

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 659**

51 Int. Cl.:
A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03726990 .9**
96 Fecha de presentación: **15.05.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1503799**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.02.2005**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales inmunógenos**

30 Prioridad:
15.05.2002 AT 7442002

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.05.2012

73 Titular/es:
**GREENOVATION BIOTECH GMBH
BÖTZINGER STRASSE 29B
79111 FREIBURG, DE
MERIDIAN BIOPHARMACEUTICALS GMBH**

72 Inventor/es:
**LOIBNER, Hans;
WAXENECKER, Günter;
HIMMLER, Gottfried;
ECKERT, Helmut;
SCHUSTER, Manfred y
KIRCHEIS, Ralf**

74 Agente/Representante:
Curell Aguilá, Mireia

ES 2 380 659 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos monoclonales inmunógenos.

5 La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales que son aptos para la preparación de vacunas contra tumores así como a un procedimiento para la inmunogenización de antígenos asociados a tumores.

10 Las células cancerígenas presentan prácticamente siempre, además de otras características fisiológicas, las cuales las distinguen de células normales, un tipo modificado de glicosilación (Glycoconj. J. (1997), 14:569; Adv. Cancer Res. (1989), 52:257; Cancer Res. (1996), 56:5309). Aunque los cambios son distintos de un tejido a otro, puede observarse que una glicosilación cambiada es típica para las células cancerígenas. En la mayoría de los casos, la glicosilación cambiada se presenta en la superficie de las células en forma de glicoproteínas y glicolípidos. Dichas estructuras de azúcar cambiadas pueden denominarse por tanto como antígenos asociados a tumores (TAA), que en muchos casos son lo suficientemente específicos para tumores, es decir, que ocurren raramente en las células "normales". En muchos casos, las células, incluidas las células tumorales, no producen una glicosilación uniforme, es decir, que existen formas glico distintas de cadenas de glicano complejas en una célula (Annu. Rev. Biochem. (1988), 57:785).

20 Entre los ejemplos de estructuras de carbohidratos asociadas a tumores, se incluyen los antígenos Lewis, que se expresan de forma aumentada en muchos tipos de cánceres epiteliales. Entre éstos, se incluyen las estructuras Lewis x, Lewis b y Lewis y, así como estructuras Lewis x sializadas. Otros antígenos de carbohidratos son las estructuras GloboH, KH1, antígeno Tn, antígeno TF, el epítipo alfa-1,3-galactosilo (Electrophoresis (1999), 20:362; Curr. Pharmaceutical Design (2000), 6:485, Neoplasma (1996), 43: 285).

25 Otros TAA son proteínas que se expresan de forma particularmente pronunciada en células cancerígenas, tales como por ejemplo CEA, TAG-72, MUC1, Folate Binding Protein A-33, CA 125, EpCAM, HER-2/neu, PSA, MART, etc. (Sem. Cancer Biol. (1995), 6:321).

30 Un planteamiento de destruir células tumorales de forma relativamente específica es una terapia inmune pasiva con anticuerpos que están dirigidos contra TAA (Immunology Today (2000), 21:403-410; Curr. Opin. Immunol. (1997), 9:717).

35 Otro planteamiento de destruir células tumorales es una vacunación activa, que dispara una respuesta inmune contra TAA. Por tanto, dicha respuesta inmune esta dirigida también contra las células tumorales respectivas (Ann. Med. (1999), 31:66; Immunobiol. (1999), 201:1).

40 En caso de una inmunización activa, un gran problema radica en la baja inmunogenicidad de los antígenos. Los carbohidratos son moléculas muy pequeñas, por lo cual no son reconocidas directamente por el sistema inmune. Los carbohidratos y polisacáridos se consideran por lo general como antígenos timo-dependientes. La conjugación de estructuras de carbohidratos inmunológicamente inertes con antígenos timo-dependientes, tales como proteínas, refuerzan su inmunogenicidad. Por tanto, las vacunas a base de estructuras de carbohidratos asociadas a tumores se acoplan a las denominadas "moléculas portadoras", con el fin de aumentar la inmunogenicidad (Angew. Chem. Int. Ed. (2000), 39:836). Las moléculas portadoras utilizadas a menudo son proteínas, tal como albúmina de suero bovino o KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin). Dicha proteína estimula las células T de ayuda específicas para el portador, que a continuación son importantes en la inducción de la síntesis de los anticuerpos anti-carbohidratos (Contrib. Microbiol. Immunol. (1989), 10:18).

50 Además de éstos, tanto los antígenos de carbohidratos como los antígenos de proteínas están presentes también en tejidos sanos (por lo menos en etapas de desarrollo determinadas del organismo) y por tanto son reconocidos por el sistema inmune como material autólogo, por lo cual normalmente no tiene lugar una respuesta inmune contra dichas moléculas endógenas.

55 Otra opción de mejorar la calidad de la respuesta inmune a los carbohidratos es la inmunización con los denominados "mimótopes", que no son carbohidratos (por ejemplo péptidos; Nat. Biotechnol. (1999), 17:660; Nat. Biotechnol. (1997), 15:512).

60 Las proteínas asociadas a tumores presentan una baja inmunogenicidad, aunque a pesar de esto se incluyen entre las vacunas (Ann. Med. (1999), 31:66; Cancer Immunol. Immunother. (2000), 49:123; memoria de patente estadounidense 5994523). Una posibilidad de evitar el "auto"-reconocimiento de TAA determinados es la utilización de anticuerpos antiidiotípicos como inmunógeno, que imitan la estructura del TAA, disparando una respuesta inmune que reacciona también con el TAA (Cancer Immunol. Immunother. (2000), 49:133). Existen además otras posibilidades de penetrar la auto-tolerancia frente a proteínas determinadas, tal como por ejemplo la fusión de TAA con secuencias de proteínas ajenas determinadas (US 5,869,057, US 5,843,648 y US 6,069,242) o a través de una presentación adecuada por medio de células presentadoras de antígenos (Immunobiol. (1999), 201:1).

65 El objetivo de la presente invención es evitar los inconvenientes de las vacunas contra tumores descritas en el

estado de la técnica y, conforma a esto, proporcionar una vacuna contra tumores mejorada, que provoque una respuesta inmune eficaz contra las células tumorales.

5 Dicho objetivo se consigue según la invención por medio de un anticuerpo inmunógeno tal como se ha definido en las reivindicaciones.

10 Por el término "inmunógeno" deben entenderse todas las estructuras que dan lugar a una respuesta inmune en un sistema de huésped específico. Por ejemplo, un anticuerpo murino o fragmentos de dicho anticuerpo presentan una inmunogenicidad muy alta en el organismo humano, un efecto que puede reforzarse aún más combinando dicho anticuerpo con adyuvantes.

15 Un anticuerpo inmunógeno puede actuar como un inmunógeno o bien por medio de su especificidad o bien por medio de su estructura. Preferentemente, el anticuerpo inmunógeno según la invención puede inducir inmunogenicidad también en su estado desnaturalizado o como conjugado con estructuras o sustancias portadoras seleccionadas.

20 El término "epítotope" define cualquier región dentro de una molécula que puede ser reconocida por un anticuerpo específico o que induce la formación de dichos anticuerpos específicos. Los epítotope pueden ser epítotope de conformación o epítotope lineales.

25 Los epítotope imitan o comprenden en particular los dominios de un TAA natural, homólogo o de su derivado. Son comparables a los TAA por lo menos con relación a su estructura primaria y posiblemente su estructura secundaria. Sin embargo, los epítotope pueden ser también completamente distintos con relación a este aspecto y pueden imitar partes de un TAA puramente por el hecho de ser similares a estructuras espaciales (terciarias), en particular imitar antígenos de proteínas o carbohidratos. Por tanto, puede ser únicamente la estructura terciaria de una molécula que forma una imitación (imitación inmunológica, tal como por ejemplo es conocido por el documento WO 00/73430), que provoca una respuesta inmune contra un TAA determinado.

30 Como regla general, hay que suponer que por un antígeno que imita un epítotope proteínico de un antígeno asociado a tumores debe entenderse un polipéptido de por lo menos cinco aminoácidos.

35 Entre los epítotope del anticuerpo según la invención, se encuentra preferentemente por lo menos un epítotope de un antígeno seleccionado entre el grupo constituido por péptidos o proteínas, en particular EpCAM, NCAM, CEA y péptidos de células T, derivados preferentemente de antígenos asociados a tumores, además carbohidratos, en particular Lewis Y, sialil-Tn, Globo H, y glicolípidos, en particular GD2, GD3 y GM2. Los epítotope preferidos se han derivado de antígenos que son específicos para los tumores epiteliales y ocurren por ejemplo de forma aumentada en el cáncer de mama, cáncer del estómago y del intestino, de la próstata, páncreas, ovarios y pulmón. Entre los epítotope preferidos, se encuentran los que provocan una respuesta inmune en particular humoral, es decir, una formación de anticuerpos específica *in vivo*. Preferentemente, el anticuerpo inmunógeno según la invención puede disparar también una respuesta inmune específica para las células T, lo cual da lugar, como reacción a la administración del anticuerpo, a la formación no sólo de anticuerpos, por ejemplo de la clase IgM, sino también de la clase IgG.

45 Alternativamente, pueden seleccionarse como epítotope para los fines de la invención también específicamente los antígenos que generan una respuesta inmune específica para las células T. Entre ellos, se encuentran también en particular estructuras intracelulares o péptidos de células T.

50 Otros epítotope proteínicos preferidos, que se expresan en particular en las células cancerígenas de tumores sólidos, son por ejemplo TAG-72, MUC1, Folate Binding Protein A-33, CA125, HER-2/neu, receptores de EGF, PSA, MART, etc. (ver, por ejemplo, Sem. Cancer Biol. 6 (1995), 321). Además, también pueden servir los denominados péptidos de epítotope de células T (Cancer Metastasis Rev. 18 (1999), 143; Curr. Opin. Biotechnol. 8 (1997), 442; Curr. Opin. Immunol. 8 (1996), 651) o mimótotope de epítotope de células T de este tipo (Curr. Opin. Immunol. 11 (1999), 219; Nat. Biotechnol. 16 (1998), 276-280). Los epítotope adecuados se expresan, por lo menos en un 20%, preferentemente en por lo menos un 30%, de los casos de células tumorales de un tipo de cáncer determinado, además preferentemente en por lo menos un 40%, en particular en por lo menos un 50%, de los pacientes.

60 Los epítotope de carbohidratos preferidos según la invención son estructuras de carbohidratos asociadas a tumores, tales como los antígenos Lewis, por ejemplo las estructuras Lewis x, Lewis b y Lewis y, así como estructuras Lewis x sializadas. Entre las otras estructuras de antígenos de carbohidratos preferidas para los fines de la presente invención, se incluyen también las estructuras GloboH, KH1, el antígeno Tn, de forma particularmente preferida el antígeno sialil-Tn, antígeno TF y epítotope 1,3-alfa-galactosilo.

65 También pueden preverse o imitarse en el anticuerpo por lo menos dos epítotope idénticos o distintos de una proteína de adhesión, por ejemplo de una proteína de membrana celular homófila, tal como EpCAM. Por tanto, la inmunización activa puede generar un gran número de anticuerpos específicos para la misma molécula, pero con sitios de unión EpCAM distintos.

El anticuerpo según la invención es un anticuerpo glicosilado, en el que la misma glicosilación puede imitar también un epítoto de un epítoto de carbohidratos de un TAA.

5 Están previstos o imitados por lo menos dos epítotos distintos, de los cuales por lo menos uno procede del grupo constituido por péptidos o proteínas y por lo menos uno procede del grupo constituido por carbohidratos. Resulta que preferentemente se combina un epítoto de una proteína EpCAM con un epítoto de un componente de carbohidratos, por ejemplo de Lewis Y o sialil-Tn. En particular, un anticuerpo Lewis Y glicosilado específico para una estructura EpCAM es un inmunógeno particularmente bueno en una formulación de vacunas. Dicho anticuerpo
10 puede imitar antígenos de tumores de forma particularmente eficaz, por lo cual provoca la respuesta inmune deseada para la inhibición de células tumorales epiteliales.

Preferentemente, el anticuerpo inmunógeno según la invención actúa como portador de antígenos, por ejemplo de un antígeno proteínico en la vacuna. Esto quiere decir que el anticuerpo según la invención representa un antígeno
15 polivalente, por ejemplo un antígeno bi-, tri- o polivalente. Los epítotos se presentan de tal forma que la vacuna provoca una respuesta inmune contra dichos epítotos. De esta forma, se proporciona una vacuna que contiene un anticuerpo como antígeno di-, tri- o polivalente.

El anticuerpo según la invención se utiliza principalmente para la inmunización activa, por lo cual se administra sólo en pequeñas cantidades. Por esta razón, no se esperan, por ejemplo, efectos secundarios especiales, incluso cuando el anticuerpo según la invención está derivado de una especie no humana, tal como por ejemplo un anticuerpo murino. Sin embargo, se supone que un anticuerpo quimérico, recombinante así como humanizado o humano combinado con componentes murinos y humanos es particularmente compatible para la administración al ser humano. Por otro lado, una parte murina en el anticuerpo según la invención puede provocar una respuesta
20 inmune adicional en el ser humano por su carácter ajeno.

