosis. En estos dos ejemplos, la vacuna contra el paludismo se presenta en dos nanopartículas distintas, una conduce a respuestas inmunitarias más fuertes que la otra. La Figura
- 35 39 muestra la actividad/función de los sueros anti-PfCSP suscitados procedentes de las inmunizaciones de la Figura 38. Esto se mide en un ensayo de inhibición del paso de esporozoítos. A una dilución dada de sueros, la actividad inhibitoria varía entre el 50 y el 80 %, dependiendo de cómo se presente la vacuna contra el paludismo en las nanopartículas. Estos resultados demuestran que 1) la vacuna contra el paludismo descrita en el presente documento induce respuestas inmunitarias antipalúdicas y que 2) el suero inmunitario resultante tiene capacidad inhibitoria contra los esporozoítos.

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión que comprende:
 - 5 un monómero de nanojaula; y
un fragmento de anticuerpo unido al monómero de nanojaula, comprendiendo el fragmento de anticuerpo un primer miembro de un par de unión;
en donde una pluralidad de las proteínas de fusión se autoensambla para formar una nanojaula en la que una pluralidad de los fragmentos de anticuerpo decora la superficie exterior de la nanojaula, por lo que el primer
 - 10 miembro del par de unión está expuesto para interactuar con un segundo miembro del par de unión,
que comprende además un enlazador entre el monómero de nanojaula y el fragmento de anticuerpo,
en donde el enlazador comprende de 1 a 30 restos de aminoácido,
en donde el monómero de nanojaula es la ferritina,
en donde el primer miembro del par de unión es una porción Fc de un anticuerpo y el segundo miembro del par de
 - 15 unión es un receptor de Fc, y
en donde el fragmento de anticuerpo comprende un Fc monocatenario (scFc).
2. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en donde el enlazador comprende de 8 a 16 restos de aminoácido.
- 20 3. La proteína de fusión de la reivindicación 1 o 2, en donde el enlazador comprende una repetición de GGS.
4. La proteína de fusión de la reivindicación 3, en donde el enlazador comprende cuatro repeticiones de GGS.
5. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además una fracción
- 25 detectable.
6. La proteína de fusión de la reivindicación 5, en donde la fracción detectable es una proteína fluorescente, tal como GFP, EGFP, Ametrina y/o una proteína fluorescente a base de flavina, tal como una proteína LOV, tal como iLOV.
- 30 7. Una nanojaula que comprende al menos una proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
8. La nanojaula de la reivindicación 7, en donde la nanojaula es multivalente.
9. La nanojaula de la reivindicación 7 u 8, en donde la nanojaula comprende de 3 a 100 monómeros de nanojaula, tal
- 35 como 24 o 60 monómeros.
10. La nanojaula de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 para su uso en el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad.
- 40 11. La nanojaula de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 para su uso en el tratamiento y/o la prevención del cáncer o de una enfermedad inmunitaria.
12. Una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

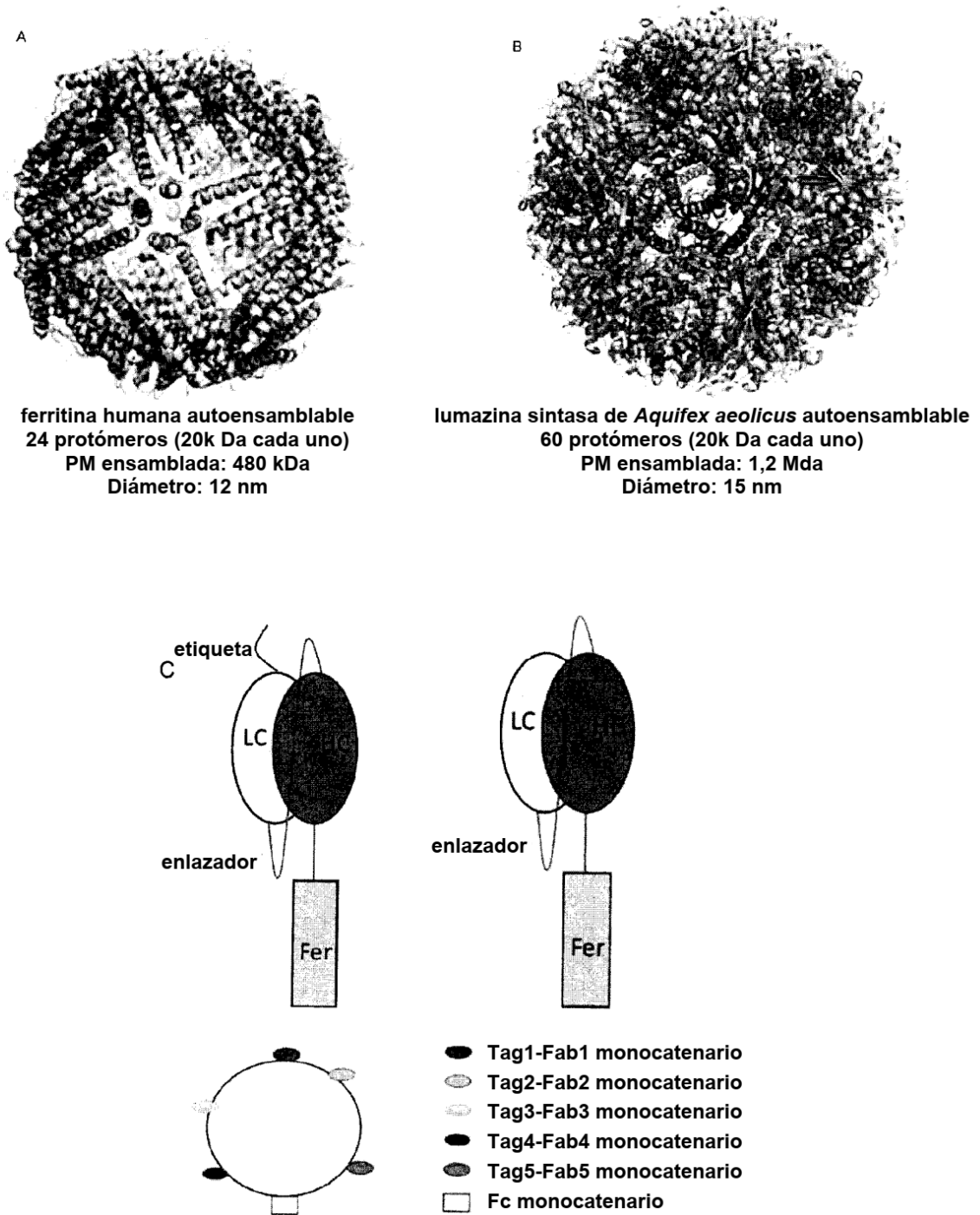


Figura 1

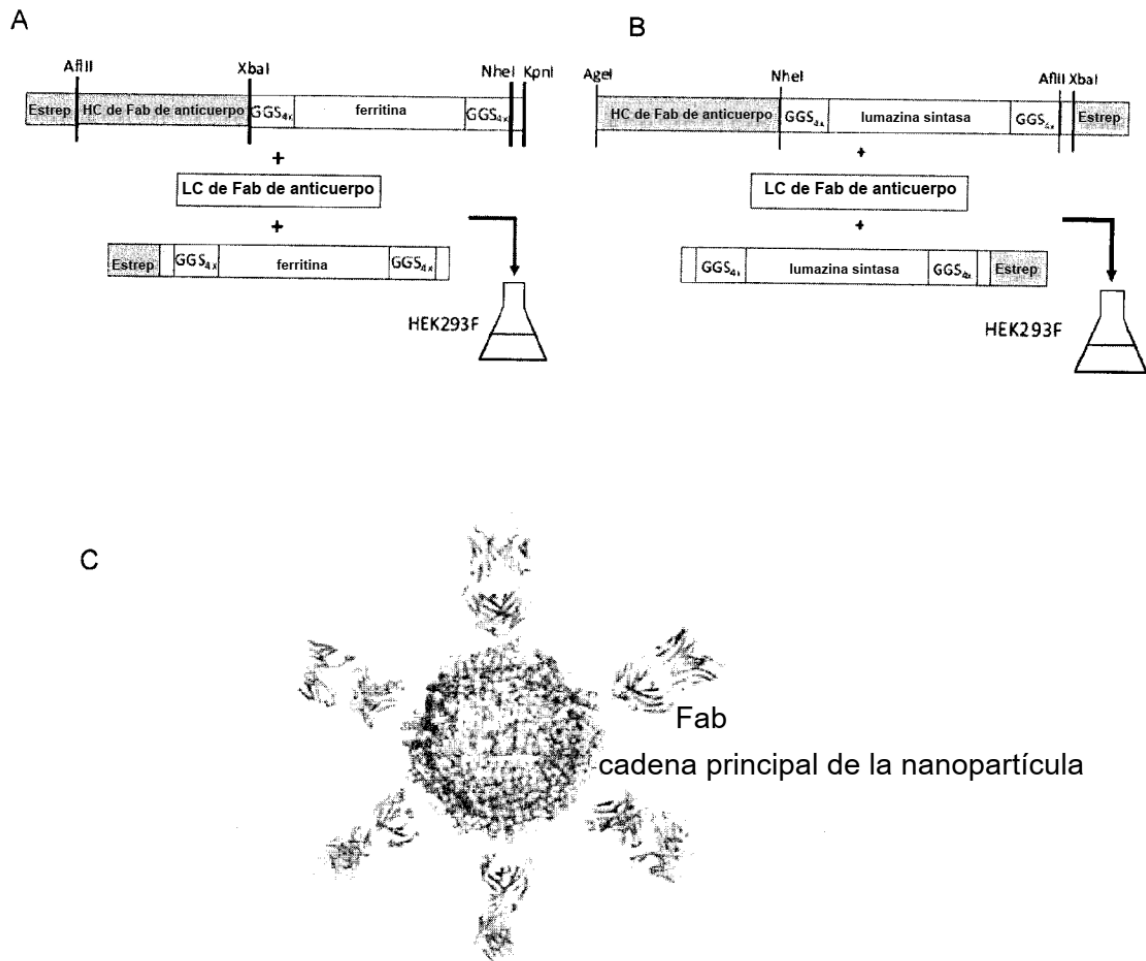


Figura 2

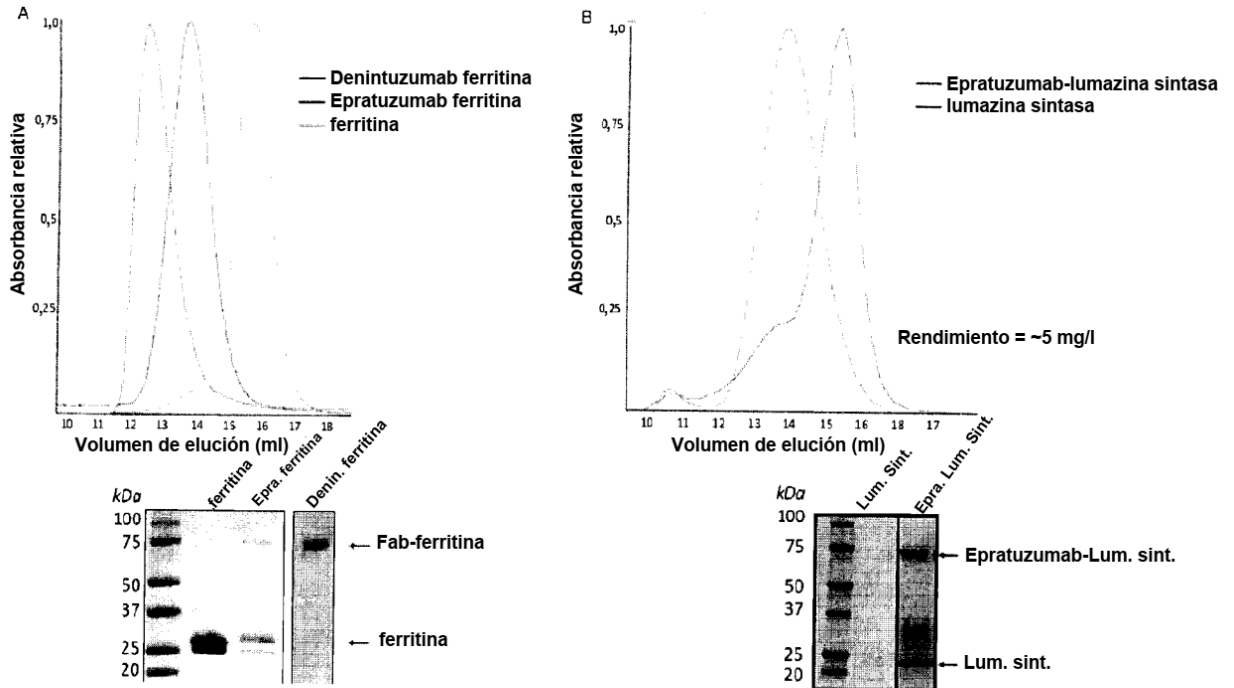


Figura 3

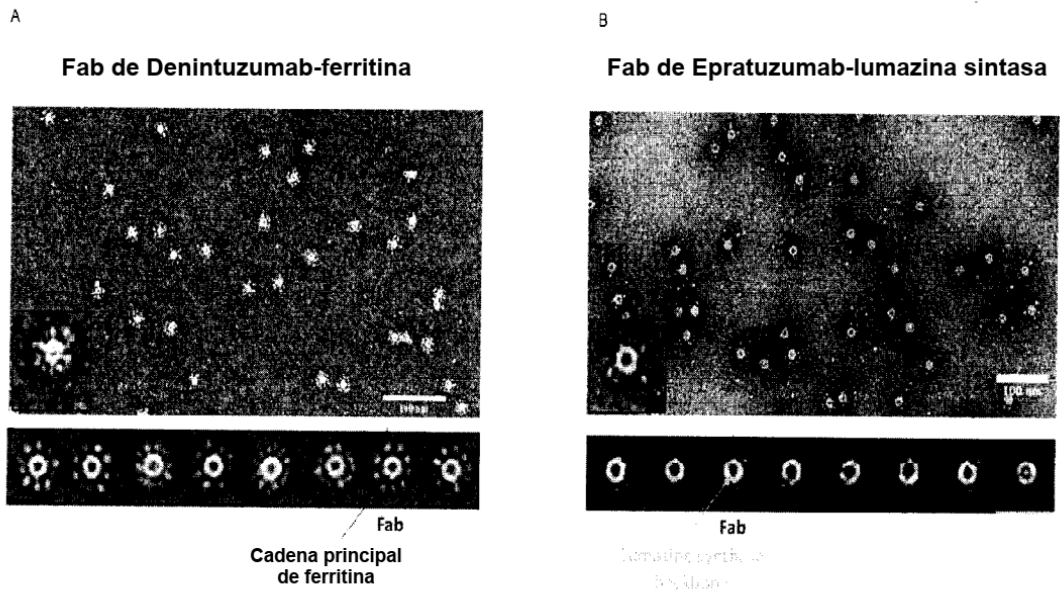


Figura 4

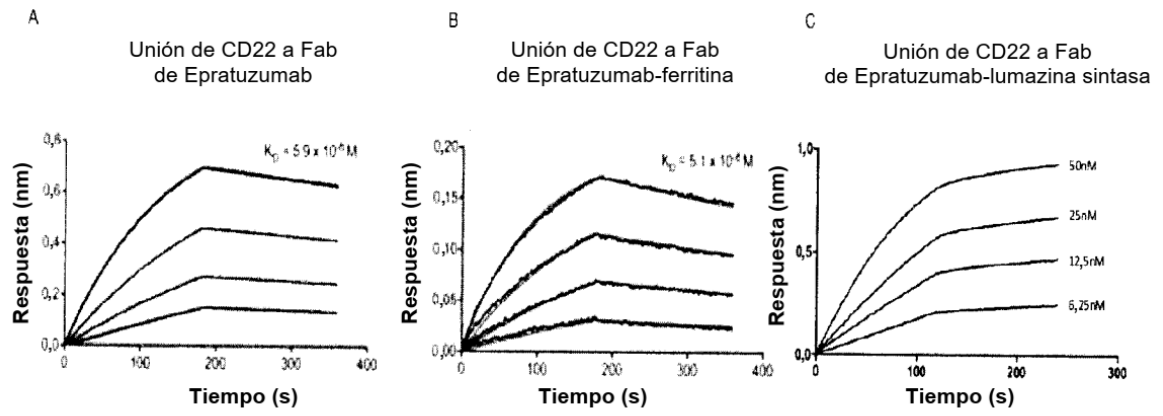


Figura 5

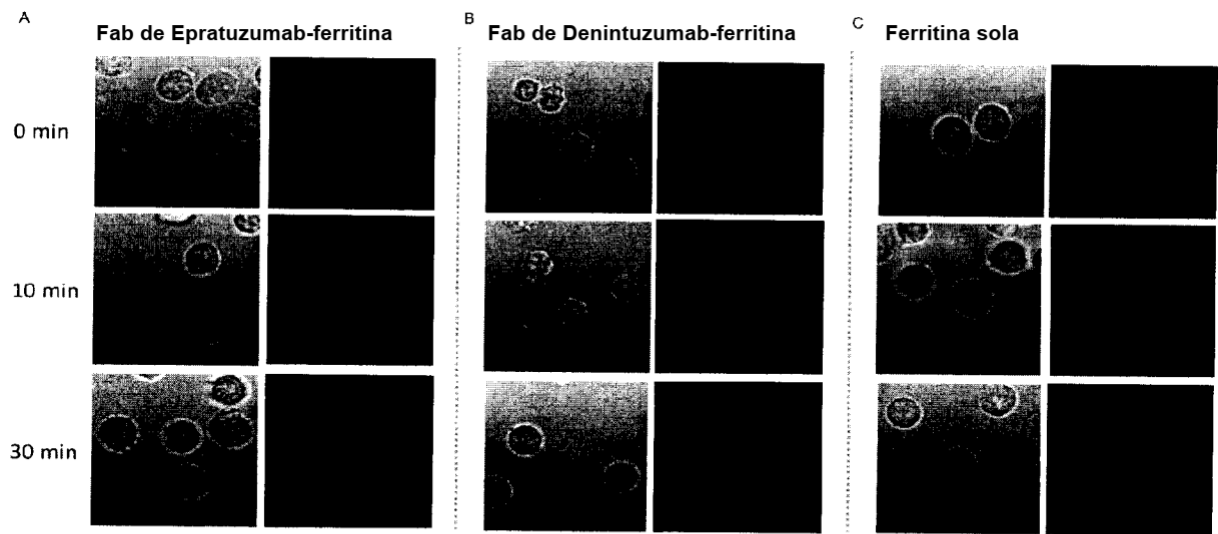


Figura 6

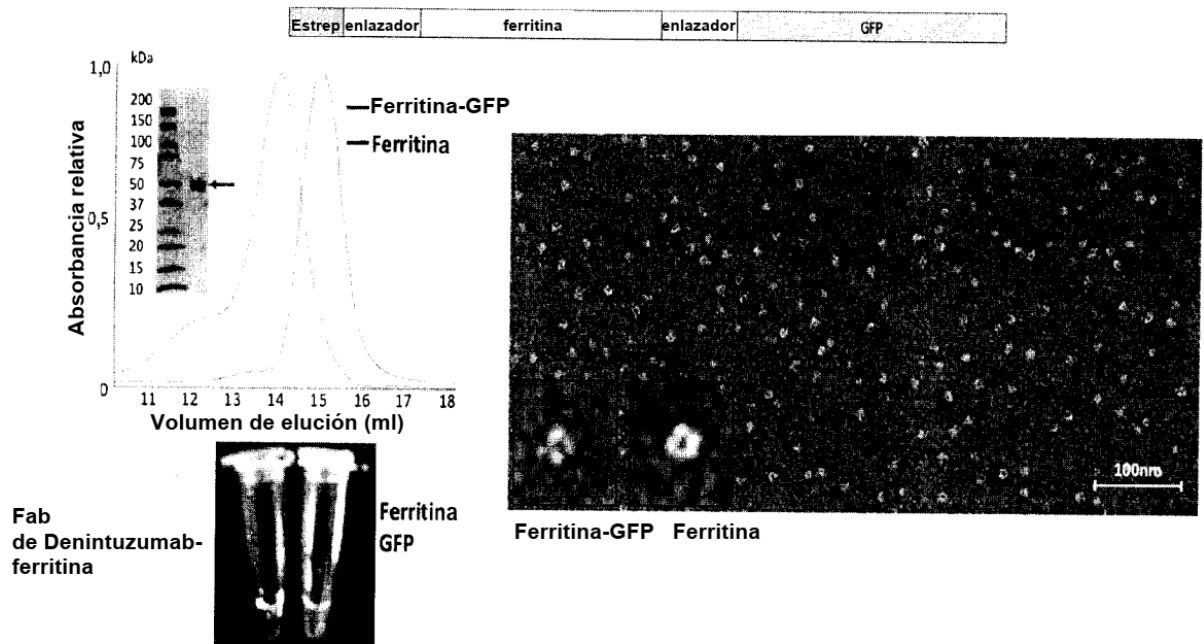


Figura 7

Ac para repetición de NANP inhibidor
+ (NANP)_{5x} - resolución de 3,2 Å