La función primaria preferida del anticuerpo inmunógeno según la invención es la presentación de los epítotos. El reconocimiento específico del antígeno asociado a tumores o de los antígenos asociados a tumores cuyos epítotos comprende no es absolutamente necesario, pero dicho anticuerpo puede unirse adicionalmente de forma específica a un epítoto y al mismo tiempo presentar un epítoto.
30

Aunque naturalmente un anticuerpo según la invención puede estar derivado de un anticuerpo nativo, que posiblemente fue aislado del organismo de un paciente, por lo general se utilizará un derivado de un anticuerpo que se ha seleccionado preferentemente entre el grupo constituido por fragmentos, conjugados u homólogos del anticuerpo, pero también de complejos y adsorbatos. En cualquier caso, se prefiere que el derivado de anticuerpo contenga por lo menos partes del fragmento Fab, preferentemente junto con por lo menos partes del fragmento F(ab')₂, y/o partes de la región hinge y/o de la parte Fc de un anticuerpo lambda o kappa.
35

Además, para los fines de la invención, puede utilizarse también un derivado de un anticuerpo de cadena única, por ejemplo un denominado anticuerpo "single chain" como portador de los epítotos. Preferentemente, el anticuerpo según la invención es del tipo de una inmunoglobulina, por ejemplo de una IgG, IgM o IgA.
40

En el anticuerpo según la invención, pueden estar contenidos adicionalmente otras sustancias unidas a la estructura molecular de forma covalente, tales como péptidos, glicopéptidos, carbohidratos, lípidos o ácidos nucleicos, pero también grupos iónicos, tales como grupos fosfato, o también moléculas portadoras, tales como polietilenglicol o KLH. Dichos grupos laterales pueden representar posiblemente ellos mismos epítotos de un antígeno asociado a tumores tal como se ha definido en la presente invención.
45

En la vacuna antitumoral según la invención, se utilizan en particular anticuerpos antiidiotípicos, es decir, ab₂, para la inmunización activa. Dichos anticuerpos pueden estar dotados de secuencias o estructuras adicionales, con el fin de obtener un inmunógeno según la invención. Los anticuerpos antiidiotípicos según la invención reconocen preferentemente por su parte el idiotipo de un anticuerpo dirigido contra un TAA. De esto resulta que un epítoto de un TAA ya se forma en el parátoto del anticuerpo antiidiotípico como imitación para el TAA. Aquí también los epítotos se seleccionan preferentemente entre los grupos de TAA citados anteriormente. A título de ejemplo, un anticuerpo antiidiotípico se utilizará contra anticuerpos específicos para glicano, por ejemplo un anticuerpo antiidiotípico que reconoce el idiotipo de un anticuerpo anti-Lewis Y, por ejemplo tal como se ha descrito en el documento EP 0 644 947.
50
55

El anticuerpo inmunógeno según la invención es apto en particular como base para preparaciones farmacéuticas, en particular para vacunas. Se prefieren las preparaciones farmacéuticas que contienen un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dicho vehículo contiene, por ejemplo, auxiliares, tampones, sales, conservantes. Las preparaciones farmacéuticas pueden utilizarse, por ejemplo, para la profilaxis y terapia de cuadros clínicos asociados al cáncer, tal como la formación de metástasis de pacientes de cáncer. Su efecto consiste en modular específicamente *in vivo* o también *ex vivo* las células presentadoras de antígenos, con el fin de generar una respuesta inmune contra el TAA contenido en el anticuerpo inmunógeno.
60
65

Una formulación de vacuna preferida según la invención contiene el anticuerpo inmunógeno en la mayoría de los casos sólo en pequeñas concentraciones, por ejemplo en una cantidad inmunógena comprendida entre 0,01 µg y 10 mg. Según el carácter del anticuerpo, sea a raíz de secuencias de especies ajenas o formación de derivados, pero también según los auxiliares o adyuvantes utilizados, se seleccionará la dosis inmunógena adecuada, que estará comprendida por ejemplo entre 0,01 µg y 750 µg, preferentemente entre 100 µg y 500 µg. Sin embargo, una vacuna de reserva prevista para ser liberada al organismo durante un periodo prolongado puede contener también cantidades de anticuerpos mucho más altas, por ejemplo por lo menos 1 mg hasta más de 10 mg. La concentración depende de la cantidad administrada de la vacuna líquida o suspendida. Normalmente, una vacuna se suministrará en jeringuillas preparadas con un volumen comprendido entre 0,01 y 1 ml, preferentemente entre 0,1 y 0,75 ml. Por tanto, se trata de soluciones o suspensiones concentradas.

En la vacuna según la invención, el anticuerpo inmunógeno está formulado preferentemente en un vehículo farmacéuticamente aceptable que es apto para la administración subcutánea, intramuscular, pero también intradérmica y transdérmica. Otro tipo de administración es a través de la mucosa, por ejemplo vacunación por administración nasal o peroral. Si se utilizan sólidos como auxiliares para la formulación de vacunas, se administrará por ejemplo un adsorbato o una mezcla suspendida del anticuerpo junto con el auxiliar. En formas de realización especiales, la forma de administración de la vacuna es como solución o vacuna líquida en un disolvente acuoso.

Preferentemente, las unidades de vacuna de la vacuna antitumoral se suministran ya en una jeringuilla preparada adecuada. Puesto que un anticuerpo es relativamente estable en comparación con los TAA, la vacuna según la invención presenta la ventaja importante de poder comercializarse ya como solución o suspensión estable al ser almacenada en una forma preparada para ser utilizada "ready-to-use". Aunque un contenido en conservante, tal como timerosal, u otros conservantes con compatibilidad mejorada no es absolutamente necesario, dicho contenido puede estar previsto, sin embargo, en la formulación con el fin de prolongar su durabilidad a temperaturas de almacenamiento comprendidas entre temperaturas de frigorífico y temperatura ambiente. Sin embargo, la vacuna según la invención puede suministrarse también en forma congelada o liofilizada, que puede ser descongelada o reconstituída cuando sea necesario.

En cualquier caso, aumentar la inmunogenicidad del anticuerpo según la invención, utilizando adyuvantes, ha dado buenos resultados. Aptos para tal fin son adyuvantes de vacunas, por ejemplo hidróxido de aluminio (gel de aluminio) o fosfato de aluminio, con por ejemplo factores de crecimiento, linfoquinas, citoquinas, por ejemplo IL-2, IL-12, GM-CSF, Gamma Interferon o factores complementarios, tales como C3d, además preparaciones de liposomas o lipopolisacárido procedente de *E. coli* (LPS), pero también formulaciones con antígenos adicionales a los que el sistema inmune ya ha dado una fuerte respuesta inmune, tales como toxoide de tétano, toxinas bacterianas, tales como exotoxinas de *Pseudomonas* y derivados de lípido A.

Para la formulación de la vacuna, pueden utilizarse también otros métodos conocidos para la conjugación o desnaturalización de componentes de vacunas, con el fin de aumentar la inmunogenicidad de la vacuna aún más.

Las formas de realización especiales de la vacuna según la invención contienen antígenos de vacunas adicionales, en particular anticuerpos antiidiotípicos, es decir, mezclas del anticuerpo inmunógeno según la invención con varios anticuerpos que se administran al mismo tiempo.

El anticuerpo inmunógeno según la invención es apto también para la preparación de diagnósticos según la invención. Así, por ejemplo, reactivos que contienen el anticuerpo inmunógeno junto con otras reactantes o medios de detección pueden ofrecerse como diagnóstico en forma de un kit. Un reactivo de este tipo contiene preferentemente un marcador ("label") para la detección directa del anticuerpo o de su producto de reacción. El diagnóstico según la invención se utiliza por ejemplo para el análisis cualitativo y/o cuantitativo de células tumorales o metástasis para el análisis de un potencial para la formación de metástasis, en el que el reactivo actúa por medio de una reacción inmune o formación de un complejo inmune.

El procedimiento según la invención comprende las etapas de:

- a) proporcionar un anticuerpo con el idiotipo de un antígeno asociado a tumores y
- b) acoplar al anticuerpo por lo menos un epítipo de un antígeno asociado a tumores.

El acoplamiento se realiza normalmente por medio de una reacción química o biológica, por ejemplo enzimática. Sin embargo, una unión de un anticuerpo a un epítipo puede realizarse también ya a nivel molecular-biológico. La recombinación de ácidos nucleicos ya permite expresar y preparar un producto conjugado. Los procedimientos según la invención de este tipo están caracterizados por las etapas de

- a) proporcionar un ácido nucleico que codifica para un anticuerpo con el idiotipo de un antígeno asociado a tumores y
- b) recombinar el ácido nucleico con un ácido nucleico que codifica para un epítipo de un antígeno asociado a tumores o para su imitación.

El anticuerpo de partida según la invención es un anticuerpo antiidiotípico, es decir, un ab2.

5 El acoplamiento corresponde a una conjugación para formar un enlace covalente. De esta forma, se sintetiza un derivado que se distingue de anticuerpos nativos.

10 La combinación según la invención de dos imitaciones de TAA inmunógenas completamente distintos con relación a su naturaleza permite sorprendentemente una inmunización extremadamente eficaz contra las estructuras asociadas a tumores o específicas para tumores, permitiendo proteger de esta forma el sistema inmune endógeno eficazmente contra los tumores respectivos o permitiéndole poder combatir dichos tumores.

15 El anticuerpo según la invención funciona como portador de un antígeno proteínico, que está presente por ejemplo unido a un antígeno de carbohidrato como conjugado de la presente invención. Igualmente, es posible prever varios antígenos de carbohidrato en el conjugado según la invención. Así, por ejemplo, en un anticuerpo pueden estar acoplados varios glicanos distintos, los cuales dispararán respuestas inmunes contra dos o más estructuras de carbohidrato distintas asociadas a tumores. Un conjugado de este tipo no ocurre en los sistemas naturales. Por este motivo, las estructuras auto-antigénicas son reconocidas como ajenas, lo cual refuerza adicionalmente la inmunogenicidad. Por tanto, según la invención, un conjugado de este tipo está presente en una disposición sintética, que no ocurre naturalmente (es decir, en células tumorales) ni estérica ni funcionalmente.

20 El acoplamiento según la invención de dos estructuras completamente distintas con relación a su naturaleza en una sola molécula da lugar, además de la ventaja de una formulación sencilla de la vacuna sintética, también a un esquema de vacunación mucho más sencillo, puesto que siempre puede trabajarse con la misma vacuna. Tanto la vacunación inicial como las vacunaciones del tipo "booster" posteriores se realizarán preferentemente con la misma vacuna.

25 La invención se refiere también a un procedimiento para la inmunización de epítopes de antígenos asociados a tumores o de sus imitaciones. A tal fin, se utilizan en particular los epítopes de bajo peso molecular de los antígenos, los cuales por sí mismos serían apenas reconocidos por el sistema inmune de los mamíferos, en particular del ser humano. La inmunogenización se lleva a cabo de tal manera que un antígeno se conjuga con un anticuerpo, funcionando el anticuerpo como portador. El procedimiento permite inmunogenizar un gran número de epítopes, en particular naturalmente los epítopes de la selección de antígenos ya citada. El anticuerpo inmunógeno preparado contiene preferentemente el epítope a inmunogenizar y otro epítope de un antígeno asociado a tumores.

30 La inmunogenización produce un material que es apto de forma sorprendentemente eficaz para la inmunización de pacientes. Por tanto, el producto obtenible según la invención se proporciona ventajosamente como vacuna.

35 Procedimientos para hallar estructuras antigénicas adecuadas, una modelación y preparación de los péptidos, polipéptidos o proteínas derivados de TAA o ácidos nucleicos que codifican para los mismos, además lipoproteínas, glicolípidos, carbohidratos o lípidos son conocidos por los expertos en la materia y pueden proporcionarse para la estructura específica para el tumor respectivo sin gastos experimentales inaceptables. Además, se conocen procedimientos para la conjugación de una proteína con estructuras de este tipo que son aptos para el procedimiento según la invención.

40 Las estructuras de carbohidratos seleccionadas como imitación de epítope pueden proceder de fuentes naturales o sintéticas, cuyos carbohidratos están presentes como glicoproteínas o como glicolípidos y pueden acoplarse como tales a la molécula portadora correspondiente.

45 Los componentes de anticuerpo pueden sintetizarse también químicamente y a continuación unirse a estructuras de epítope o sintetizarse juntos. En una síntesis química de moléculas portadoras de anticuerpos, es posible introducir grupos reactivos en puntos especiales, para poder controlar tanto el grado de acoplamiento a un epítope como la manera y el sitio de unión.

50 Los portadores de anticuerpos pueden prepararse también por ingeniería genética como moléculas recombinantes. Es posible producir dichos anticuerpos en células de huésped que no realizan una glicosilación (tal como por ejemplo Escherichia coli). Los polipéptidos de este tipo pueden acoplarse a continuación química o enzimáticamente al antígeno de carbohidrato deseado.

55 Sin embargo, también es posible producir el portador de anticuerpos en células que son capaces de glicosilar la molécula. La modificación por ingeniería genética de ácidos nucleicos que codifican para anticuerpos nativos puede tener el efecto, por ejemplo, que se formen lugares de glicosilación adecuados en la molécula traducida.