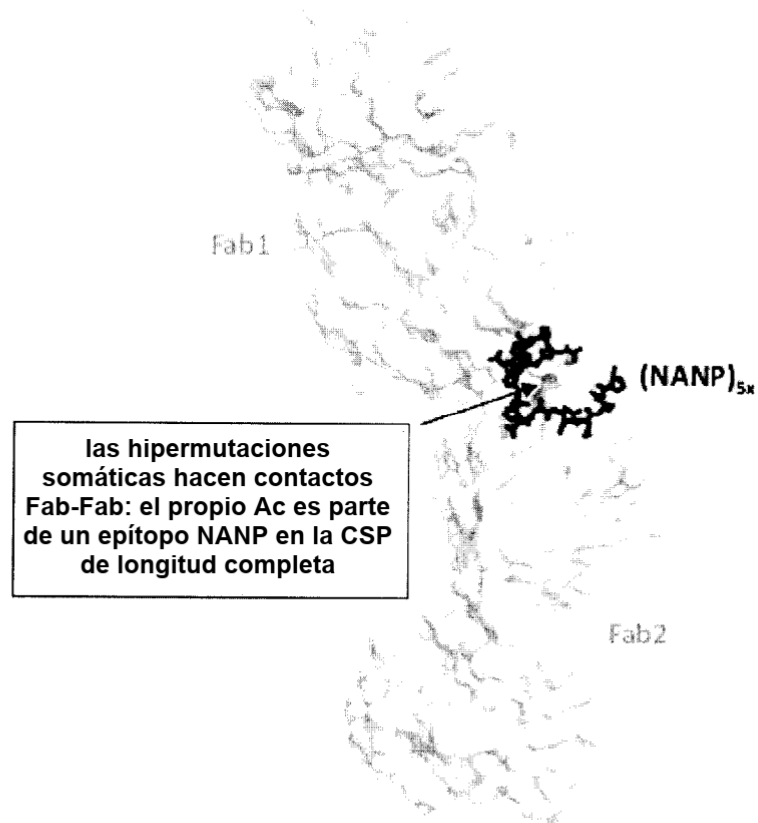


Figura 8

**Inmunógeno:
complejo preinmune
de (NANP)_{5,5x}**

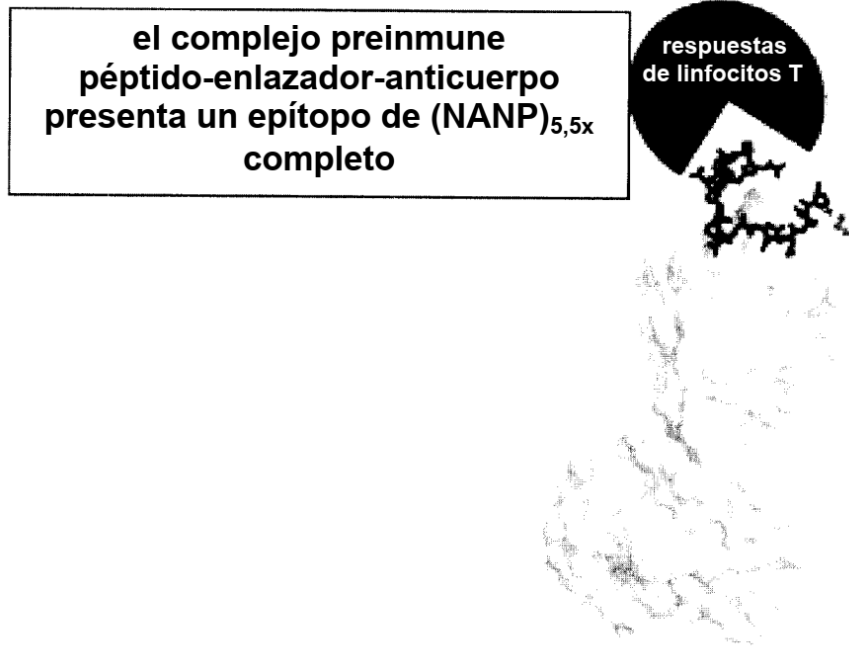


Figura 9

NANP5,5 de CSP-8xenlazador-HC de anticuerpo

NPNANPNANPNANPNANPNANPNANP⁸GGSGGSGGQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASG
FTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWIYDGSKKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL
QMNSLRAEDTAVYYCARVRDSSDYYGDAFDIWGQGMVTVSS

A

NANP5,5 de CSP-10xenlazador-HC de anticuerpo

NPNANPNANPNANPNANPNANPNANP¹⁰GGSGGSGGQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAA
SGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWIYDGSKKYYADSVKGRFTISRDN SKNTL
YLQMNSLRAEDTAVYYCARVRDSSDYYGDAFDIWGQGMVTVSS

B

NANP5,5 de CSP-12xenlazador-HC de anticuerpo

NPNANPNANPNANPNANPNANPNANP¹²GGSGGSGGQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCA
ASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWIYDGSKKYYADSVKGRFTISRDN SKNT
LYLQMNSLRAEDTAVYYCARVRDSSDYYGDAFDIWGQGMVTVSS

C

cotransfectado en células de mamífero HEK 293 con cadena ligera de anticuerpo:

DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASNLESGVPL
RFGSGSGTEFTLT¹ISSLPDDFATYYCQQYNNYWTFGGGTKVEIKRTVA

D

Figura 10

NANP5,5 de CSP-12xenlazador-anticuerpo

NANP5,5 de CSP-10xenlazador-anticuerpo

NANP5,5 de CSP-8xenlazador-anticuerpo

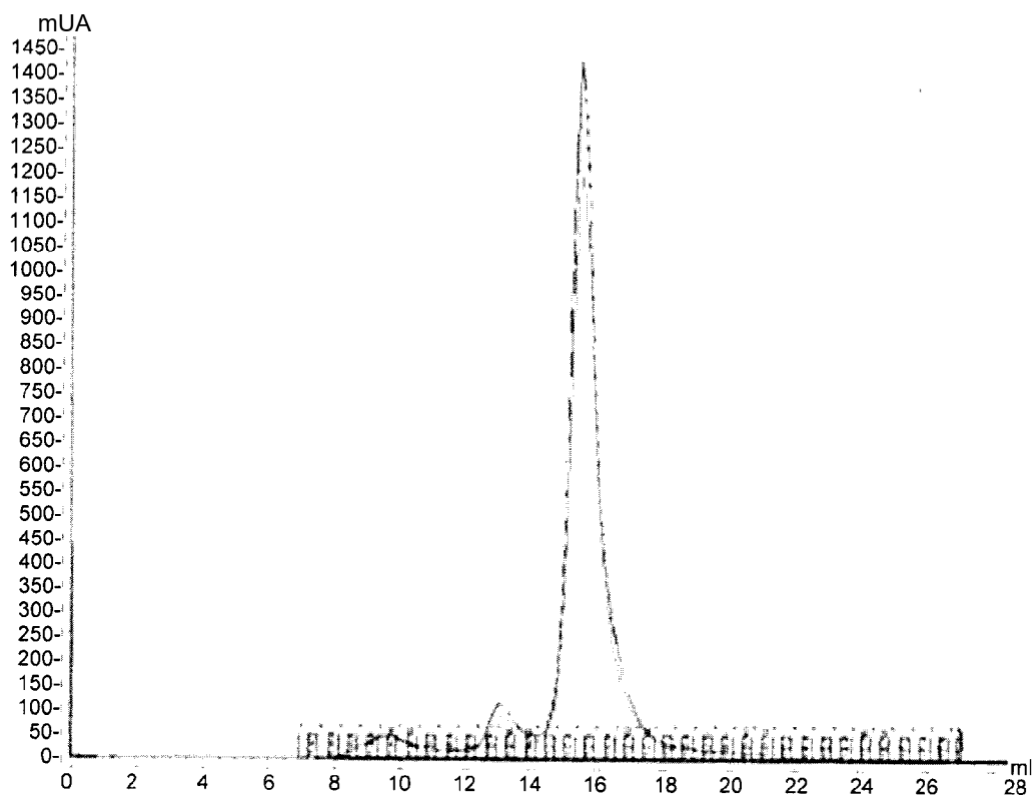


Figura 11

Anticuerpo de tipo silvestre

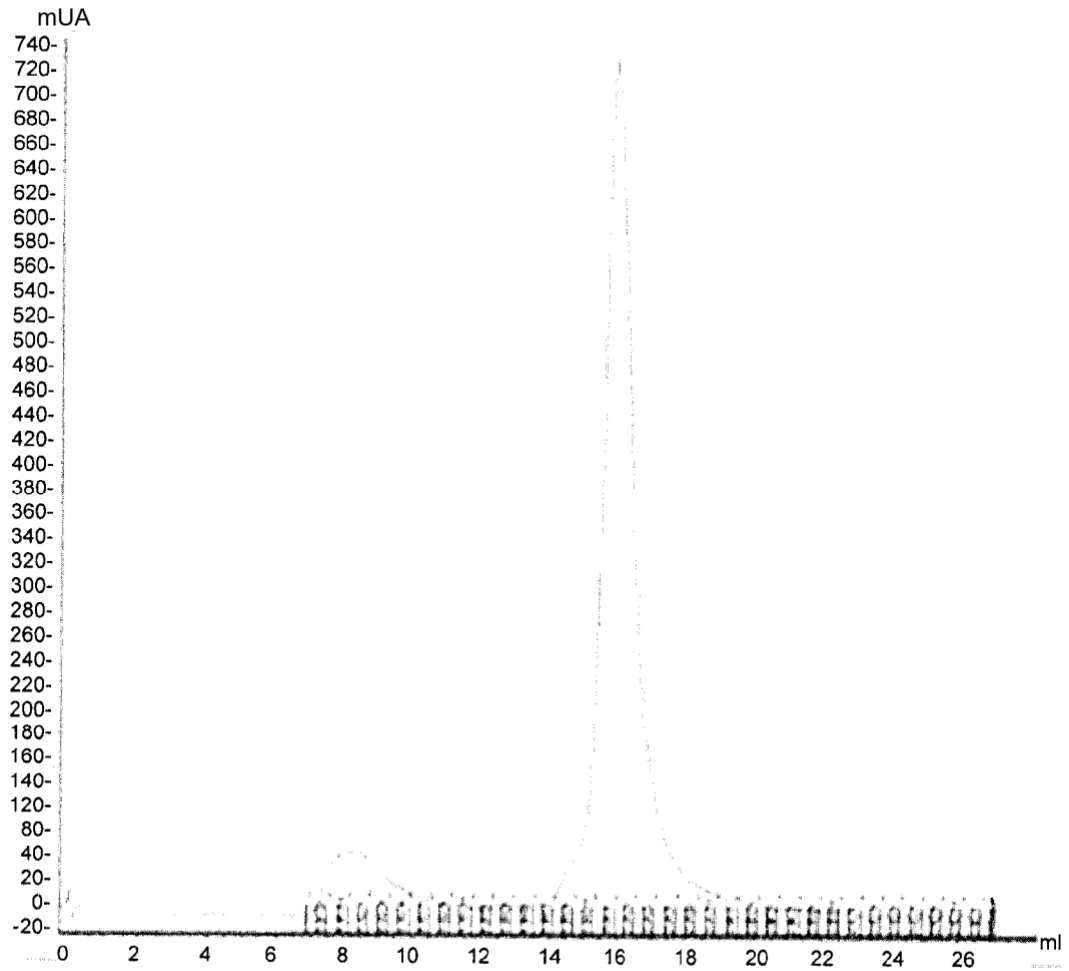


Figura 12

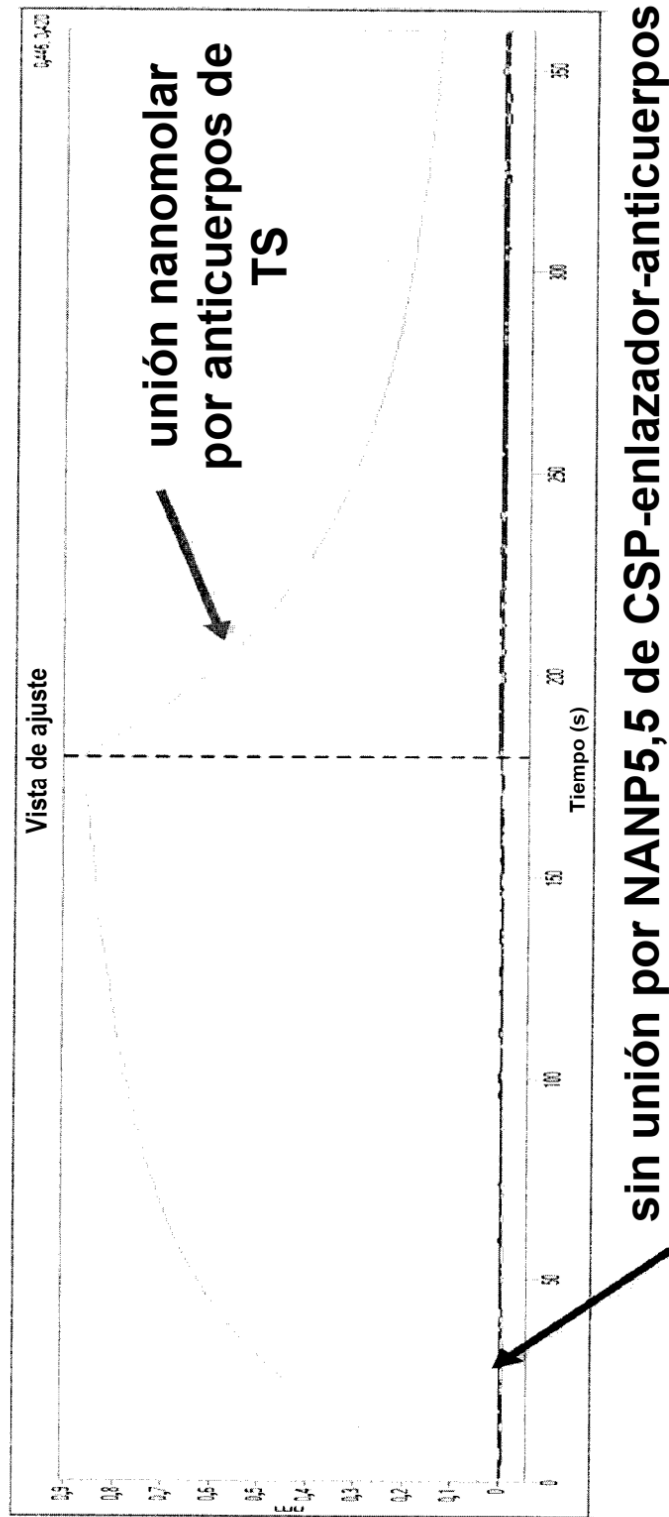
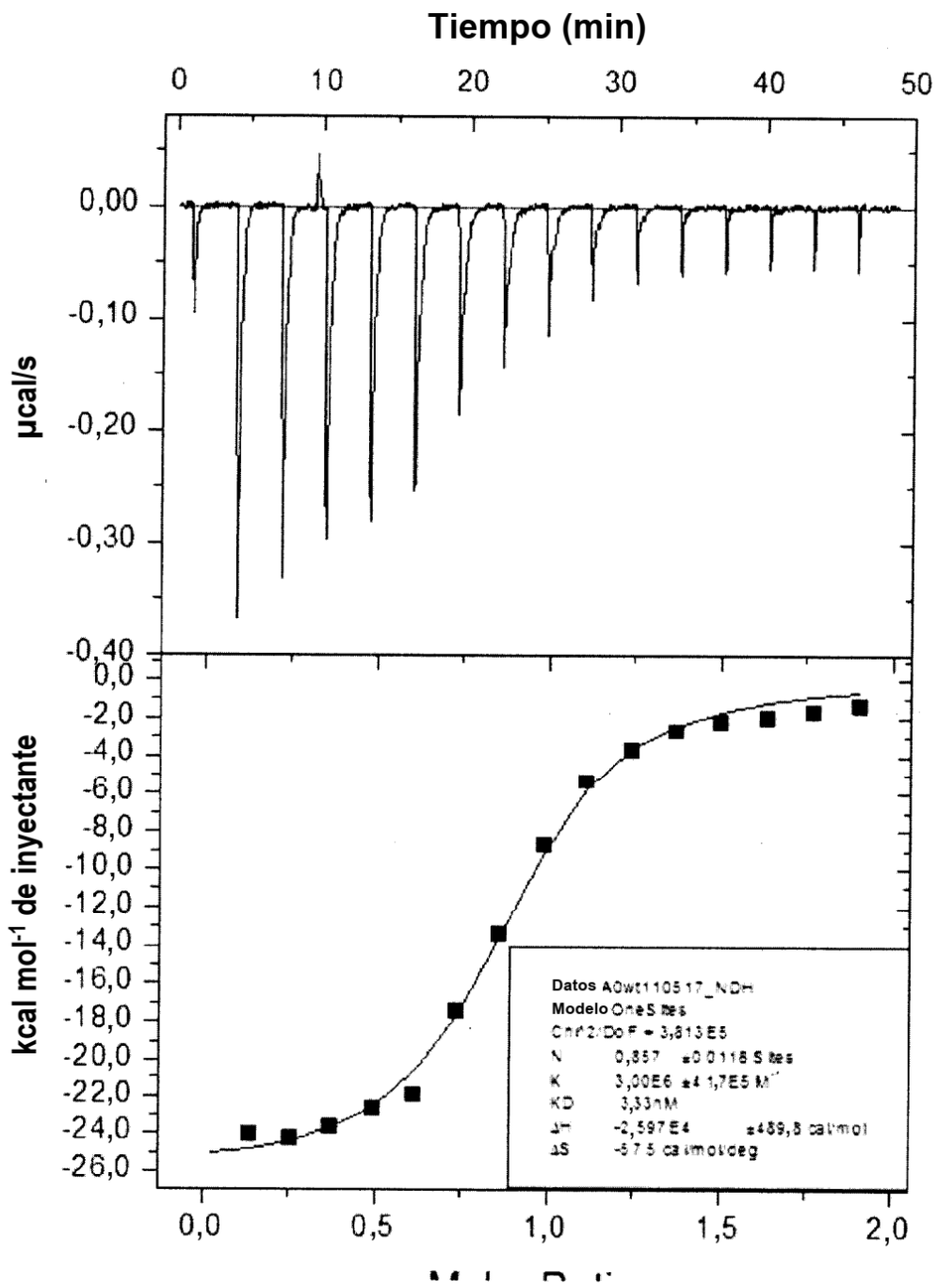
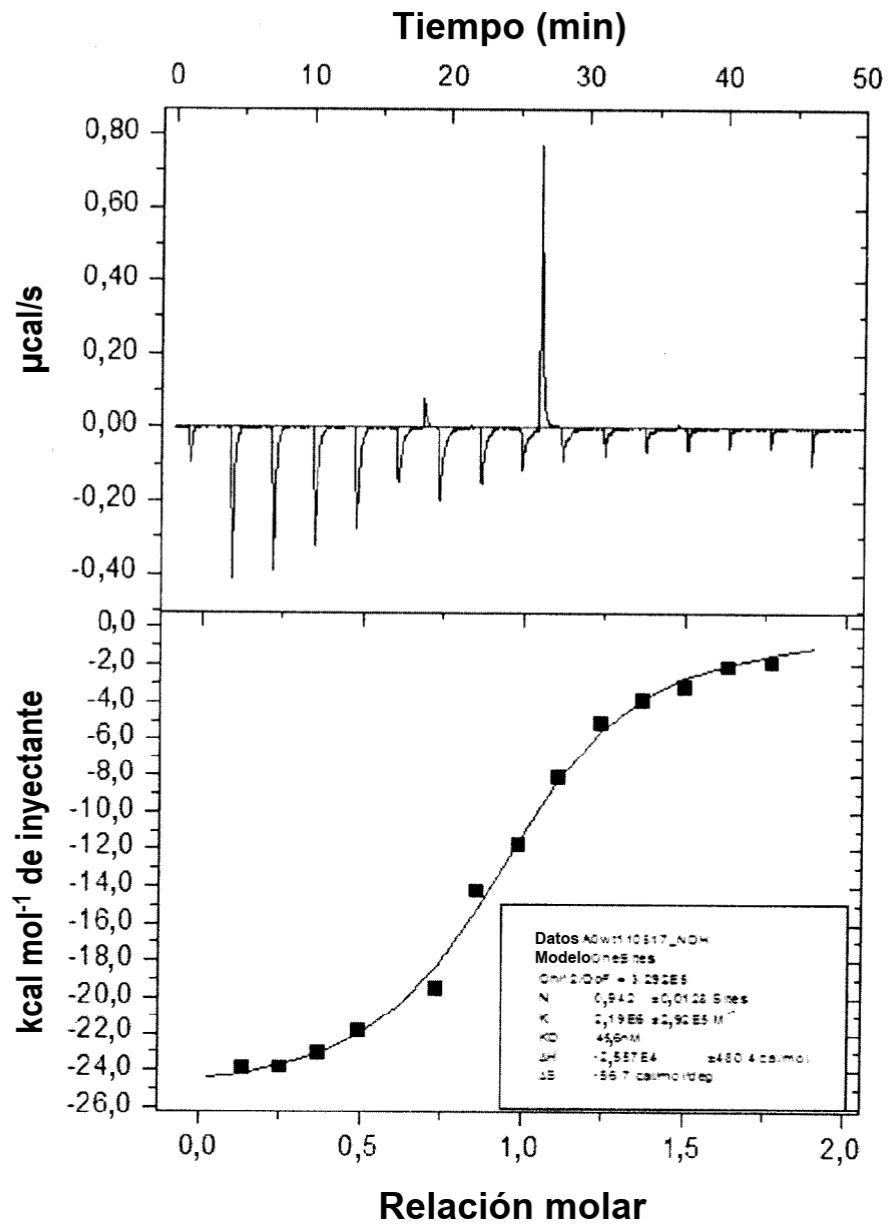