60 Una glicosilación de un producto genético recombinante de este tipo con las estructuras de glicano correspondientes asociadas a tumores puede producirse en células que se han modificado genéticamente de tal forma que glicosilan proteínas de forma correspondiente. Las células de este tipo pueden ser aislados naturales (clones celulares) que pueden hallarse por medio de un proceso de selección (screening) dirigido a la glicosilación deseada.

Sin embargo, también es posible modificar células de tal manera que expresen las enzimas requeridas para la glicosilación deseada de tal manera que la glicosilación deseada se encuentra precisamente en el polipéptido/portador/proteína (Glycoconj. J. (1999), 16: 81).

5 Sin embargo, también es posible preparar o modificar el modelo de glicosilación de proteínas enzimáticamente (Clin. Chem. Lab. Med. (1998), 36; 373).

10 En el anticuerpo inmunógeno según la invención, las estructuras de epítipo distintas pueden estar unidas a través de un acoplador. Dicho acoplador es preferentemente una molécula bifuncional corta, tal como por ejemplo N-hidroxisuccinimida. El acoplamiento a través de azúcares activados por nitrofenilo es posible también. En una forma de realización preferida, el acoplamiento se realiza a través de grupos sulfhidrilo (Biochim. Biophys. Acta (1983), 761, 152-162). Ejemplos de ligadores (linkers) con grupos sulfhidrilo reactivos son BMH, DFDNB o DPDPB. Aún así, el acoplador puede realizarse también por medio de un compuesto químico más largo en calidad de molécula acopladora sencilla. Siempre, el requisito es que dicho acoplador no afecte adversamente a las propiedades inmunológicas del conjugado, es decir, que él mismo no dispara ninguna inmunogenicidad importante. Según la invención, el acoplador puede prepararse también por medio de una transformación química de una parte del anticuerpo o de la estructura a conjugar cuasi "in situ". Dicho acoplador preparado en el anticuerpo mismo o la estructura de epítipo misma puede conjugarse a continuación directamente con el otro participante de la unión (por ejemplo a través del grupo amino de lisina, a través de grupos OH, grupos de azufre, etc.). Los procedimientos de acoplamiento son conocidos en el estado de la técnica (Anal. Biochem. (1986) 156, 220-222, Proc. Natl. Acad. Sci. (1981), 78, 2086-2089; Biochem. Biophys. Res. Comm. (1983), 115, 29-37).

20 Según una forma de realización particular de la presente invención, el anticuerpo según la invención comprende una molécula de ácido nucleico que codifica para un TAA proteínico como estructura de epítipo en el sentido de la presente invención, en el que el ácido nucleico está conjugado de forma covalente.

25 La invención se refiere también a un kit apto para la vacunación contra tumores. El kit comprende una preparación de un anticuerpo inmunógeno según la invención y un dispositivo de administración apto, tales como por ejemplo jeringuillas, un dispositivo de infusión, etc. Cuando la preparación del conjugado está presente en forma liofilizada, el kit contiene además una solución de reconstitución adecuada, que presenta, si se desea, estabilizantes o aceleradores de reconstitución especiales.

30 La presente invención, en la que el anticuerpo inmunógeno es proporcionado junto con varias estructuras de epítipo distintas, en particular con la estructura de un antígeno de carbohidrato asociado a tumores, permite disparar una respuesta inmune que presenta dos o más especificidades y por tanto combate una célula tumoral con dos o más antígenos distintos asociados a tumores. De tal forma, se amplía el intervalo de acción de las vacunas y lo hace más específico.

40 A continuación, la invención se ilustrará con mayor detalle haciendo referencia a los siguientes ejemplos así como a los dibujos de las figuras, sin por ello estar limitada a los mismos, en los que muestran:

La figura 1 el reconocimiento de la biespecificidad de la neoglicoproteína HE2-LeY por anticuerpos específicos;

45 La figura 2 un ELISA en sándwich con anticuerpos anti-LeY recubiertos y su detección con anticuerpos anti-HE2;

La figura 3 un SDS-PAGE de varios conjugados de neoglicoproteína;

50 La figura 4 un Western blot del SDS-PAGE de varios conjugados de neoglicoproteína;

La figura 5 un ELISA HE2; y

La figura 6 un ELISA LeY-PAA;

55 La figura 7 el LDS-PAGE. Una comparación entre HE2 (pistas 2-5) y el producto de acoplamiento HE2-sialil-Tn (pistas (6-8) muestra un claro aumento en el peso molecular de la cadena pesada. Esto significa que sialil-Tn se acopló con éxito a la cadena pesada (50 kDa) del anticuerpo HE2. Además, la presencia de una segunda banda (con un peso molecular ligeramente más alto), además de la banda de 25 kDa, demostró que sialil-Tn se acopló también en parte a la cadena ligera.

60 La figura 8 el título de anticuerpo contra HE2. La inducción de la respuesta inmune contra HE2 por medio de la vacuna del multiepítipo de HE2-sialil-Tn es comparable a la provocada por HE2.

La figura 9 un ELISA siali-Tn-PAA

65 La figura 10 la cromatografía de afinidad de EpCAM. Los resultados demuestran que la unión del anticuerpo contra

EpCAM inducida por la vacuna de HE2-sialil-Tn en el suero después de la inmunización es comparable a la de HE2.

Ejemplos

5 **Ejemplo 1: Acoplamiento de un carbohidrato Lewis Y a un anticuerpo específico para EpCAM**

10 El anticuerpo HE2 se ha descrito en la solicitud de patente WO 00/41722 y presenta la característica de provocar, en caso de una inmunización adecuada, una respuesta inmune que se une a las células tumorales. Un antígeno de carbohidrato Lewis Y preparado sintéticamente se acopla según la invención a HE2. En el presente ejemplo, el acoplado se lleva a cabo químicamente:

15 En un tampón adecuado (tampón de fosfato de sodio 100 mM con NaCl 150 mM, pH 8,5), el anticuerpo HE2 se acopla a un tetrasacárido Lewis Y sintético activado con N-hidroxisuccinimida (Syntesome GmbH, Munich, Alemania).

20 El tetrasacárido Lewis Y activado con N-hidroxisuccinimida se disolvió en N,N-dimetilformamida (100 mg/ml) y se adicionó por goteo a la solución del anticuerpo HE2 en un tampón adecuado (tampón de fosfato de sodio 100 mM con NaCl 150 mM, pH 8,5), y la mezcla resultante se sacudió a 4°C durante por lo menos 2,5 horas. El grado de glicosilación del anticuerpo con Lewis Y puede controlarse por selección del exceso molar del azúcar activado y de la concentración de la solución que contiene el anticuerpo (1-10 mg/ml). Para fines de comparación, se prepararon dos preparaciones de reacción distintas variando el exceso molar (5 veces o 15 veces) del azúcar activado: "neoglicoproteína I" con un contenido de carbohidrato más bajo y "neoglicoproteína II" con un contenido de carbohidrato más alto.

25 La biespecificidad de la neoglicoproteína puede demostrarse utilizando métodos inmunológicos distintos (ELISA o Western blotting con anticuerpos dirigidos contra la determinante Lewis Y o contra HE2).

ELISA directo:

30 HE2, neoglicoproteína HE2-Lewis Y o LeY-PM (tetrasacárido acoplado a poli(acrilamida, Syntesome 045-PA) se disolvieron en un tampón de recubrimiento (Na₂CO₃ 15 mM, NaHCO₃ 5 mM, NaN₃ 3 mM, pH 9,6, 10 µg/ml), y la mezcla resultante se ligó a una placa de microtítulo (Nunc, Dinamarca, Maxisorb) (1 hora a 37°C, 100 µl/pozo). Después de lavar las placas de microtítulo tres veces con un tampón de lavado (NaCl al 2%, Triton X-100 al 2% en PBS; 200 µl), la reacción se bloqueó con suero fetal bovino al 5% en PBS (NaCl 138 mM, KOH 1,5 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 6,5 mM, pH 7,2; 200 µl) (30 minutos a 37°C) y, a continuación, la mezcla, después de lavarla repetidas veces con un anticuerpo anti-Lewis Y específico (humano) o un anticuerpo anti-HE2 de cabra (1 µg/ml disuelto en un tampón de disolución: SFB al 2% en PBS; 100 µl), se incubó a 37°C durante media hora. Los anticuerpos no ligados se quitaron lavando la mezcla tres veces con un tampón de lavado. Los anticuerpos ligados se detectaron (30 minutos a 37°C) por medio de un conjugado HRP, que es específico para el anticuerpo de detección correspondiente (IgG+A+M HRP anti-humano de cabra de Zymed (EE.UU.) para los anticuerpos anti-Lewis Y; IgG HRP murino anti-cabra (Axell, EE.UU.) para los anticuerpos anti-HE2, 1 µg/ml, 100 µl). Después de lavar los anticuerpos (3 veces con un tampón de lavado y una vez con un tampón para tinción), el conjugado HRP ligado inicia la tinción de 100 µl de una solución del dihidrocloruro de ortofenilendiamina (Sigma, EE.UU.; disuelto en un tampón para tinción y activado en H₂O₂; al 30%, Merck, Alemania), y el desarrollo del color se paró con ácido sulfúrico al 15% (50 µl). En un fotómetro para microplacas (Labsystem, modelo no. 354), la extinción desarrollada se midió a 492 nm, siendo la longitud de onda de referencia de 620 nm.

Después de otra etapa de lavado con un tampón para tinción (ácido cítrico 24,3 mM, Na₂HPO₄ 51,4 mM, pH 5).

50 Los resultados se han recopilado en la Figura 1: Ambas neoglicoproteínas presentan ambas especificidades (HE2 y Lewis Y). La neoglicoproteína II está glicosilada funcionalmente en mayor grado que la neoglicoproteína I y por tanto da una señal más alta con el anticuerpo anti-Lewis Y.

ELISA en sándwich:

55 Un anticuerpo humano anti-Lewis Y (10 µg/ml disuelto en un tampón de recubrimiento; 100 µl) se ligó a una placa microtítulo de forma no específica (incubación de 1 hora a 37°C), se bloqueó, después de lavarlo tres veces con un tampón de lavado (200 µl), con suero fetal bovino al 5% en PBS (incubar 30 minutos a 37°C) y, a continuación, la mezcla se incubó a 37°C durante 1 hora con las neoglicoproteínas I y II de HE2-Lewis Y así como HE2 como control a varias concentraciones (1,25 – 7,63x10⁻⁶ µg/ml; 100 µl). Después de lavar la mezcla tres veces con un tampón de lavado, la mezcla se incubó con un anticuerpo anti-HE2 de cabra (1 µg/ml disuelto en un tampón de disolución: 100 µl), a 37°C durante 30 minutos. Los anticuerpos en exceso se quitaron por medio de una etapa de lavado posterior (tres veces con un tampón de lavado). Los anticuerpos ligados se detectaron por incubación (30 minutos a 37°C) con IgG HRP anti-cabra murino (Axell, disuelto 1:1000 en un tampón de dilución, 100 µl): Tras un lavado posterior (3 veces con un tampón de lavado, una vez con un tampón para tinción), el conjugado HRP ligado inició la tinción de 100 µl de una solución adicionada del dihidrocloruro de ortofenilendiamina (Sigma, 10 mg disueltos en

25 ml de un tampón para tinción y activado con 10 µl de H₂O₂; al 30%, Merck). La reacción de tinción se paró con 50 µl de H₂SO₄ al 15%, y la extinción se midió a 492 nm (longitud de onda de referencia de 620 nm) en un fotómetro para microplacas (Labsystem, modelo no. 354).

- 5 Por la Figura 2, puede apreciarse que en dicho ELISA en sándwich pueden detectarse ambas neoglicoproteínas, de las cuales "neoglicoproteína II" está glicosilada en mayor grado y por tanto es retenida en mayor grado por el anticuerpo anti-Lewis Y pre-recubierto.

SDS-PAGE:

- 10 Las muestras (anticuerpo HE2 no conjugado, neoglicoproteínas I y II así como Lewis Y-BSA) se trataron con calor en un tampón reductor (85°C, 2 minutos) y se separaron en un gel de poliacrilamida (4-12% de un gel Bis-Tris) por electroforesis. Las proteínas separadas por este método según sus tamaños se visualizaron por medio de tinción de plata (NOVEX SDS-PAGE-System, Invitrogen, EE. UU.). Sobre el gel, se observó sólo un aumento muy pequeño del peso molecular como resultado de la glicosilación con el tetrasacárido Lewis Y (ver la Figura 3).

Western Blot:

- 20 Igual que en el SDS-PAGE, las muestras se separaron según sus tamaños. A continuación, las proteínas separadas se sometieron a un blot en una membrana de nitrocelulosa, se bloquearon en una solución de polvo de leche al 3% durante una hora y, a continuación, la mezcla resultante se incubó con un anticuerpo anti-Lewis Y humano (10 µg/ml en PBS) durante dos horas. Los anticuerpos ligados se detectaron con un conjugado HRP anti-humano de cabra (1:500 en PBS), que es específico para el anticuerpo anti-Lewis Y. Las proteínas glicosiladas con Lewis Y se visualizaron por medio de una reacción de tinción posterior.

- 25 Tal como puede apreciarse por la Figura 4, la neoglicoproteína II reacciona con el anticuerpo anti-Lewis Y, mientras que la neoglicoproteína I parece estar glicosilada de forma demasiado débil como para ser detectable en dicho ensayo con anti-Lewis Y.