Figura 13



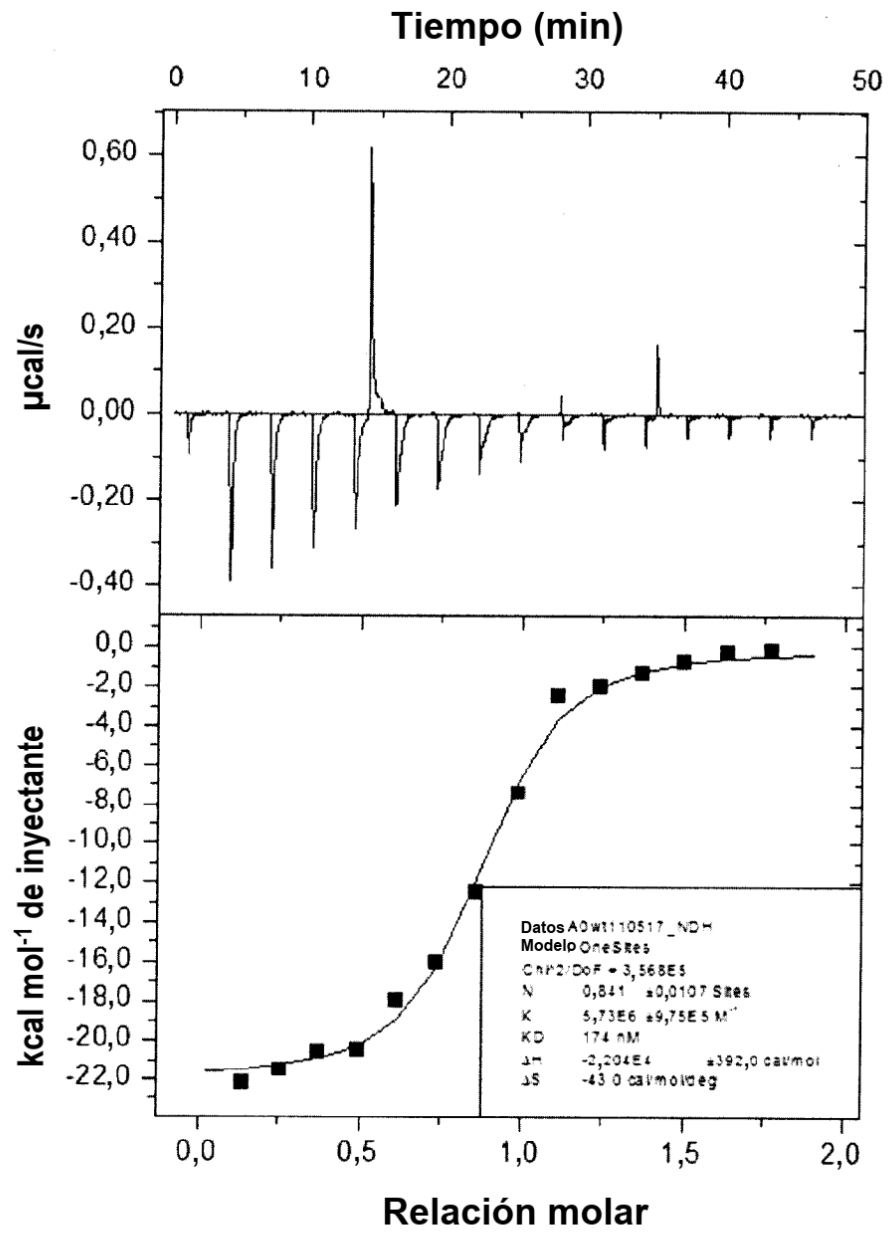
$K_D = 333 \text{ nM}$

Figura 14



$$K_D = 456 \text{ nM}$$

Figura 15



$K_D = 174 \text{ nM}$

Figura 16

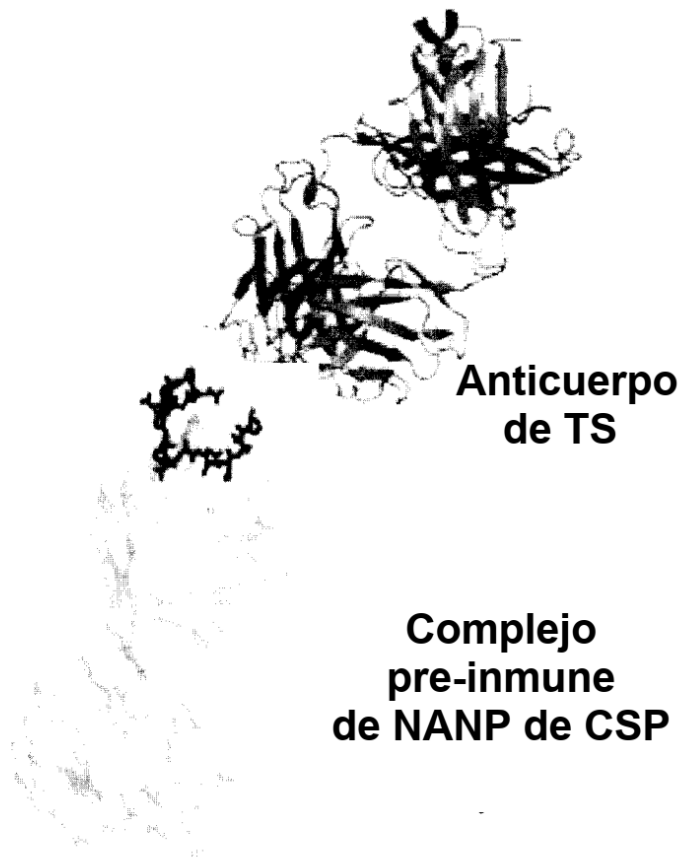


Figura 17

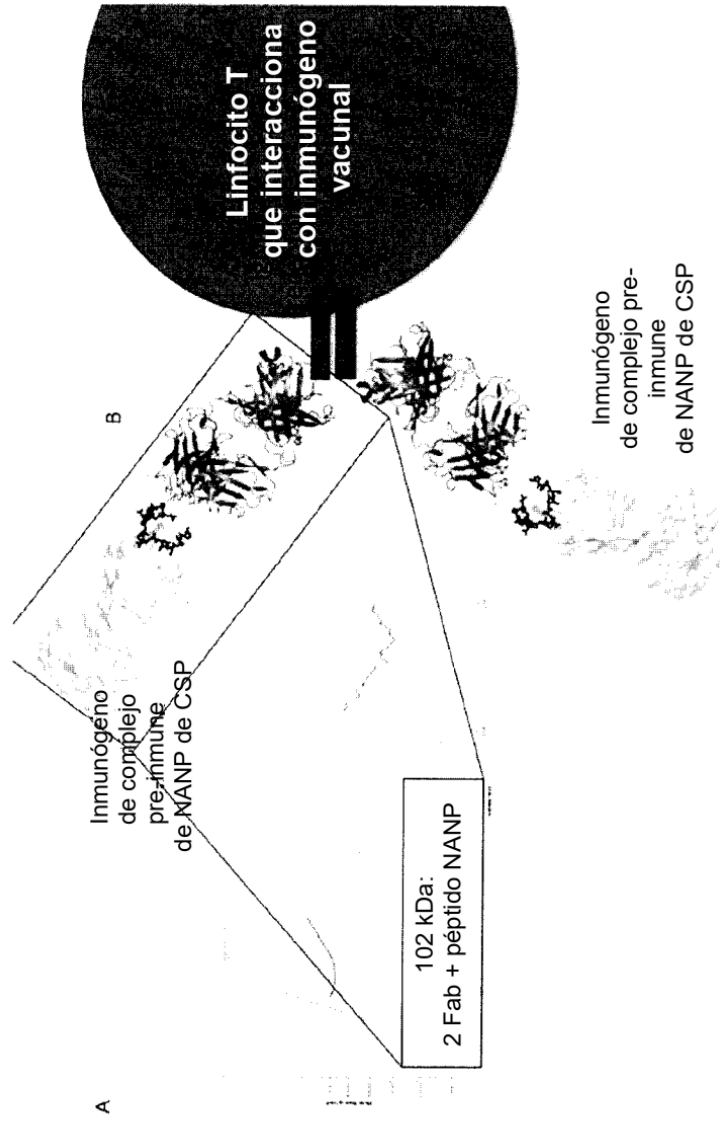


Figura 18

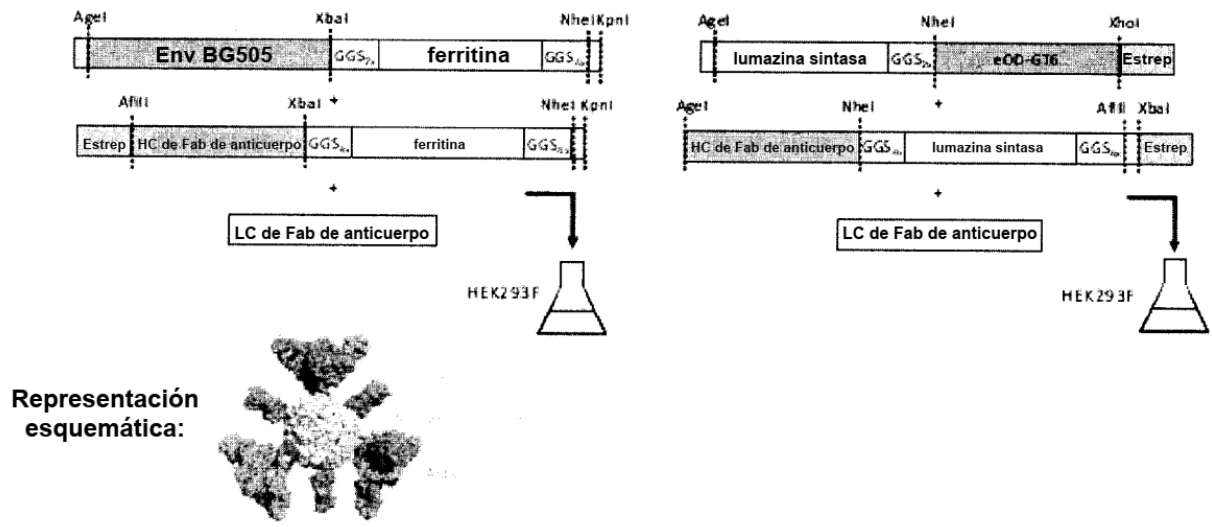


Figura 19

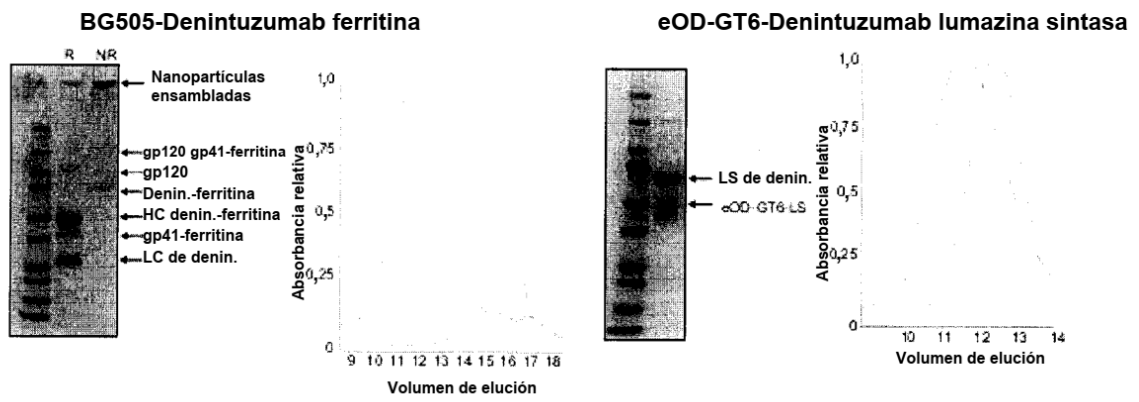


Figura 20

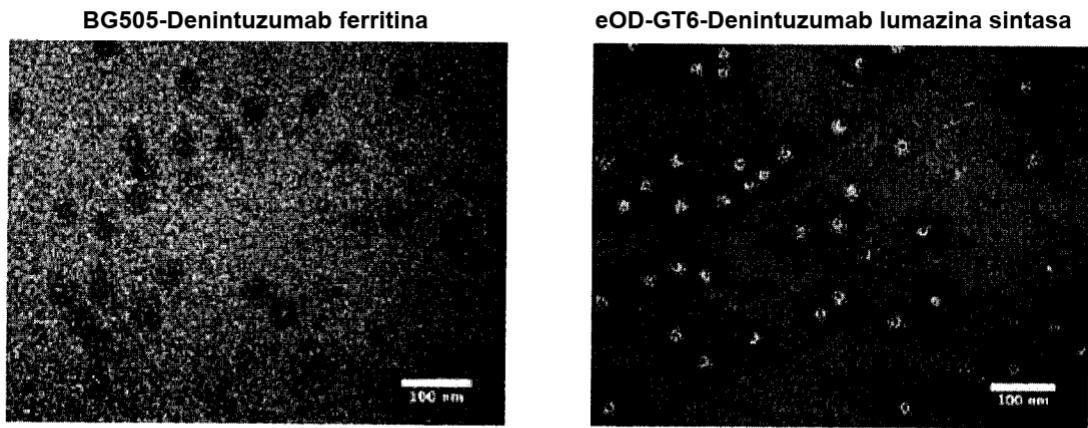


Figura 21

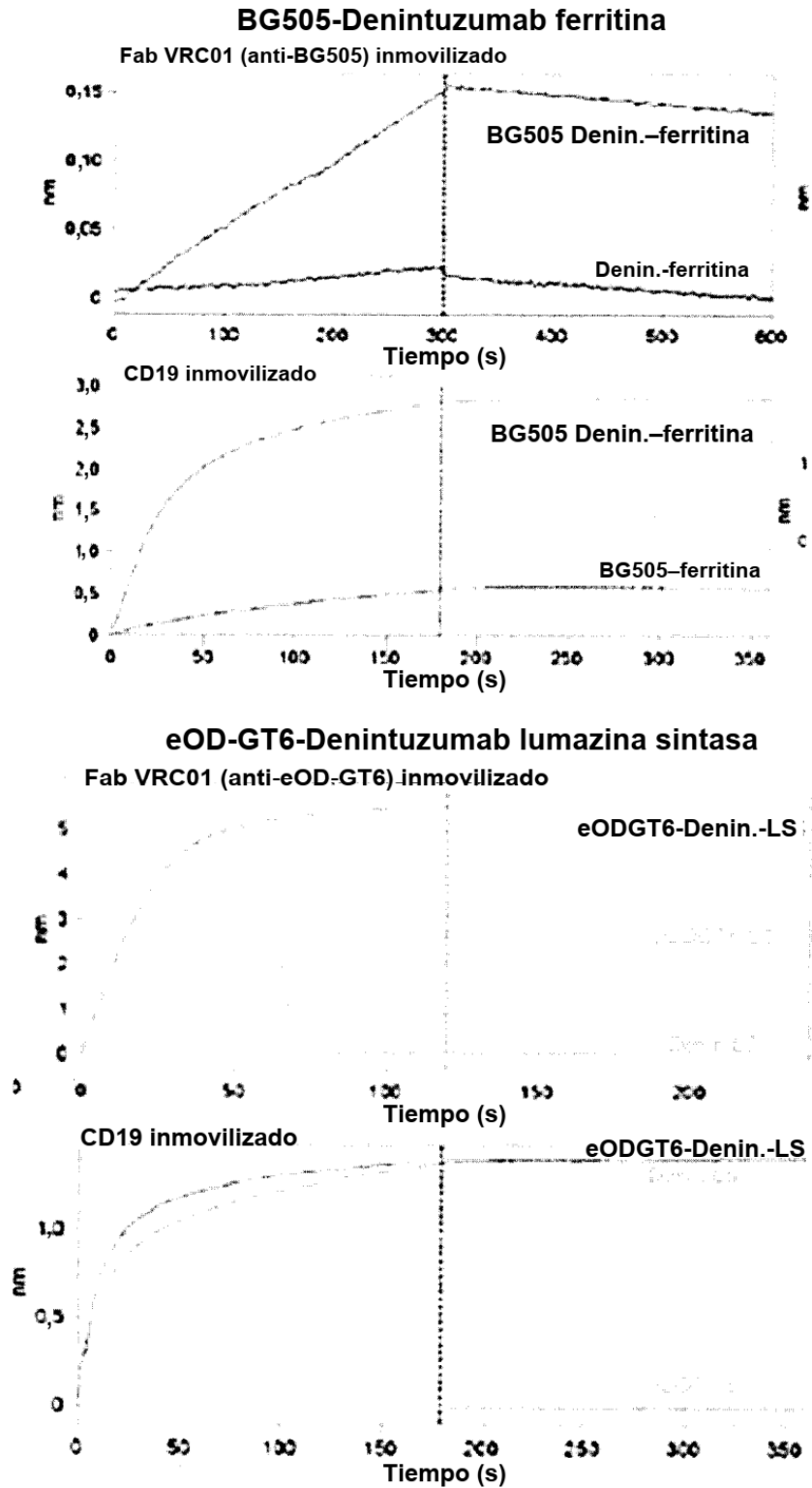


Figura 22

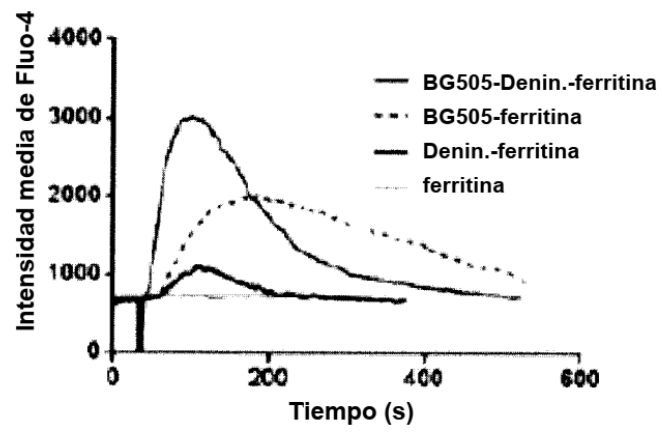
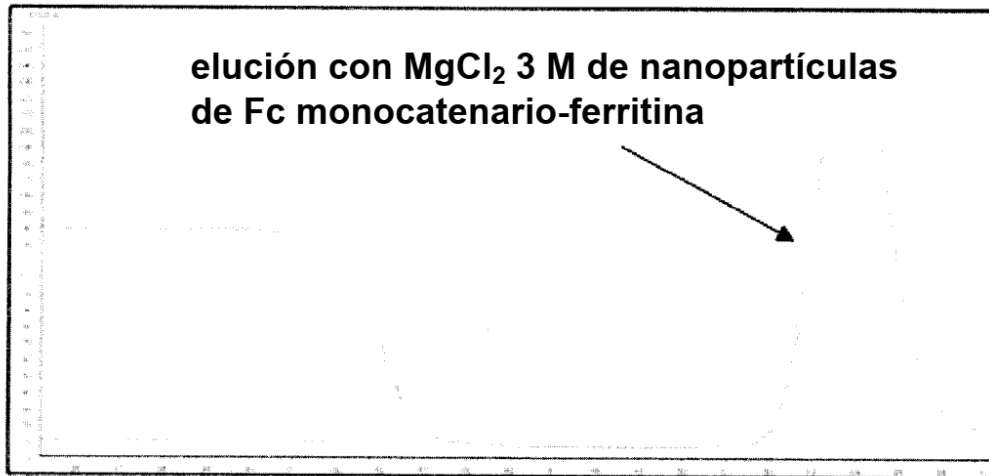


Figura 23

A



B

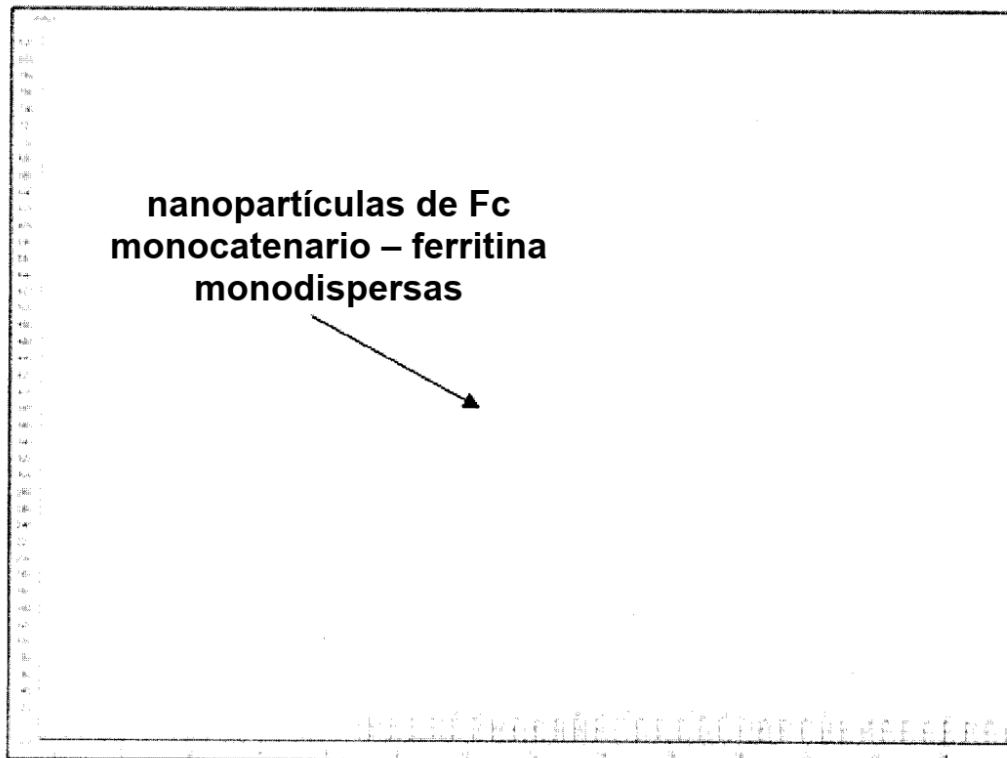


Figura 24

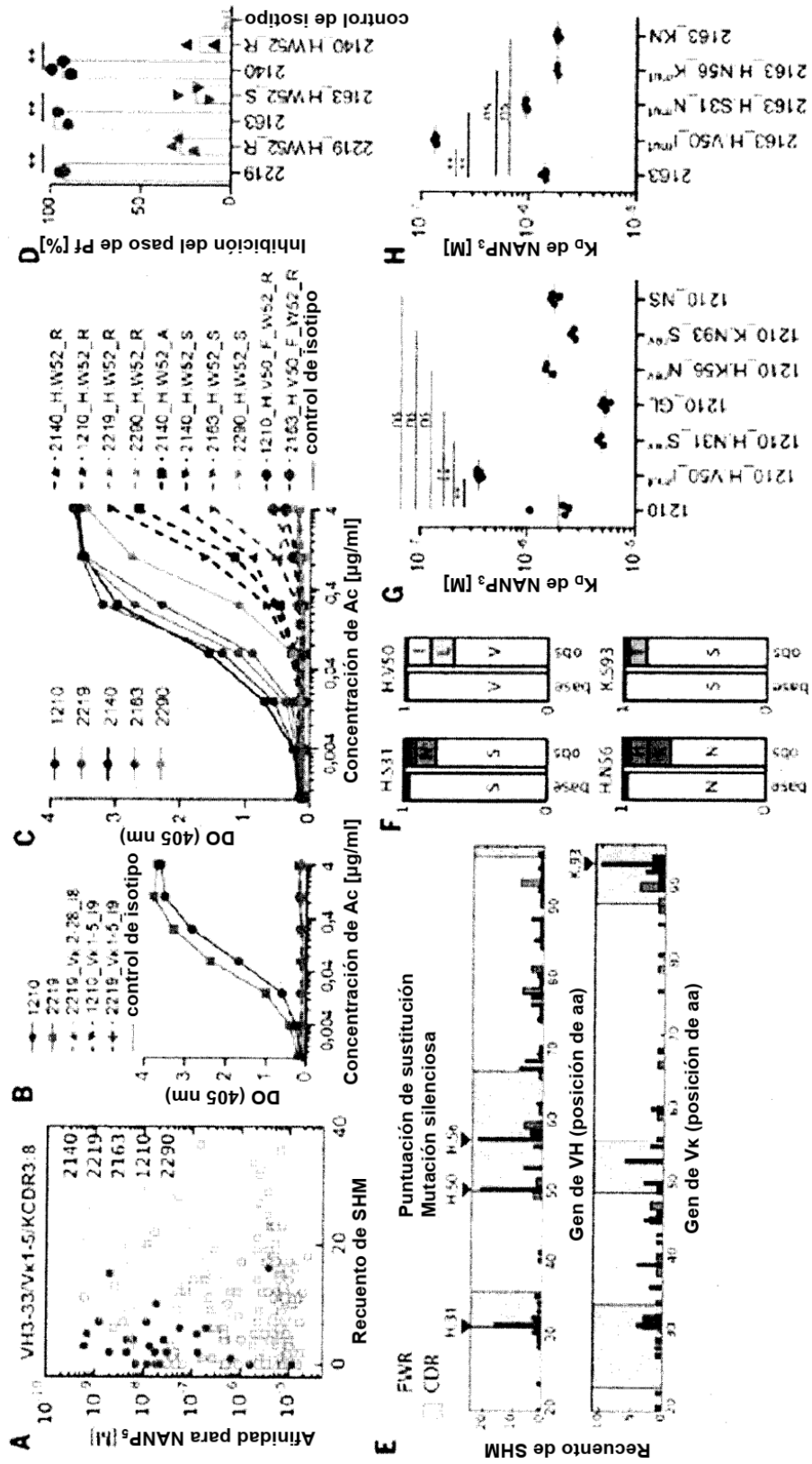


Figura 25

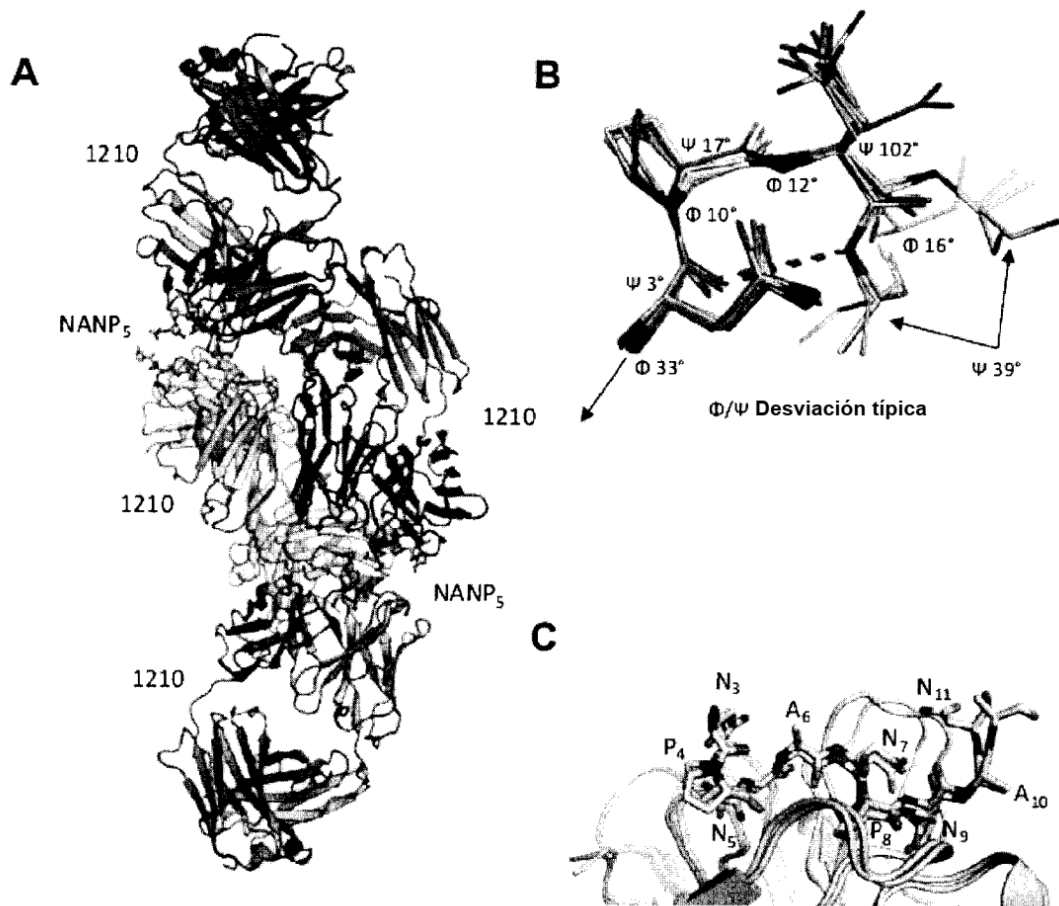


Figura 27

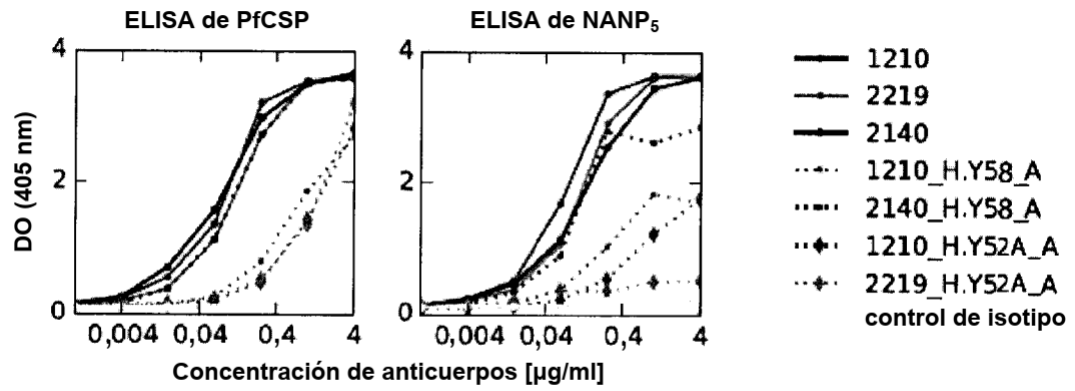


Figura 28

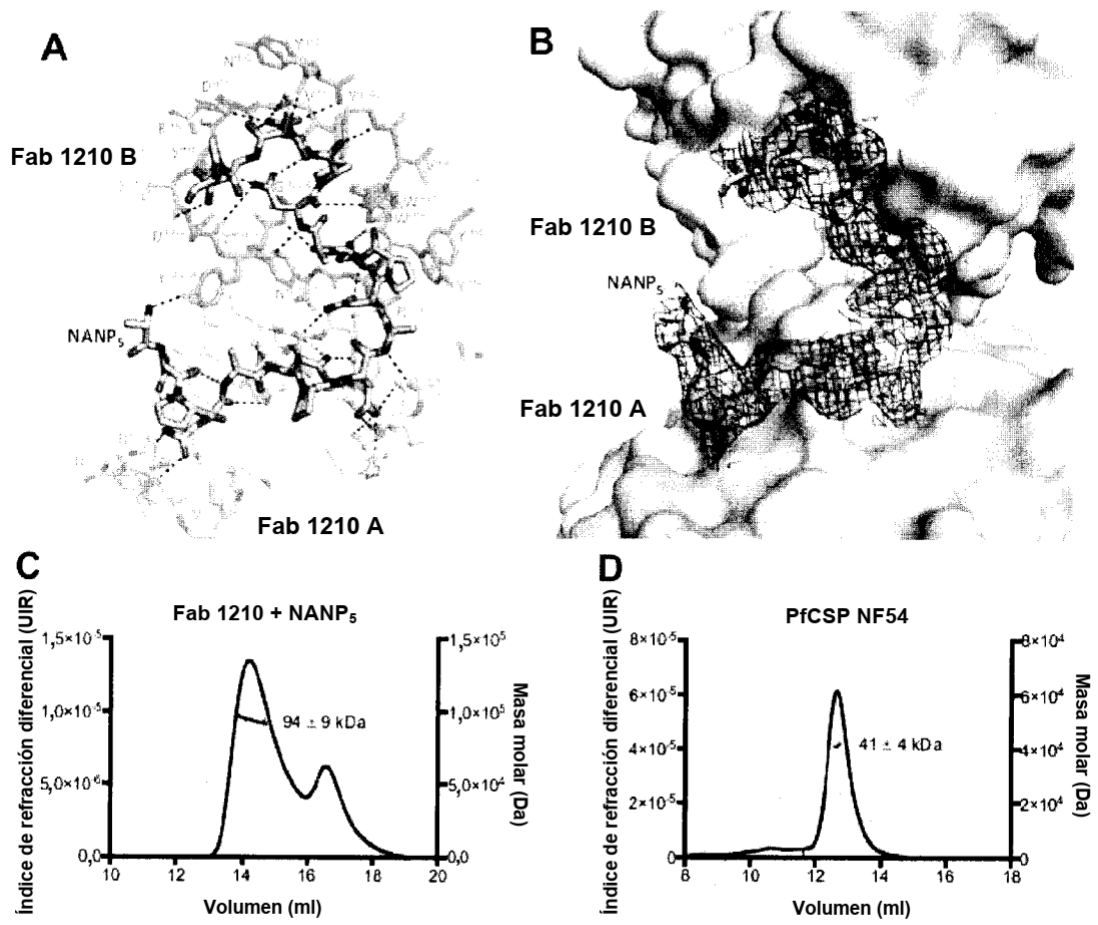