30 Respuesta inmune contra HE2 y Lewis Y:

- Sueros de monos inmunizados se examinaron a tiempos distintos antes y después de inmunización para averiguar la formación de una respuesta inmune humoral contra HE2 y contra Lewis Y. El esquema de inmunización fue el siguiente (las inmunizaciones individuales se llevaron a cabo por vía subcutánea: 500 µg de proteína adsorbida en 1,67 mg de hidróxido de aluminio en 0,5 ml de un tampón de fosfato 1 mM pH 6,0/NaCl 155 mM).

Tiempos de inmunización:

- 40 Día 1 (T1)
 Día 15 (T15)
 Día 29 (T29)
 Día 43 (T43)
 Día 57 (T57)
 Día 71 (T71)

Tomas de sangre para obtener el suero:

- 45
 50 Día 1 (T1)
 Día 15 (T15)
 Día 29 (T29)
 Día 43 (T43)
 Día 57 (T57)
 Día 71 (T71)
 Día 92 (T92)

ELISA HE2:

- 60 Una solución de anticuerpos HE2 se diluyó en un tampón de recubrimiento a 10 µg/ml, y la solución resultante se incubó 1 hora a 37°C. Después de lavarla tres veces con 200 µl de un tampón de lavado, se bloqueó con suero fetal bovino al 5% en PBS a 37°C durante 30 minutos. Después de otra etapa de lavado (como antes), se aplicaron 100 µl de diluciones distintas de los sueros de animales inmunizados a la placa microtítulo (tampón de dilución: suero fetal bovino al 2% en PBS) y la mezcla resultante se incubó a 37°C durante 1 hora. Los anticuerpos en exceso se quitaron lavándolos tres veces con un tampón de lavado y, a continuación, la mezcla se incubó 30 minutos a 37°C con 100 µl de una solución de IgG+A+M HRP anti-humano de cabra (Zymed, disuelto 1:1000 en un tampón de dilución). Tras lavarlo 3 veces con un tampón de lavado y una vez con un tampón para tinción, el HRP ligado inició una reacción de tinción del dihidrocloruro de ortofenilendiamina (Sigma, 10 mg disueltos en 25 ml de un tampón para

tinción y activado con 10 μ l de H₂O₂; al 30%, Merck). La reacción de tinción se paró con 50 μ l de ácido sulfúrico (al 15%, Fluka) y la extinción se midió a 492 nm (longitud de onda de referencia de 620 nm) en un fotómetro para microplacas (Labsystem, modelo no. 354).

5 La Figura 5 muestra el resultado del ELISA HE2. Puede apreciarse que la respuesta inmune contra la proteína portadora ya es muy pronunciada después de 2 inmunizaciones.

Esto significa que la inmunización de un mono Rhesus con neoglicoproteína induce una fuerte respuesta inmune humoral contra HE2.

10

ELISA Lewis-Y-AA:

15 Lewis-Y-PAA (Lecitinity Holding, Inc. Bad Homburg, Alemania) se diluyó en un tampón de recubrimiento a 10 μ g/ml, y la solución resultante se incubó 1 hora a 37°C (100 μ l). Después de lavarla tres veces con un tampón de lavado, se bloqueó con 200 μ l de suero fetal bovino al 5% en PBS a 37°C durante 30 minutos. Después de otra etapa de lavado (como antes), se aplicaron 100 μ l de diluciones distintas de los sueros de animales inmunizados a la placa microtítulo (tampón de dilución: suero fetal bovino al 2% en PBS) y la mezcla resultante se incubó a 37°C durante 1 hora. Los anticuerpos en exceso se quitaron, lavándolos tres veces con un tampón de lavado y, a continuación, la mezcla se incubó 30 minutos a 37°C con 100 μ l de una solución de IgG+A+M HRP anti-humano de cabra (Zymed, disuelto 1:1000 en un tampón de dilución). Tras lavarlo tres veces con un tampón de lavado y una vez con un tampón para tinción, el HRP ligado inició una reacción de tinción del dihidrocloruro de ortofenilendiamina (Sigma, 10 mg disueltos en 25 ml de un tampón para tinción y activado con 10 μ l de H₂O₂, al 30%, Merck). La reacción se paró con 50 μ l de ácido sulfúrico (al 15%, Fluka) y la extinción se midió a 492 nm (longitud de onda de referencia de 620 nm) en un fotómetro para microplacas (Labsystem, modelo no. 354).

25

La Figura 6 muestra que la inmunización de un mono Rhesus con neoglicoproteína dispara una respuesta inmune humoral dirigida específicamente contra Lewis Y.

Ejemplo 2: Acoplamiento de un carbohidrato sialil-Tn a HE2

30

Sialil-Tn-O(CH₂)₃NH(CH₂)₄COO-pNp se acopló a HE2. El producto final se analizó por medio de SEC, LDS-PAGE, Western blot y varios ensayos ELISA.

Métodos

35

Material

HE2 Panorex, 10 mg/ml, lote 170901
Sialil-Tn-O(CH₂)₃NH(CH₂)₄COO-pNp, 2x5 mg, empresa Lectinity
DMF (N,N-dimetilformamida (anhidro, Merck))
40 Tampón de acoplamiento: Na₂HPO₄ 0,1 mM + NaCl 0,15 M (pH = 8)
Tampón de formulación: NaCl al 0,86% + Na₂HPO₄ 1 mM (pH = 6)

Procedimiento

45

1. 100 mg de HE2 (V = 10 ml; conc.. 10 mg/ml) se dializaron contra 2x700 ml del tampón de acoplamiento a 4°C durante 20 horas utilizando una cassette de diálisis Slide-A-Lyzer, el volumen se completó a ~ 100 ml, y la concentración según SEC era de ~ 10 mg/ml.

50

2. 2x5 mg de sialil-Tn-O(CH₂)₃NH(CH₂)₄COO-pNp se disolvieron en 2x100 μ l de DMF (100 μ l por probeta).

3. La solución de sialil-Tn (en DMF) se completó a ~ 10 ml (~ 100 mg) con HE2 enfriado con hielo (en un tampón de acoplamiento).

55

4. Ambas probetas de sialil-Tn se lavaron con 100 μ l de DMF (se realizó una transferencia de la probeta 1 a la probeta 2), que se adicionó también a la mezcla de reacción.

5. La mezcla de reacción se dejó girar a 4°C durante la noche (28 horas). La cinética de la reacción se comprobó por medio de SEC.

60

6. La solución final de HE2-sialil-Tn (10 ml, ~ 10 mg/ml) se dializó contra 2x800 ml del tampón de formulación a 4°C durante 20 horas utilizando una cassette de diálisis Slide-A-Lyzer.

Análisis:

Cromatografía de exclusión por tamaño:

5 Las concentraciones de HE2-sialil-Tn se cuantificaron por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) en una columna ZORBAX GF-250 en un sistema Dionex. El sistema de HPLC se ensayó con un estándar de filtración de gel (empresa BioRAD).

10 HE2 se seleccionó como estándar de referencia para la cuantificación de HE2-sialil-Tn. El descenso del tiempo de retención (correlacionado con el ascenso del peso molecular) correlaciona con la eficacia de la reacción de acoplamiento del sialil-Tn al HE2. Los datos obtenidos muestran que la eficacia de acoplamiento aumenta con el tiempo de reacción y alcanza una saturación tras 23-27 horas.

LDS-PAGE (dodecilsulfato de litio y gel de poliacrilamida)

15 LDS-PAGE con un gel Bis-Tris (4-12%)

Tinción con SilverXpress™: ver “NuPAGE Bis-Tris Gel” Instruction Booklet, página 13

20 Los resultados se han representado en la figura 7.

Pista	Muestra	Conc.	Volumen [μl]	Preparación
1	Mark 12 MW Standard (marcador de peso molecular)	-	10	keine
2	HE2 dializado en un tampón de acoplamiento	20 μg/ml	10	s. SOP
3	HE2 dializado en un tampón de acoplamiento	10 μg/ml	10	s. SOP
4	HE2 dializado en un tampón de acoplamiento	50 μg/ml	10	s. SOP
5	HE2 dializado en un tampón de acoplamiento	2,5 μg/ml	10	s. SOP
6	HE2-sialil-Tn dial. en un tampón de formulación	20 μg/ml	10	s. SOP
7	HE2-sialil-Tn dial. en un tampón de formulación	10 μg/ml	10	s. SOP
8	HE2-sialil-Tn dial. en un tampón de formulación	5 μg/ml	10	s. SOP
9	HE2-sialil-Tn dial. en un tampón de formulación	2,5 μg/ml	10	s. SOP
10	Mark 12 MW Standard (marcador de peso molecular)	-	10	keine

25 Figura 7: En comparación con HE2 (pistas 2-5), en el producto de acoplamiento HE2-sialil-Tn (pistas 6-8), tuvo lugar un claro aumento en el peso molecular de la cadena pesada, lo cual indica que sialil-Tn se acopló con éxito a la cadena pesada (50 kDa) del anticuerpo HE2. Además, la presencia de una segunda banda (con un peso molecular ligeramente distinto), además de la banda de 25 kDa, indica que la cadena ligera se acopló también en parte a sialil-Tn.

Western Blot

30 Western Blot con conejo x ratón IgG2a

Procedimiento:

- 35 1. Gel de LDS con gel de Bis-Tris (4-12%)
2. Para las instrucciones del western transfer, ver “NuPAGE Bis-Tris Gel” Instruction Booklet, páginas 14-20 (con membrana de transferencia de PVDF Immobilon 0,45 μm, empresa Millipore)

40 3. Desarrollo de la membrana:

Material:

45 Conjugado: conejo x ratón IgG2a – HRP, #61-0220, empresa Zymed, solución de tinción 1: 15 mg del reactivo de tinción HRP (empresa BioRAD) en 5 ml de MeOH, solución de tinción 2: 15 μl de H₂O₂ al 30% en 25 ml de PBS def. 1x

Procedimiento:

- 50 Bloquear la membrana con polvo seco de leche al 3% en PBS a TA durante 1 hora
 Lavar la membrana con PBS
 Incubarla con el conjugado (dilución 1:1000 en PBS) a TA durante 1 hora
 Lavar la membrana con PBS
 Desarrollo con las soluciones de tinción 1+2 y parar la tinción con agua.

Western blot con anti-sialil-Tn CD 175s (tipo IgG)/ratas/ratón IgG1 – HRP.

Procedimiento:

1. Gel de LDS-PAGE con un gel Bis-Tris (4-12%)
2. Para las instrucciones del western transfer, ver “NuPAGE Bis-Tris Gel” Instruction Booklet, páginas 14-20 (utilizando una membrana de transferencia de PVDF Immobilon 0,45 µm, empresa Millipore)
3. Desarrollo de la membrana:

Material:

Anticuerpo secundario: anti-sialil-Tn CD175s (tipo IgG), 90 µg/ml, empresa DAKO, no. de código M0899, lote 089(601)

Conjugado: rata x ratón IgG1 – HRP, empresa Becton Dickinson, no. de mat. 559626, lote: 37205

Polvo seco de leche al 3% en PBS def1x

Solución de tinción 1: 15 mg del reactivo de tinción HRP (empresa BioRAD) en 5 ml de MeOH

Solución de tinción 2: 15 µl de H₂O₂ al 30% en 25 ml de PBS

Procedimiento:

Bloquear la membrana con polvo seco de leche al 3% en PBS a TA durante 1 hora

Lavar la membrana con PBS

Incubarla con el anticuerpo secundario (concentración 10 µg/ml) V = 5 ml, a TA durante 1 hora

Lavar la membrana con PBS

Incubarla con el conjugado (dilución 1:1000 en PBS) a TA durante 1 hora

Lavar la membrana con PBS

Desarrollo con las soluciones de tinción 1+2 y parar la reacción con agua.

Se confirmó el ascenso del peso molecular de la cadena pesada del anticuerpo HE2 tras acoplamiento con sialil-Tn por medio del Western blot así como la tinción mediante un IgG2a-HRP de conejo anti-ratón.

Se realizó un ELISA estándar para demostrar cuánta de la actividad de unión antiidiotípica (del HE2) se retiene en el producto de acoplamiento.

IGN111 inmovilizado se une al HE2 antiidiotípico, que se detecta por medio de un anti-ratón IgG2a-HRP.

Se ha demostrado que HE2 es aproximadamente 2-3 veces más reactivo que HE2-sialil-TN, lo cual significa que se observa sólo una pequeña pérdida de las capacidades de unión tras el acoplamiento.

Se realizó otro ELISA estándar para detectar sialil-Tn por medio de un anticuerpo anti-sialil-Tn murino. A tal fin, el material de partida HE2 y el producto de acoplamiento HE2-sialil-Tn se inmovilizaron. Para la detección de sialil-Tn, se utilizaron anti-sialil-Tn (IgG murino)/anti-ratón IgG1-HRP de rata.

Los resultados muestran que el producto de reacción HE2-sialil-Tn realmente lleva grupos sialil-Tn al contrario de HE2 antes del acoplamiento.

Resumen:

Se acopló sialil-Tn con éxito al anticuerpo HE2. La reacción de acoplamiento presenta un tiempo prolongado de la cinética de reacción, alcanzándose la saturación después de aproximadamente 24 horas. Sialil-Tn se acopló principalmente a la cadena pesada del anticuerpo HE2, mientras que la cadena ligera se acopló sólo en parte a sialil-Tn.