Figura 29

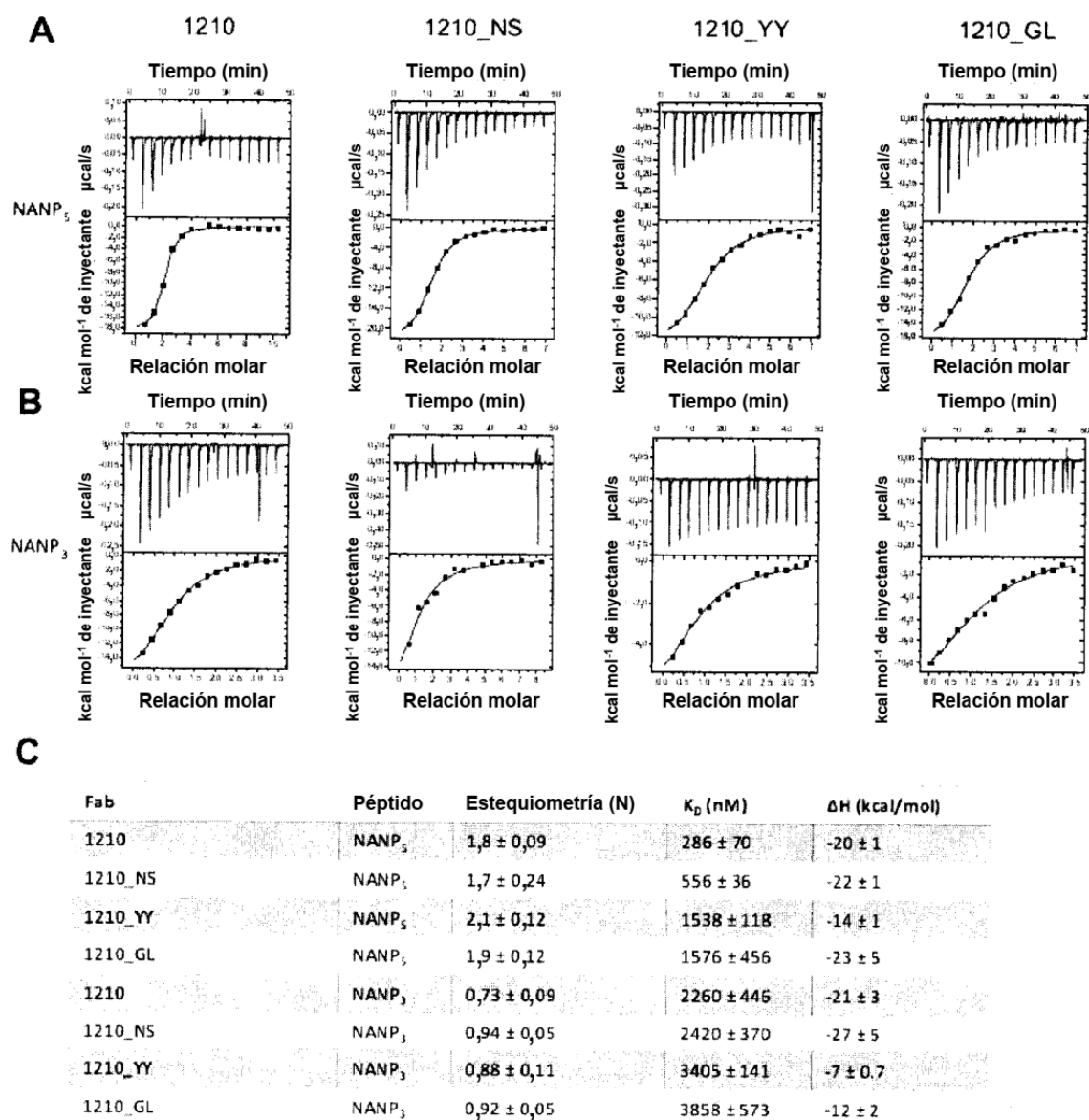


Figura 30

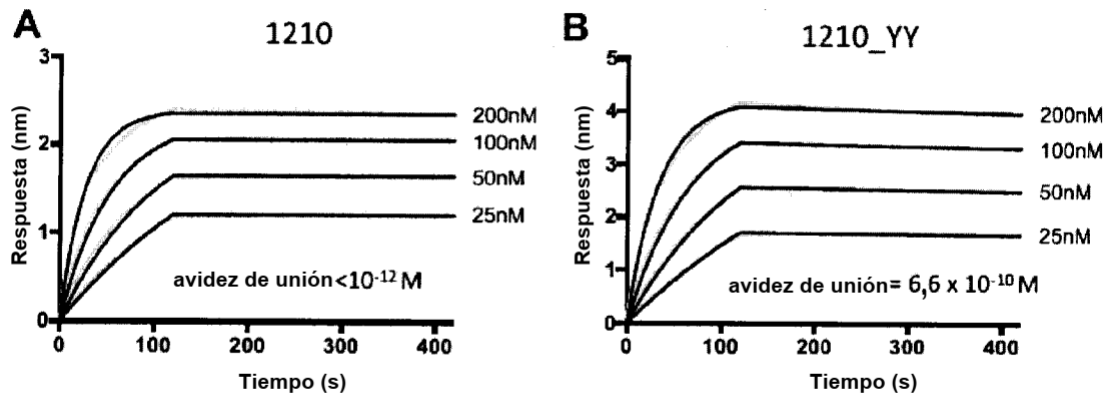


Figura 31

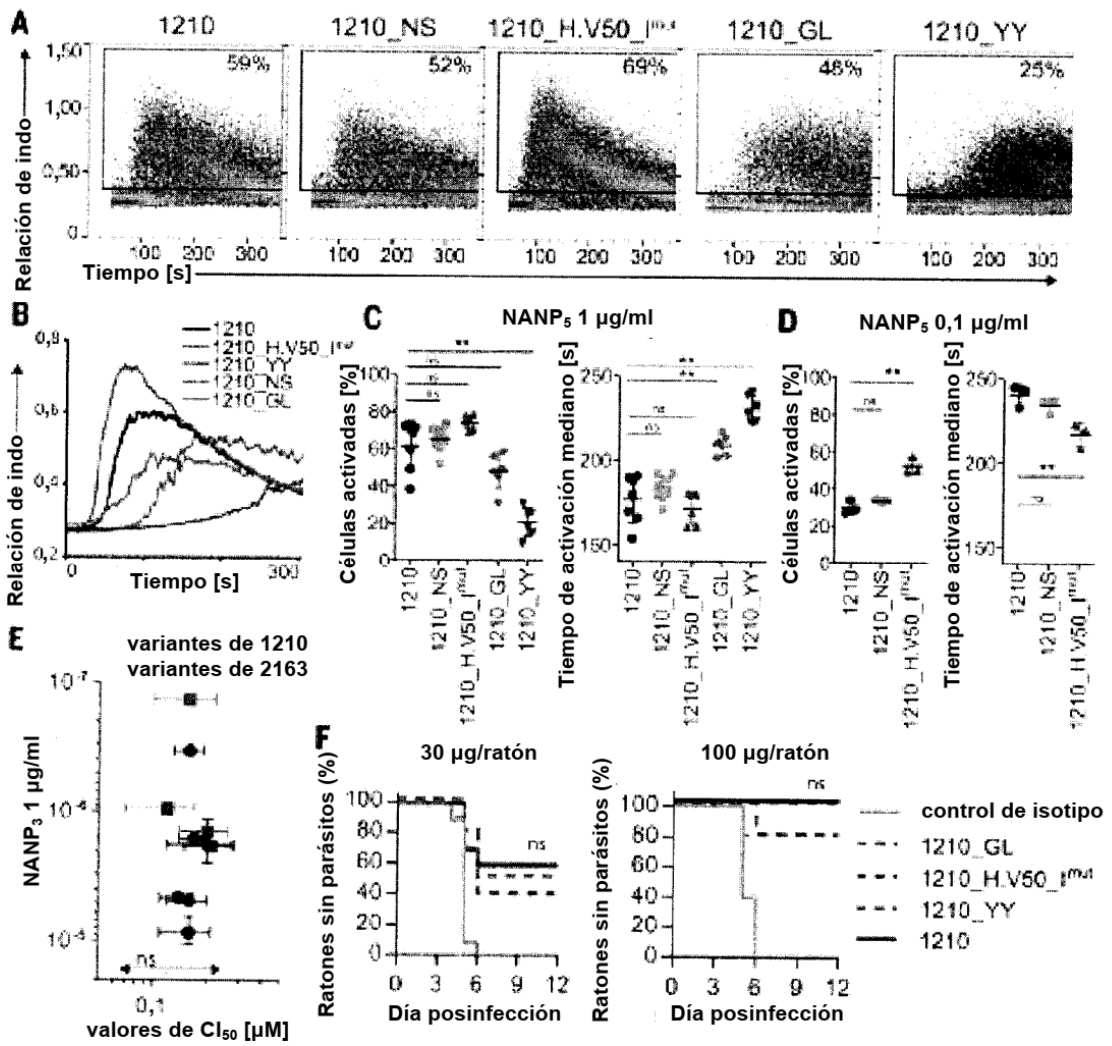


Figura 32

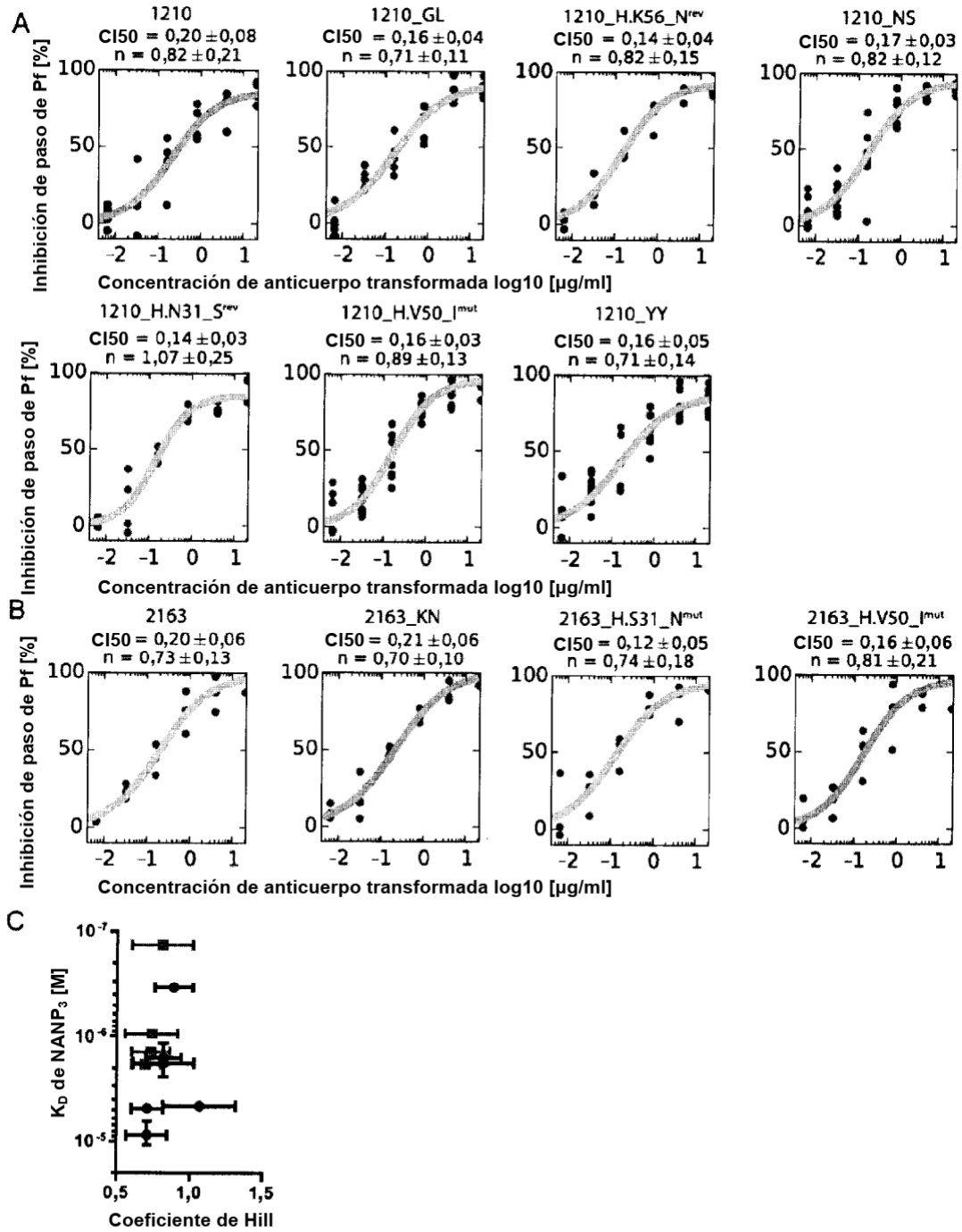


Figura 33