El producto de acoplamiento HE2-sialil-TN retiene la mayor parte de la especificidad idiotípica de HE2 y la parte sialil-Tn de dicha glicoproteína es reconocida por anticuerpos específicos para sialil-Tn.

Dichos resultados juntos indican claramente que los epítopes antigénicos de ambas partes, tanto la parte proteínica HE2 como la parte de sialil-Tn, se han conservado en la vacuna multiepítope. El contenido en endotoxina se encuentra por debajo del límite de detección.

Ejemplo 3: Formulación de HE2-sialil-Tn utilizando varios adyuvantes:

1. Tampón de formulación (NaCl, Na₂HPO₄), timerosal, Alhydrogel (hidróxido de aluminio)
2. Tampón de formulación, timerosal, Alhydrogel (hidróxido de aluminio), LPS, E. coli (Sigma, no. L-4391)

Ejemplo 4: Resultados de la inmunización de monos Rhesus con la neoglicoproteína HE2-sialil-Tn: Tolerancia y estudios de inmunogenicidadEsquema de inmunización y tomas de sangre

Monos Rhesus se vacunaron cuatro veces con inmunizaciones subcutáneas con 500 µl de las vacunas (contienen 500 µg de HE2 adsorbidos en Alhydrogel en un tampón de fosfato de sodio 1 mM, pH = 6) suplementados con NaCl al 0,86%).

Las tomas de sangre se realizaron los días -3, 1, 8, 15, 29, 57 y 71. La sangre se dejó coagular (probetas SST activador de coágulo (Vacutainer)); el suero se transfirió a probetas Nunc de 1,8 ml (375418).

Día	Fecha	Inmunización	Toma de sangre
-3		no	sí
1		500 µl	sí, antes de la inmun.
8		no	sí
15		500 µl	sí, antes de la inmun.
29		500 µl	sí, antes de la inmun.
57		500 µl	sí, antes de la inmun.
71			sí

- La figura 8 muestra los resultados de los estudios de inmunización en monos Rhesus. La inducción de la respuesta inmune contra HE2 por medio de la vacuna de multiepitope HE2-sialil-Tn es comparable a la respuesta inmune inducida por HE2.

ELISA

- El presuero (día 1) y suero inmune (días 15, 29, 57, 71) se analizaron con relación a la respuesta inmune contra el antígeno inmunizante (HE2) por medio de un ELISA HE2 y ELISA sialil-Tn. Para la detección, se utilizó un conjugado IgGAM-HRP anti-humano de cabra (Zymed, no. 62-8320, lote 20571004).

- El ELISA sialil-Tn se realizó de forma similar al ELISA Lewis Y, aparte de algunas modificaciones. Para resumir, placas ELISA (placas microtítulo F96 Maxisorp, NUNC) se recubrieron con 20 µg/ml de sialil-Tn-PAA (al 30% en moles, Sytesome), diluido en un tampón de recubrimiento, a 37°C durante 2h. Después de la etapa de lavado (tres veces, WBK diluido 1:10), las placas ELISA se bloquearon con SFB al 5% en PBS (30 min, 37°C), seguido de otra etapa de lavado. Las muestras (prediluidas en SFB al 2%) se incubaron a 37°C durante 1h. NAS (NA-Pool 25-07-01, empresa Biotest) y PBS se utilizaron como controles negativos. Para el ELISA sialil-Tn, se utilizó un anticuerpo anti-sialil-Tn murino CD175s (DAKO, no. de código 039(601)) con una concentración de partida de 20 µg/ml, que servía de control positivo.

- Tras otra etapa de lavado, se incubaron con un conjugado Ig (H+L) HRP antihumano de cabra (1:4000, SB, Southern Biotechnology, no. de cat. 2010-05, no. de lote L262-S496L) o un conjugado IgG (Fc) HRP antihumano de ratón (1:1000, SB, no. de cat. 9040-05, no. de lote J560-NC21G) o un conjugado IgM-HRP antihumano de ratón (1:1000, SB, no. de cat. 9020-05, no. de lote H018-W089) a 37°C durante 30 min. Para la detección del anticuerpo anti-sialil-Tn de ratón (control positivo), se utilizó un IgG1-HRP anti-ratón de conejo (Zymed, no. 61-0120, no. de lote 00761146).

- Después de la próxima etapa de lavado, se adicionó el substrato OPD (1 comprimido de OPD disuelto en 25 ml de un tampón para tinción, + 10 µl de H₂O₂ al 30%). Después de 10 min, la reacción de tinción se paró por adición de 50 µl de H₂SO₄ (al 30%).

- La figura 9 muestra los resultados del ELISA sialil-Tn-PAA. La inducción de la respuesta inmune contra el antígeno HE2 inmunizante y el antígeno de destino EpCAM es comparable a la vacuna de epítipo único HE2. Esto quiere decir que tuvo lugar una inducción de la respuesta inmune contra el antígeno de carbohidrato sialil-Tn, pero que dicha respuesta inmune no se indujo en la vacunación con la vacuna de epítipo único HE2.

Cromatografía de afinidad

Una cromatografía de afinidad se llevó a cabo en un ÄKTA-Explorer, Pharmacia FPLC System. 1 ml del suero (presuero o suero inmune) se diluyó 1:10 con PBS 1x + NaCl 0,2 M, pH = 7,2 (= tampón A). Tras el equilibrado de

columna, el suero diluido se introdujo en la columna de cromatografía a una velocidad de flujo de 1 ml/min. La muestra sin ligar se eliminó de la columna por lavado con un tampón A hasta que la línea de UV (280 nm) se encontró por debajo de 5 uma (unidades de miliabsorbancia). La elución de la muestra ligada se realizó por etapas con un tampón de glicina pH = 2,9 (= tampón B, tampón de elución). Las fracciones deseadas se neutralizaron inmediatamente con NaHCO₃ 1 M y se estabilizaron por adición de azida sódica (concentración final: 0,02%).

Se utilizaron las siguientes columnas de cromatografía de afinidad:

1. HE2 sefarosa: HE2 acoplado a una columna CH Sefarosa 4B, lote 20000905-070301 (SS LJ5/174)
2. EpCAM sefarosa: EpCAM acoplado a una columna CH Sefarosa 4B (IF LJ32/54+57)
3. HE2-sialil-Tn sefarosa: HE2-sialil-Tn acoplado a una columna CH Sefarosa 4B

La purificación del presuero o suero inmune se realizó o bien por a) cromatografía de afinidad en una sola etapa o bien por b) cromatografía de afinidad secuencial con el eluato de la primera columna, que se aplicó a una segunda columna de cromatografía de afinidad o bien por c) cromatografía de afinidad diferencial con el eluato de la primera columna, que fue trasladado a una segunda cromatografía de afinidad.

Después de la cuantificación de las cantidades de inmunoglobulinas por medio de SEC, los eluatos de suero restantes se estabilizaron por adición de SFB (concentración final 2%) y se almacenaron a +4°C. Los resultados se han recopilado en la figura 10.

Cromatografía de exclusión por tamaño:

Las cantidades de inmunoglobulinas (IgG, IgM) se cuantificaron por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) en una columna ZORBAX GF-250 en un sistema DIONEX. El sistema de HPLC se ensayó por medio de un estándar de filtración de gel.

Para la cuantificación de las cantidades de inmunoglobulinas en los eluatos ÄKTA, se preparó una curva estándar de IgG humano (sandoglobulina) en un intervalo de 1,95-25 µg/ml y se utilizó como estándar de referencia.

Líneas de células

En un medio de RPMI1640, a células de WM9, SKBR5, KATOIII, HT29 y OVCAR3 se adicionó L-glutamina, y la mezcla resultante se cultivó con SFB al 10% y penicilina/estreptomicina al 1%, A CT26 y CT26-KSA (clono #21 Sp1-3; células de CT26 transfectadas con EpCAM) en DMEM, se adicionó SFB al 10%, aminoácidos al 1%, piruvato sódico al 1%, vitamina al 1%, L-glutamina y penicilina/estreptomicina al 1%, y la mezcla resultante se dejó cultivar.

Análisis por FACS

Las células se cosecharon en un tampón de PBS que contiene 0,2 mg/ml de EDTA. El medio de cultivo se adicionó a las células separadas, que a continuación se convirtieron en pellets y se lavaron dos veces en un tampón de FACS (tampón de PBS al que se adicionó SFB al 2% y NaN₃ al 0,1%). 10.000 células se bloquearon con PBS que contiene SFB al 10% y azida sódica al 0,1% sobre hielo durante 30 minutos. Después de transferir las células a un tampón FACS, las células se incubaron con los eluados de la cromatografía de afinidad del presuero o del suero inmune sobre hielo durante una hora. Como controles positivos, se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: IGN311 (EN 25.888) para la tinción de Lewis Y y HE2 and KS1/4 para la tinción de EpCAM. Las células se lavaron dos veces en un tampón de FACS y se incubaron con los anticuerpos de detección protegidos contra la luz durante 30 minutos (IgGAM-FITC antihumano de cabra (específico para las cadenas gamma y las cadenas ligeras), Silenius, dilución 1.1000 o IgGAM F(ab)₂' Dako anti-ratón de conejo (específico para las cadenas gamma y las cadenas ligeras)), dilución 1:100, para la detección de los anticuerpos HE2 murinos y KS1/4. Después de lavar las células tres veces en un tampón FACS, se midieron las intensidades de fluorescencia (10.000 células en 100 µl del tampón FACS por análisis) con un sistema FACS-Calibur (Becton Dickinson).

Tinción de control con:

IGN311 (25 µg/ml), KS1/4 (1 µg/ml), HE2 (1 µg/ml), SKBR5, KatoIII, WM9, células de CT26 y CT26KSA.

Resultados

Respuesta inmune contra un antígeno inmunizante (HE2)

El presuero (día 1) o suero inmune (días 15, 29, 57, 71) de todos los animales se analizaron con relación a la respuesta inmune contra el antígeno inmunizante (HE2) por medio de ELISA HE2. En todos los grupos vacunados, se halló un claro efecto de inmunización, aumentando la fuerza de la respuesta inmune en función del tiempo (y del número de inmunizaciones). Lo importante era que ninguno de los adyuvantes aumentó el título de HE2 o la cinética de la respuesta inmune en comparación con el grupo de control que había recibido el antígeno sin adyuvante

(P6/01). La vacuna de multiepítotope HE2-sialil-Tn (P2/01) indujo un título de HE2, que era comparable al de la vacuna de HE2 (P6/01).

Los resultados pueden verse en la figura 8, en la que los resultados son los de un estudio con monos Rhesus HE2.

La vacuna de multiepítotope HE2-sialil-Tn indujo una respuesta inmune contra el segundo antígeno, sialil-Tn, en todos los animales inmunizados, tal como fue comprobado en el ELISA sialil-Tn, un efecto que no se encontró tras la vacunación con la vacuna de epítotope único de HE2.

Purificación del suero por cromatografía de afinidad directa de EpCAM:

Los sueros inmunes (día 71) fueron analizados por cromatografía de afinidad directa de EpCAM, seguido de una cromatografía de exclusión por (SEC). En todos los grupos vacunados, se encontraron cantidades significativas de Ig (IgG y IgM) en el suero inmune (60-87 µg de Ig), las cuales eran mucho más altas que el contenido de IgG en el presuero (13-22 µg). Además, podía observarse un cambio de IgG tras la vacunación, con relaciones IgG/IgM más altas en el suero inmune. En cambio, los adyuvantes no dieron lugar a un aumento de las Ig (IgG, IgM), las cuales presentan una reactividad específica con rEpCAM en los sueros inmunes, tal como se suponía según los resultados de la cromatografía de afinidad directa de EpCAM en comparación con el grupo de control de HE2.

ELISA sialil-Tn

El presuero (día 1) y suero inmune (día 71) del grupo de vacunas de multiepítotope (P2/01, HE2-sialil-Tn) se ensayaron en comparación con el grupo de control P6/01 con relación a la respuesta inmune contra el antígeno de carbohidrato sialil-Tn por medio de un ELISA sialil-Tn.

En todos los cuatro animales del grupo P2/01, se encontró un claro efecto de inmunización, es decir, la inducción del título de anticuerpos anti-sialil-Tn. Al contrario, en el grupo de control de HE2, no tuvo lugar un aumento del título de anticuerpos anti-sialil-Tn después de la inmunización.

Los resultados se han representado en la figura 8. La inducción de la respuesta inmune contra el antígeno inmunizante (HE2) y el antígeno de destino (Ep-CAM) es similar a la de la vacuna del epítotope único de HE2. La respuesta inmune contra el antígeno de carbohidrato sialil-Tn es inducida por la vacuna de multiepítotope, mientras que dicha inducción no fue encontrada tras la inmunización con la vacuna del epítotope único de HE2 (P6/01).

Ejemplo 5: Preparación de un anticuerpo recombinante de ratón IgG2a HE-2 (rHe-2)

Constructos moleculares-biológicos

El vector de expresión bicistrónico pIRES de Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, EE.UU., permite expresar dos genes a un alto nivel y permite la traducción de dos marcos de lectura abiertos que siguen uno al otro del ARN mensajero. Para seleccionar transformantes positivos con la utilización de un gen reportero, se truncó el sitio de entrada interna del ribosoma (internal ribosome entry site (IRES)) en este vector de expresión, permitiendo tasas de expresión más bajas en dicho segundo marco de lectura.