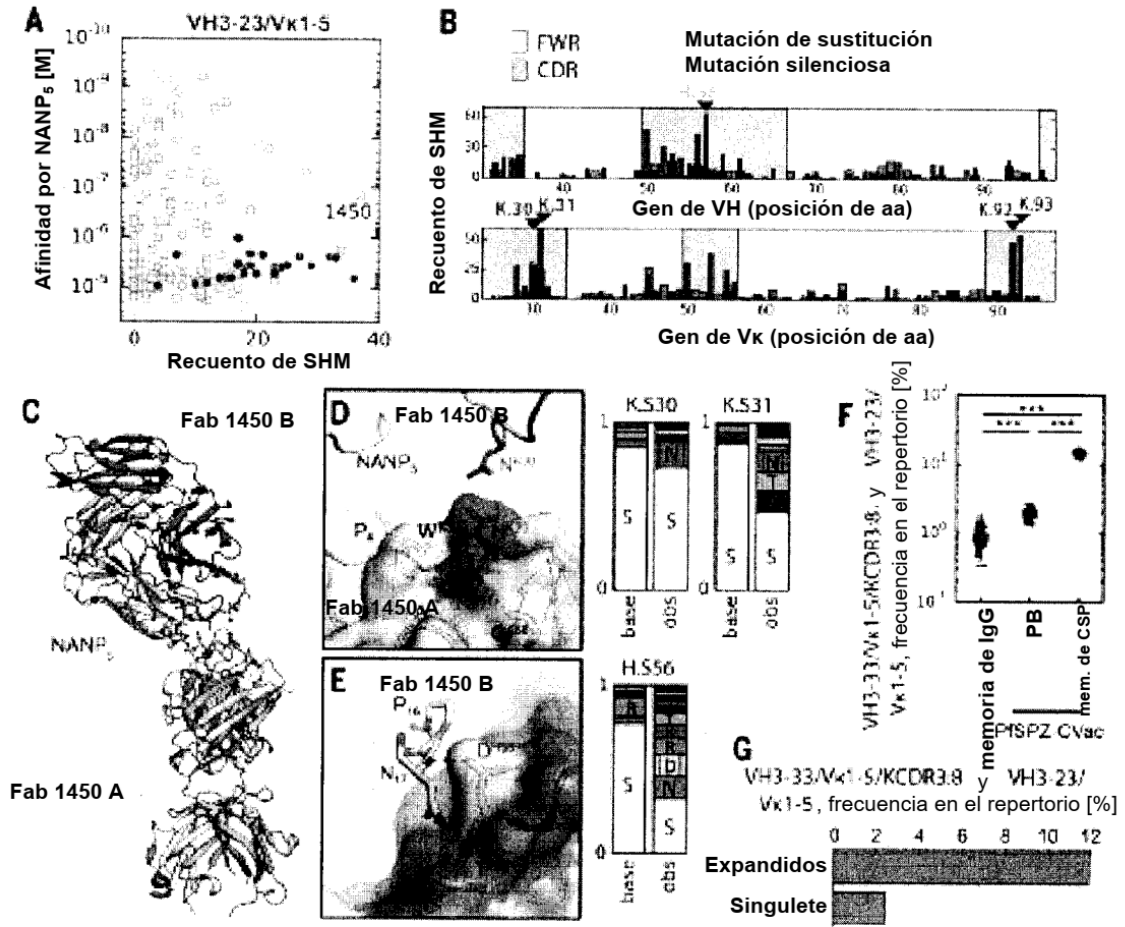


Figura 34

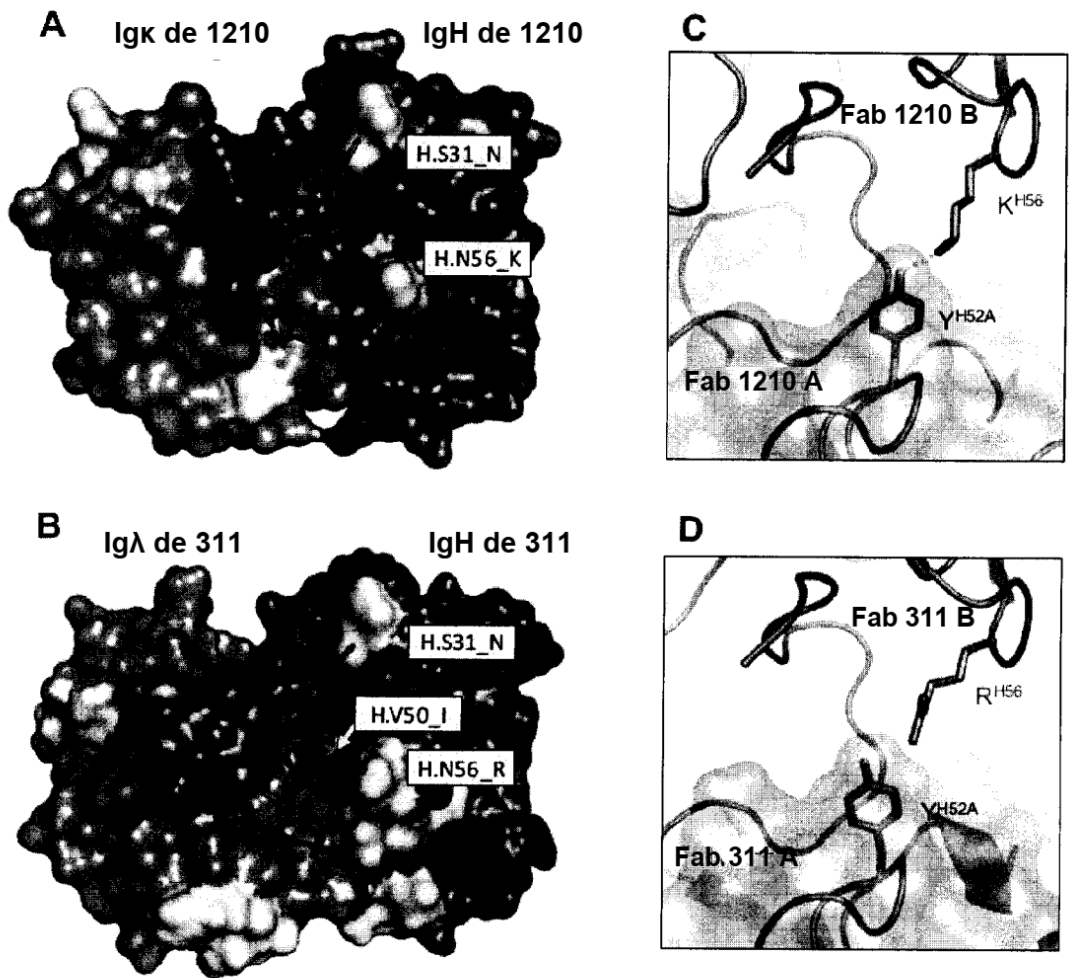


Figura 36

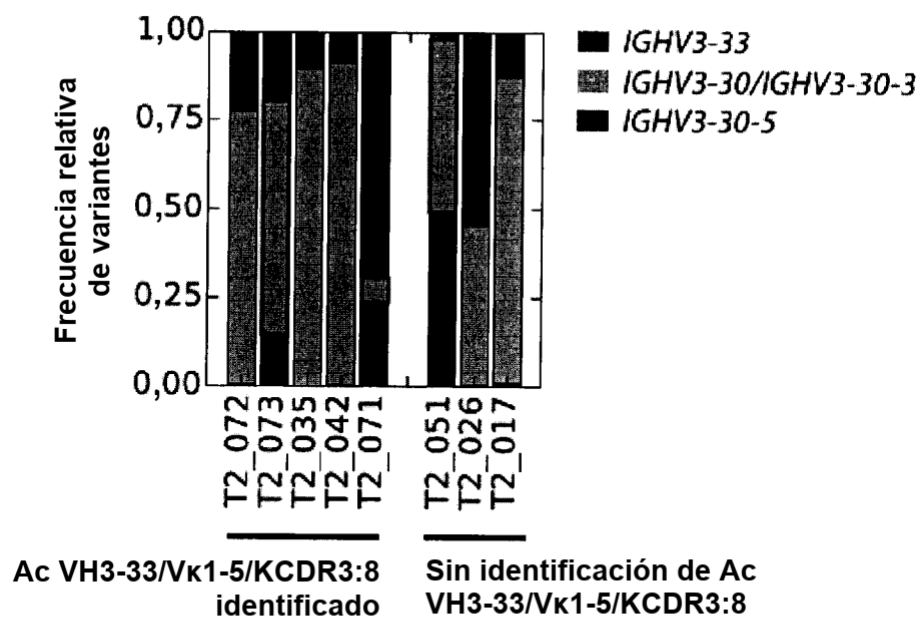


Figura 37

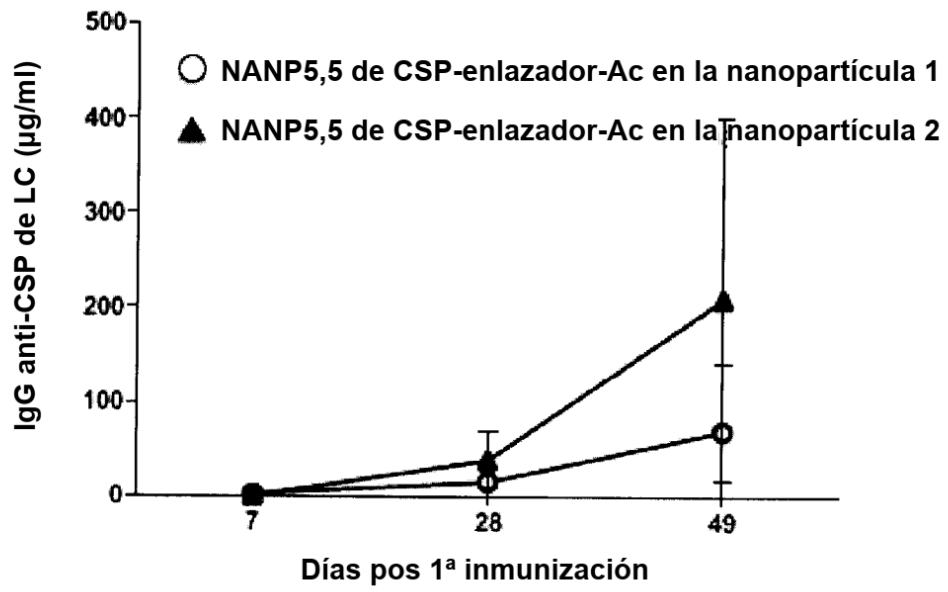


Figura 38

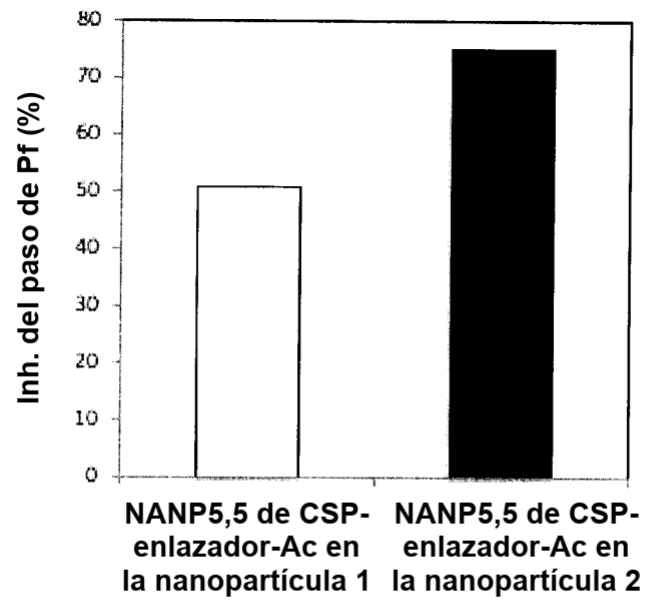


Figura 39