Para conseguir esto, había que reestablecer la secuencia IRES original, con el fin de poder cumplir con nuestros requerimientos para la expresión de las cadenas de anticuerpos pesada y ligera con casi la misma cantidad de expresión.

Para la expresión de nuestros marcadores de selección, se utilizó la secuencia IRES atenuada.

Las manipulaciones del ADN se llevaron a cabo según los métodos estándares. Utilizando la tecnología PCR y el kit Advantage-HF PCR (CLONTECH Laboratories Inc., Palo Alto, EE.UU.), se amplificaron las cadenas pesada y ligera del anticuerpo HE2. Se utilizaron secuencias de cebador (primer), para introducir en primer lugar los lugares de corte de restricción deseados, necesarios para la incorporación del gen en los vectores de expresión, y en segundo lugar se incorporaron las secuencias KOZAK corriente arriba de los marcos de lectura abiertos.

Se utilizaron las secuencias señal autólogas, para dirigir las cadenas polipeptídicas desnudas en el circuito secretario. Los cebadores fueron adquiridos de la MWB-Biotech AG, Alemania. Se desarrolló una tecnología de clonación de dos etapas: La cadena kappa, que contiene su secuencia señal autóloga, se amplificó como fragmento *Xho I*, *Mlu I* y se ligó en el vector de expresión, utilizando los "Rapid ligation kits" (Roche, Alemania) según las instrucciones del fabricante. Una cepa de bacterias de *E. coli* químicamente competente, DH5-alfa (Gibco BRL), se transfectó con el constructo y se amplificó, utilizando un marcador de selección de *ampicilina*. En una segunda etapa, se amplificaron la secuencia IRES reconstruida y la cadena gamma, que contiene también la secuencia señal autóloga, como fragmentos *Mlu I*, *Nco I* y *Nco I*, *Sal I* y se ligaron en una reacción de ligación de una sola etapa en el vector de expresión modificado, que ya contiene la cadena de HE2 kappa. Dicho constructo se amplificó, utilizando la cepa de bacterias de *E. coli*, DH5-alfa (Gibco BRL). 25 constructos que procedían de muestras de PCR distintas

se digirieron con las endonucleasas de restricción EcoRI y BamHI. Los constructos que presentaban el patrón de restricción correcto se secuenciaron de forma bidireccional. En este constructo de expresión, se incorporó la cassette de selección descrita a continuación. El marcador de selección DHFR se amplificó como fragmento PCR Xba I/Not I a partir del plásmido pSV2-dhfr (ATCC #37146). Dichos puntos de corte de restricción se introdujeron por medio de cebadores de PCR. La secuencia atenuada de IRES at. se amplificó como fragmento Sal I/Xba I a partir de pSV-IRES (Clontech #6028-1) por medio de PCR. En una reacción de ligación de una sola etapa, se ligaron IRES at. y DHFR en el constructo de expresión ya descrito, tras una digestión con las endonucleasas de restricción correspondientes y otra etapa de desfosforilación.

Tras una transfección de la cepa de bacterias de E. coli DH5-alfa (Gibco BRL), se sometieron los transformantes positivos a una exploración selectiva por PCR (screening). Los constructos se secuenciaron de forma bidireccional y se utilizaron para transfecciones adicionales de células eucarióticas.

Ejemplo 6: Transfección

La cepa de eucariotas caracterizada, CHO (ATCC-CRL9096), se transfectó, utilizando el vector de expresión descrito anteriormente. El marcador de selección DHFR se utilizó para establecer líneas celulares estables que expresan rHE-2. En una placa de cultivo de 6 pozos, a densidades de células de 10^5 células la línea celular se ajustó en un contenido de 1,5 g/L de bicarbonato sódico en 2 ml de un medio completo de Iscove modificado de Dulbecco con L-glutamina 4mM, y se sembró, tras la adición de hipoxantina 0,1 mM y timidina 0,016 mM, 90%; suero fetal bovino, 10% (Gibco BLR). Las células se dejaron crecer hasta una densidad de células de un 50%. A continuación, las células se transfectaron según las instrucciones del fabricante en ausencia de suero con 2 µg de ADN, utilizando el reactivo Lipofectin® (Gibco BRL). La transfección se paró después de 6 ó 24 horas por adición de medio completo.

Ejemplo 7: Selección de transformantes positivos y cultivo

El medio completo se reemplazó por el medio de selección 24 ó 48 horas tras la transfección. El SFB en el medio completo se reemplazó por SFB dializado (Gibco BRL, origen: América del Sur). 10 días tras la selección, aparecieron transformantes positivos como conglomerados multicelulares de rápido crecimiento. La concentración del rHE-2 se analizó en los sobrenadantes mediante ELISA en sándwich específico, el cual reconoce los dominios del anticuerpo tanto variables como constantes. Las células que presentaban una alta productividad se dividieron 1:10 y se introdujeron en botellas para cultivo celular de 75 cm² para su almacenaje en nitrógeno líquido. En paralelo, dichos productores se sometieron a una presión de selección constante, adicionando metotrexato al medio de cultivo y sembrando dichas células en una placa para cultivo celular de 6 pozos. El procedimiento se repitió aproximadamente dos semanas más tarde cuando las células ya habían alcanzado una cinética de crecimiento estable. A partir de una concentración de 0,005 µM, la concentración de MTX se duplicó en cada turno de selección hasta una concentración final de 1.280 µM de MTX, y en paralelo se realizó un subcultivo en placas para cultivo celular de 96 pozos. Los sobrenadantes se ensayaron una vez por semana mediante un ELISA en sándwich específico, el cual reconoce los dominios del anticuerpo tanto variable como constante del anticuerpo. Los cultivos estables con la mayor productividad se transfirieron en botellas para cultivo cultural de 75 cm² y se transfirieron paso por paso en botellas para cultivo celular rotatorias de 860 cm² en un medio no selectivo. Los sobrenadantes se cosecharon, se centrifugaron, se analizaron y se pasaron a una purificación ulterior.

Ejemplo 8: Análisis del producto de expresión

Los sobrenadantes se ensayaron mediante un ELISA en sándwich específico, el cual reconoce los dominios del anticuerpo tanto variable como constante del anticuerpo. El anticuerpo policlonal, antiidiotípico IGN111 se aplicó a una concentración de 10 µg/ml a placas de adsorción Maxisorp® (NUNC). El anticuerpo se formó en cabras que habían sido inmunizadas con fragmentos de HE2 y se extrajo mediante un procedimiento de cromatografía de dos etapas por afinidad. Los anticuerpos contra las regiones constantes del ratón se adsorbieron en una primera etapa sobre una columna de IgG policlonal de ratón, y los anticuerpos antiidiotípicos se atraparon en una segunda etapa en una columna de agarosa HE2 por afinidad. Por tanto, el producto final, la preparación de los anticuerpos policlonales de IGN111, reconoce el dominio variable del anticuerpo HE2.

Los grupos activos restantes se bloquearon por incubación con polvo seco de lecho al 1%, y los sobrenadantes se aplicaron. Los anticuerpos expresados se detectaron por medio de sus regiones constantes a través de los conjugados IgG2a-HRP de conejo anti-ratón (biozima). Se cuantificaron por comparación con un anticuerpo de hibridoma HE2 estándar también aplicado a la columna y caracterizado.

El tamaño de las proteínas expresadas se determinó por una electroforesis de SDS-poliacrilamida, utilizando un gradiente de 4-14% de geles de acrilamida en una cámara de electroforesis Novex® (Gibco BRL). Las proteínas estaban teñidas de plata.

Para detectar los anticuerpos expresados inmunológicamente, se realizaron Western blots sobre membranas de nitrocelulosa (0,2 µm). Las proteínas separadas por los geles de SDS-poliacrilamida se electrotransfirieron, utilizando una cámara para blotting Novex® (Gibco BRL). Antes de la adición de la solución de bloqueo (TBS +

polvo seco de leche al 3% BBL) y de la solución de anticuerpos (10 µg/ml de anticuerpo policlonal de cabra IGN111, anticuerpo monoclonal de cabra IgG anti-ratón (Zymed) o cadena gamma de conejo anti-ratón IgG (Zymed) en TBS + polvo seco de leche al 1%), las membranas se lavaron dos veces. Finalmente, se realizó el desarrollo, utilizando anticuerpos conjugados de HRP de conejo anti-cabra, IgG-HRP de conejo anti-ratón, o IgG-HRP de ratón anti-conejo (BIORAD), diluidos a 1:1000 en TBS + polvo seco de leche al 1% y se adicionó un reactivo de desarrollo de tinción para HRP (BIORAD) según las instrucciones del fabricante.

Se utilizaron geles de enfoque isoelectrónicos, para comparar los productos de expresión purificados con los anticuerpos del hibridoma estándar murino HE2 caracterizado. Las muestras se aplicaron a geles IEF, pH 3-7 (Invitrogen), y la separación se llevó a cabo según las instrucciones del fabricante.

Las proteínas se visualizaron por medio de tinción de plata o métodos inmunológicos mediante Western blot. A tal fin, las proteínas se adicionaron a un gel de SDS/urea/yodoacetamida tamponado con Tris, y la mezcla resultante, tras su separación, se transfirió a membranas de nitrocelulosa. Esto se realizó según el mismo método descrito para los Western blots. La detección se realizó mediante anticuerpos antiidiotípicos policlonales de cabra IGN111.

La interacción del producto de expresión con el antígeno de destino, EpCAM, se analizó, incubando los sobrenadantes purificados con membranas de nitrocelulosa a las que se había electrotransferido rEpCAM. La tinción de los anticuerpos que interactúan se realizó mediante el mismo método que para los Western blots, utilizándose un anticuerpo de IgG2a anti-ratón conjugado con HRP (Zymed).

Ejemplo 9: Purificación por afinidad

Se utilizó un sistema ÄKTA (Amersham Pharmacia Biotech). 1000 ml de un sobrenadante de cultivo claro que contiene el anticuerpo se concentró con un concentrador Pro-Varion 30 kDa cut-off (Millipore), luego se diluyó con PBS y se aplicó a una columna XK26/20 con 20 ml de un gel de afinidad de sefarosa IGN111 (Amersham Pharmacia Biotech). Las proteínas contaminantes se quitaron por medio de una etapa de lavado con PBS + NaCl 200 mM. Los anticuerpos ligados se eluyeron con glicina 100 mM, pH 2,9, y se neutralizaron inmediatamente con NaHCO₃ 0,5 M. El efluente se observó en línea a λ 215 y λ 280 nm y se sometió a un análisis posterior por HPLC con una columna ZORBAX G-250 (Agilent Technologies).

2000 ml de los sobrenadantes cosechados de los cultivos de las botellas rotatorias se centrifugaron, se concentraron, se diluyeron en PBS y se purificaron para homogeneidad por cromatografía de afinidad en una columna de sefarosa IGN111. Tras elución, neutralización y diálisis contra PBS, el producto final se midió mediante SEC-HPLC. Un estándar murino procedente de hibridoma de la misma inmunoglobulina se comparó con rHE2 y se eluyó, eluyéndose ambos como picos agudos al mismo tiempo, correlacionando con el tiempo de retención esperado de IgG. Dicha purificación realizada a escala de laboratorio consiguió una pureza de > 92%.

Otra caracterización del producto de expresión se realizó mediante un SDS-PAGE teñido de plata reductor y no reductor y Western blot. Los productos de expresión se detectaron por medio de los anticuerpos antiidiotípicos anti-HE2, IGN 111 de cabra y se visualizaron por medio de un anticuerpo anti-cabra conjugado con HRP. Las muestras no reducidas presentaban bandas en la región esperada de una molécula intacta de IgG en la región de 160 kDa. Dicho resultado correlaciona exactamente con el anticuerpo del estándar murino de HE2 hibridoma. En caso de las muestras reducidas, bandas son visibles en la región comprendida entre 25 y 50 kDa, también en interacción con el anticuerpo antiidiotípico anti-HE2 de cabra IGN111. Dichas bandas corresponden a las cadenas ligeras y pesadas de IgG.

La interacción con el antígeno de destino de HE-2, EpCAM, se analizó, incubando membranas de nitrocelulosa a las que se había electrotransferido rEpCAM con los productos de expresión purificados. Se realizó otra detección específica para subtipos, utilizando anticuerpos interactivos. El anticuerpo de hibridoma murino estándar HE2 reconoce rEpCAM monomérico de 25 kDa y también una serie de agregados de rEpCAM, que corresponden a formas di-, tri- y poliméricas. Se obtuvo exactamente la misma distribución de bandas con todos los productos de expresión purificados.

Los productos de expresión purificados y el anticuerpo de hibridoma murino estándar HE2 se sometieron a una investigación ulterior. Todos los anticuerpos mostraron un patrón de enfoque isoelectrónico no homogéneo de las polibandas, idéntico en pH, pero distinto en la distribución cuantitativa. Constan de 3 isoformas principales de proteína y dos subformas, distribuidas sobre un intervalo de pH comprendido entre 8,2 y 7,2. Las isoformas procedentes de CHO fueron desplazadas a valores pH más altos, mientras el estándar murino HE2 presentaba las isoformas idénticas, aunque la distribución cuantitativa muestra una tendencia hacia las formas ácidas.

Se ha podido expresar el anticuerpo de HE2 recombinante de ratón IgG2a en células CHO. La integración genómica estable tuvo lugar 14 días después de la transfección. El constructo de expresión permite una rápida y confortable transfección con un solo plásmido. La utilización de un sistema de selección a base de un sistema de huésped al que falta una enzima metabólica esencial permite aumentar el número de copias de un plásmido con el gen correspondiente y un fuerte antagonista de dicho sistema mediante la presión de selección en ascenso continuo. La

utilización de una secuencia de IRES atenuada en la cassette de expresión de dicho marcador seleccionable permite utilizar cantidades muy pequeñas del antagonista MTX para la estrategia de selección. Una expresión moderada se consiguió con cantidades de 10 µg/24 h ml, que pueden dejarse en los cultivos de producción hasta por lo menos 5 semanas. Los productos de expresión purificados no se distinguen del estándar murino HE2 con relación a sus tamaños y a los ensayos inmunológicos específicos. No obstante, pueden ocurrir diferencias en las modificaciones post-traduccionales. Por tanto, los anticuerpos recombinantes presentan un patrón de enfoque isoeléctrico específico para el huésped o el medio. Por tanto, la equivalencia biológica del producto de expresión se investigó en estudios de inmunización adicionales.

10 **Ejemplo 10: Estudios de inmunización**

A. 17-1A Grupo de referencia

15 El anticuerpo murino IgG2a (17-1A), producido por Hybridom Technologie, fue adquirido por Glaxo como una solución de 10 mg/ml de PBS bajo el nombre de Panorex[®]. Dicho anticuerpo se utilizó como anticuerpo de hibridoma murino estándar HE2.

B. rHE-2

20 El HE-2 recombinante fue preparado tal como ha sido descrito anteriormente.

C. 17-1A desglucosilado

25 20 mg de 17-1A se desglucosilaron en condiciones no desnaturalizantes, utilizando PNGase-F (New England Biolabs, #P0704S). La finalización de la desglucosilación se comprobó mediante un análisis de Western blot y por incubación con peroxidasa ConA (Sabio#180705L1205-2). El cambio del tampón y la purificación se llevaron a cabo por cromatografía SEC Superdex 200 con NaH₂PO₄ 1 mM, NaCl al 0,86%, pH 6,0.

D. UPC10

30 UPC10, un anticuerpo IgG2a de una especificidad completamente distinta, se adquirió de Sigma (#M9144-1).

Formulación de la vacuna:

35 Las soluciones de vacunas se formularon en suspensiones de Al(OH)₃ al 1% que contienen 500 µg de anticuerpo/dosis. Las soluciones de anticuerpos se ensayaron con relación a su contenido de endotoxina mediante el método del punto final LAL. 10 y 100 µl del sobrenadante de la solución se ensayaron según las instrucciones del fabricante y se compararon con un estándar de endotoxina de 0,15 a 1,2 UE/ml. Las soluciones de anticuerpos se dializaron contra el tampón de formulación NaH₂PO₄ 1 mM, NaCl al 0,89%, pH 6,0 por medio de una cassette de diálisis Slide-A-Lyzer 3500 MWCO, 3-15 ml (PIERCE, #0066110). La concentración e integridad de la proteína se ensayaron por medio de SEC-HPLC (Zorbax-GF250, Agilent).

Estrategia de inmunización

45 Cuatro monos Rhesus (macacca mulatta) por grupo con pesos corporales comprendidos entre 4 y 6 kg y sin pretratamiento se vacunaron con 500 µl/animal s.c. los días 1, 15, 29 y 57. Las muestras de suero se tomaron los días 11, 5 y 1 (presuero), 14, 29, 57 y 71.

50 Las muestras sanguíneas para la preparación de suero se recogieron en probetas que contenían un activador de coágulo y se centrifugaron a 1500 g durante 30 minutos (según las instrucciones de uso). Las muestras de suero se trasladaron a probetas y se almacenaron a -80°C.

ELISA 17-1A

55 Los presueros y sueros inmunes se analizaron mediante un sistema de ensayo ELISA, utilizando un agente de inmunización para la prueba de la respuesta inmune inducida. 17-1A se utilizó como anticuerpo de recubrimiento en una concentración de 10 µg/ml sobre placas de sorción Maxisorp[®] (NUNC), diluido con un "tampón de recubrimiento" (PAA, lote: T05121-436). Los grupos activos restantes se bloquearon por incubación con SFB al 3% (Gibco BRL, desactivado por calor, #06Q6116K) en PBS, antes de aplicar los sueros en diluciones de 6 x 1:10 en PBS, al que se había adicionado SFB al 2%. Los anticuerpos inducidos se detectaron por sus regiones constantes con un conjugado de IgG antihumano de conejo, M-HRP (Zymed). La tinción se realizó según los métodos convencionales. Se midió la extinción a 492 nm con 620 nm como referencia. La cuantificación se realizó por comparación con sueros inmunes estándar, que contienen una cantidad de anticuerpo estandarizada, comparable a un título de anticuerpo de 9000.

65

Purificación por afinidad

Se utilizó un sistema ÄKTA (Amersham Pharmacia Biotech). A 1 ml de suero, se adicionó el tampón eluyente PBS 1:10, la solución resultante se diluyó con NaCl 200 mM y se aplicó a una columna XK10/2 con 1,0 ml de un gel de afinidad de sefarosa 17-1A o rEpCAM (Amersham Pharmacia Biotech), con el fin de purificar específicamente la reacción inmune total o el antígeno de destino.

Las proteínas contaminantes se quitaron por medio de una etapa de lavado con PBS + NaCl 200 mM. Los anticuerpos ligados se eluyeron con glicina 100 mM, pH 2,9, y se neutralizaron inmediatamente con NaHCO₃ 0,5 M. El efluente se observó en línea a λ 215 y λ 280 nm. A continuación, las fracciones eluidas se sometieron a un análisis posterior por HPLC para determinar la relación de IgG/IgM, la pureza y la concentración.

Teniendo en cuenta todas las vacunaciones, no se observaron reacciones secundarias algunas. En dicho estudio de inmunización, la vacunación con formulaciones de IgG2a distintas dio lugar en todos los casos a una fuerte reacción de inmunización del tipo IgG, que era específica para el antígeno. Con la excepción de la formulación de 17.1A desglicosilado, que dio lugar a una respuesta inmune más baja, la inmunogenicidad de todas demás formulaciones era casi la misma. Los títulos inmunes aumentaron de valores por debajo del límite de detección hasta 300 μ g/ml de suero, lo cual corresponde a una tasa de IgG inducida de casi un 1%. La inmunogenicidad de todos los anticuerpos de IgG glicosilados utilizados se encontraba casi en el mismo intervalo, independientemente de su especificidad.

También independientemente del grupo de inmunización, todos los animales vacunados con IgG2a formaban una respuesta inmune del tipo IgG, reconociendo el EpCAM [el anticuerpo] a un título de antígeno específico para la inmunización comprendido entre un 30 y un 40%. Por tanto, la vacunación con anticuerpos de IgG2a condujo a una reactividad cruzada del suero inmune con EpCAM. La desglicosilación del antígeno inmunizante redujo ambos niveles de IgG inducidos de forma significativa, tanto el [nivel] dirigido contra el antígeno inmunizante como el dirigido contra EpCAM.

La desglicosilación cambió las propiedades inmunógenas del anticuerpo claramente. Los títulos de inmunoglobulina tanto contra el antígeno inmunizante como contra el antígeno de destino estaban reducidos.

La comparación entre el antígeno de inmunización 17-1A original, que procede del hibridoma y el rHE2 de células CHO expresado de forma recombinante no demostró diferencias inmunológicas algunas. Ambas formulaciones presentaban cinéticas idénticas durante la formación de la respuesta inmune específica contra el antígeno inmunizante y el antígeno de destino. Los títulos de IgG e IgM formados eran similares.

Ejemplo 11: Expresión de un anticuerpo inmunogénico híbrido

El anticuerpo recombinante IgG2a Le-Y es un anticuerpo híbrido de IgG2a para la vacunación de primates. Combina la región antiidiotípica hipervariable que imita ("mimicks") Lewis-Y (Le-Y) y las regiones constantes del IgG2a de ratón de alta inmunogenicidad.

La terapia inmune con anticuerpos recombinantes de IgG2a Le-Y refuerza la inmunogenicidad del anticuerpo original IGN301 producido por una célula de hibridoma. Induce una fuerte respuesta inmune contra las células tumorales epiteliales en las que Le-Y y/o EpCAM se encuentra sobreexpresado o presentado. Dicha respuesta inmune da lugar a una lisis de las células tumorales mediante una activación del complemento o impide la formación de metástasis mediadas por células.

Los constructos molecular-biológicos del anticuerpo recombinante IgG2a Le-Y se incorporaron en el vector policistrónico.

El anticuerpo recombinante IgG2a Le-Y se expresó de forma transitoria en células HEK293, y a continuación se realizó la co-precipitación con fosfato cálcico en un sistema Micro Spin en presencia de SFB. Tras la purificación del producto en una columna de afinidad anti-Le-Y y cualificación del producto de expresión, se formuló el anticuerpo recombinante IgG2a Le-Y sobre Al(OH)₃ y se utilizó como vacuna en estudios de inmunización con monos Rhesus, administrando cuatro dosis de 500 μ g.

Se ha podido observar una alta inmunogenicidad en comparación con la vacuna original IGN301. La respuesta inmune inducida se analizó mediante un ELISA, detectándose una especificidad del antígeno de inmunización para Le-Y y EpCAM.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Anticuerpo antiidiotípico inmunógeno, que comprende por lo menos dos epítopes distintos procedentes de antígenos asociados a tumores, procediendo un epítotope del grupo constituido por péptidos o proteínas y un epítotope del grupo constituido por carbohidratos, reconociendo el anticuerpo el idiotipo de un anticuerpo contra un antígeno asociado a tumores.
- 10 2. Anticuerpo según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende por lo menos un epítotope de un antígeno seleccionado de entre el grupo constituido por péptidos o proteínas, en particular EpCAM, NCAM, CEA y péptidos de células T, carbohidratos, en particular Lewis Y, sialil-Tn, Globo H, y glicolípidos, en particular GD2, GD3 y GM2.
- 15 3. Anticuerpo según una de las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado porque presenta por lo menos dos epítopes de EpCAM.
- 20 4. Anticuerpo según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque está conjugado con un péptido, un glicopéptido, un carbohidrato, un lípido o un ácido nucleico.
- 25 5. Anticuerpo según la reivindicación 4, caracterizado porque el péptido, el glicopéptido, el carbohidrato, el lípido o el ácido nucleico representa un epítotope de un antígeno asociado a tumores.
- 30 6. Anticuerpo según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque presenta por lo menos un epítotope de EpCAM y por lo menos un epítotope de Lewis Y.
- 35 7. Anticuerpo según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque presenta por lo menos un epítotope de EpCAM y por lo menos un epítotope de sialil-Tn.
- 40 8. Anticuerpo según una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque es un anticuerpo humano, humanizado, quimérico o murino.
- 45 9. Anticuerpo según una de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque es un anticuerpo recombinante.
- 50 10. Anticuerpo según una de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque es un derivado de un anticuerpo seleccionado de entre el grupo constituido por fragmentos, conjugados u homólogos de anticuerpos.
- 55 11. Anticuerpo según una de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque el antígeno del idiotipo se selecciona de entre el grupo constituido por péptidos o proteínas, en particular EpCAM, NCAM, CEA y péptidos de células T.
- 60 12. Anticuerpo según una de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado porque el antígeno del idiotipo se selecciona de entre el grupo constituido por carbohidratos, en particular Lewis Y, sialil-Tn, Globo H, y glicolípidos, en particular GD2, GD3 y GM2.
- 65 13. Preparación farmacéutica, que contiene un anticuerpo inmunógeno según una de las reivindicaciones 1 a 12.
14. Agente diagnóstico, que contiene un anticuerpo inmunógeno según una de las reivindicaciones 1 a 12.
15. Formulación de vacuna, que contiene un anticuerpo inmunógeno según una de las reivindicaciones 1 a 12.
16. Formulación de vacuna según la reivindicación 15, caracterizada porque el anticuerpo está contenido en una cantidad inmunógena comprendida entre 0,10 µg y 10 mg.
17. Formulación de vacuna según una de las reivindicaciones 15 ó 16, caracterizada porque contiene por lo menos un adyuvante de vacuna.
18. Procedimiento para la preparación de un anticuerpo inmunógeno según una de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende las etapas siguientes:
 - a) proporcionar un anticuerpo con el idiotipo de un antígeno asociado a tumores; y
 - b) acoplar por lo menos un epítotope de un antígeno asociado a tumores o su imitación al anticuerpo.
19. Procedimiento para la preparación de un anticuerpo inmunógeno según una de las reivindicaciones 1 a 12 que comprende las etapas siguientes:
 - a) proporcionar un ácido nucleico que codifica para un anticuerpo con el idiotipo de un antígeno asociado a tumores; y
 - b) recombinar el ácido nucleico con un ácido nucleico, que codifica para un epítotope de un antígeno asociado a tumores o su imitación.

20. Procedimiento para la preparación de un anticuerpo inmunógeno según la reivindicación 1, caracterizado porque un epítoto de un antígeno asociado a tumores o su imitación se conjuga con el anticuerpo como portador.
- 5 21. Procedimiento según la reivindicación 20, caracterizado porque el antígeno se ha seleccionado de entre el grupo constituido por péptidos o proteínas, en particular EpCAM, NCAM, CEA y péptidos de células T, carbohidratos, en particular Lewis Y, sialil-Tn, Globo H, y glicolípidos, en particular GD2, GD3 y GM2.
- 10 22. Procedimiento según la reivindicación 20 ó 21, caracterizado porque un ácido nucleico que codifica para un epítoto de un antígeno de péptido o proteína se conjuga con el anticuerpo.
23. Procedimiento según una de las reivindicaciones 20 a 22, caracterizado porque el anticuerpo comprende por lo menos un epítoto adicional de un antígeno asociado a tumores.

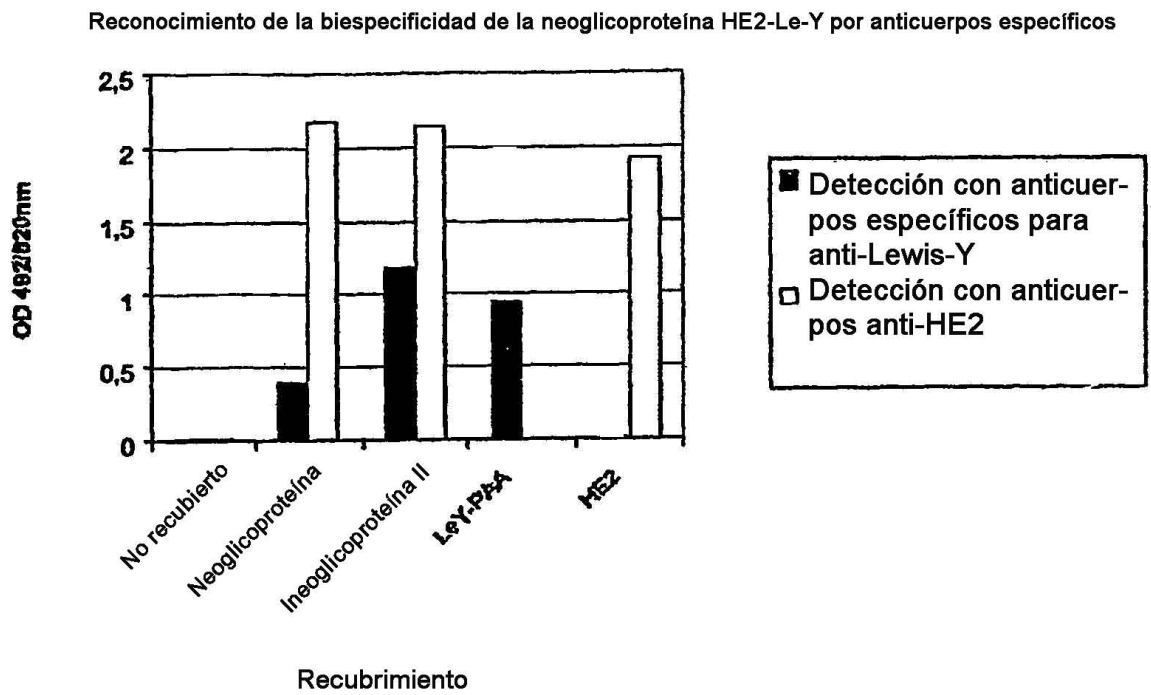


FIG. 1

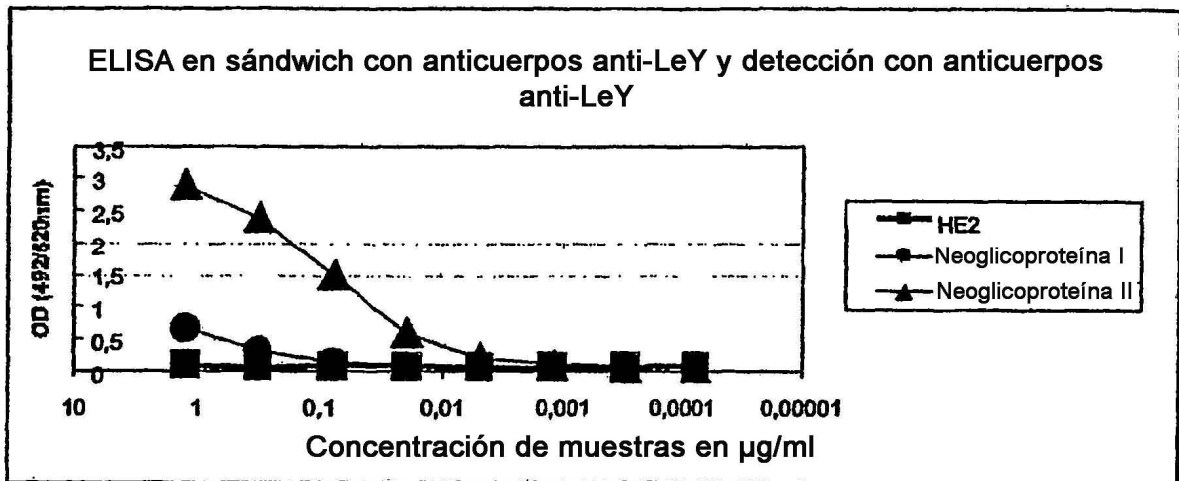
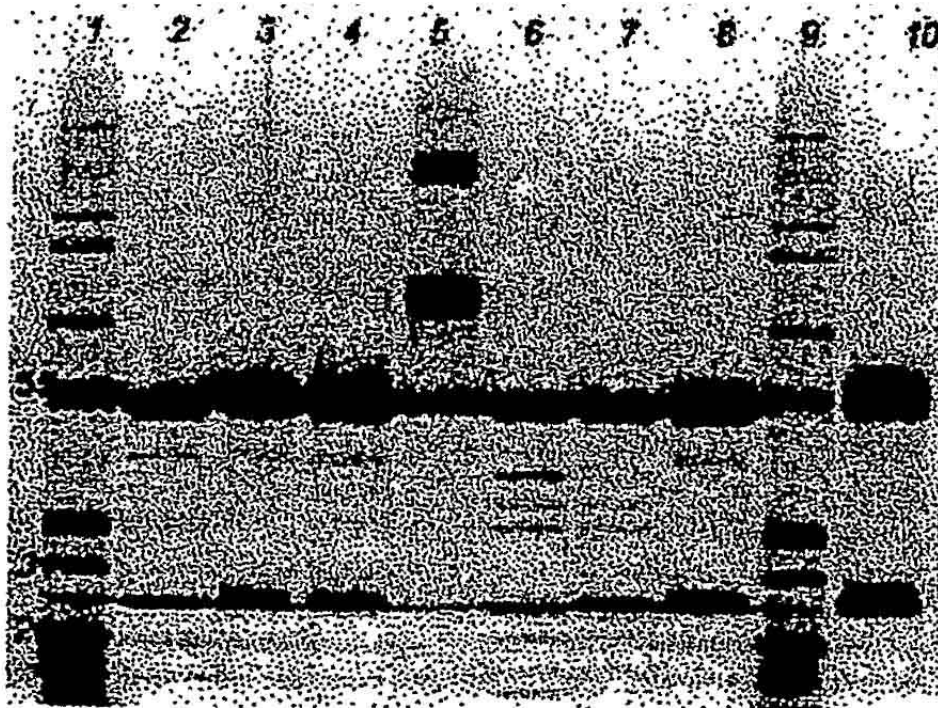


FIG. 2



Pista

1 Estándar

2 HE2

3 Neoglicoproteína I

4 Neoglicoproteína I

5 LeY-BSA

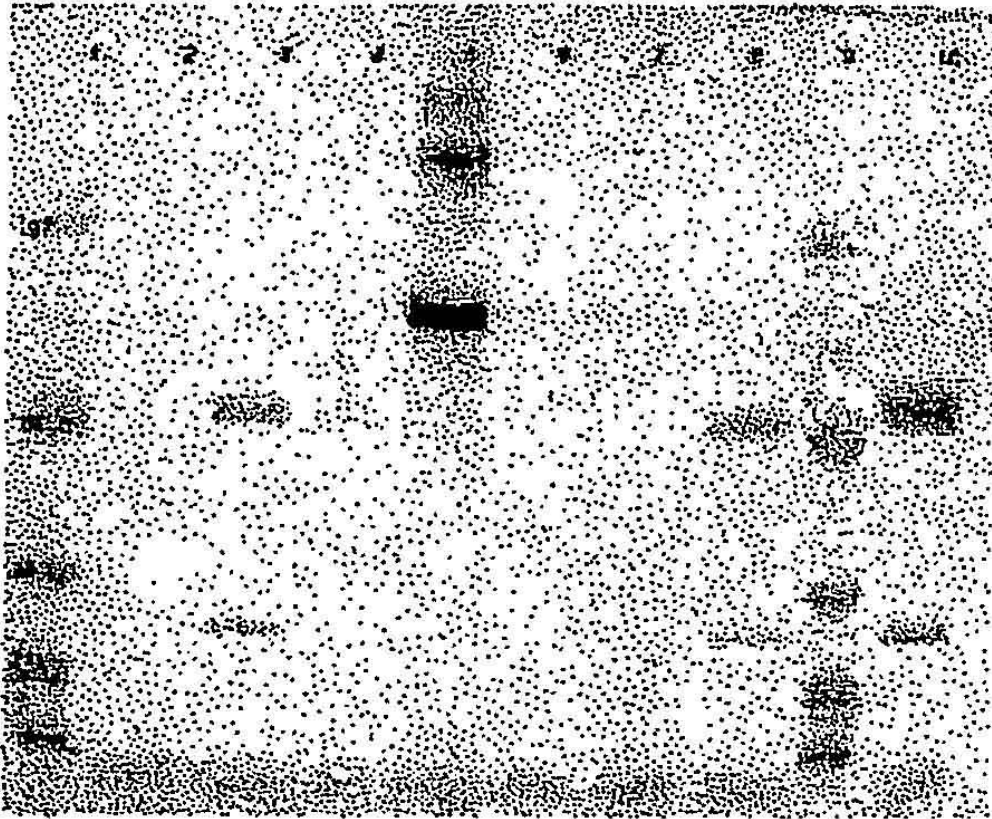
8 Neoglicoproteína I

9 Estándar

10 Neoglicoproteína II

Los números juntos al estándar corresponden a los pesos moleculares in kDa

FIG. 3



Pista

1 Estándar

2 HE2

3 Neoglicoproteína I

4 Neoglicoproteína I

5 LeY-BSA

8 Neoglicoproteína I

9 Estándar

10 Neoglicoproteína II

Los números juntos al estándar corresponden a los pesos moleculares in kDa

FIG. 4

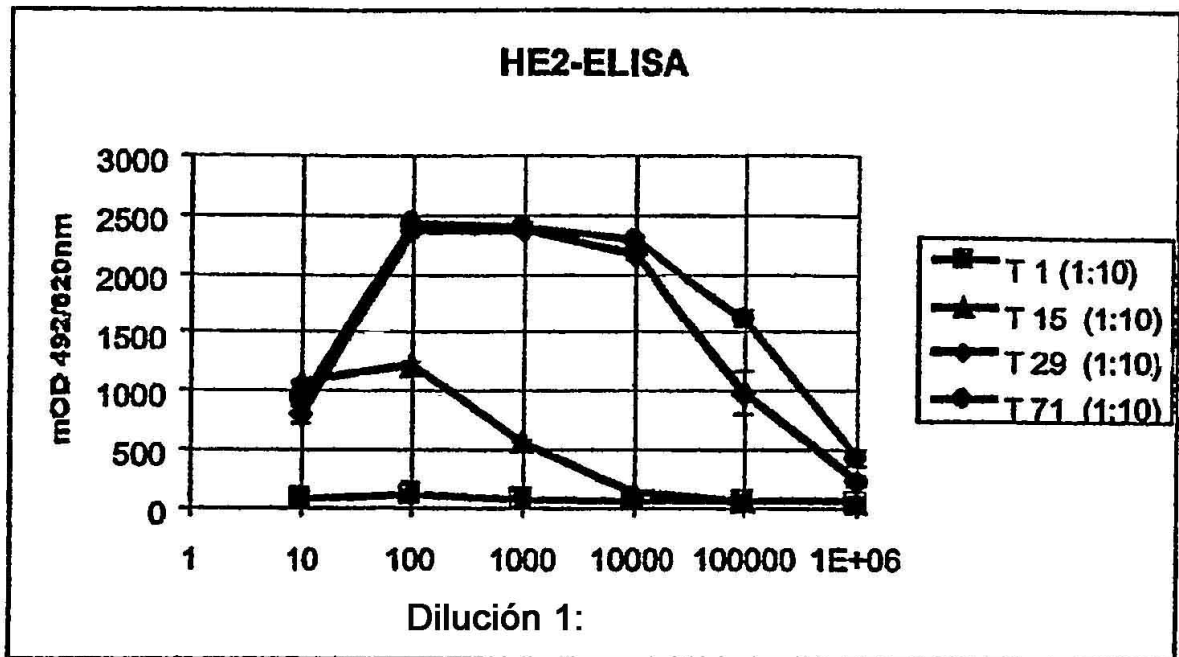


FIG. 5

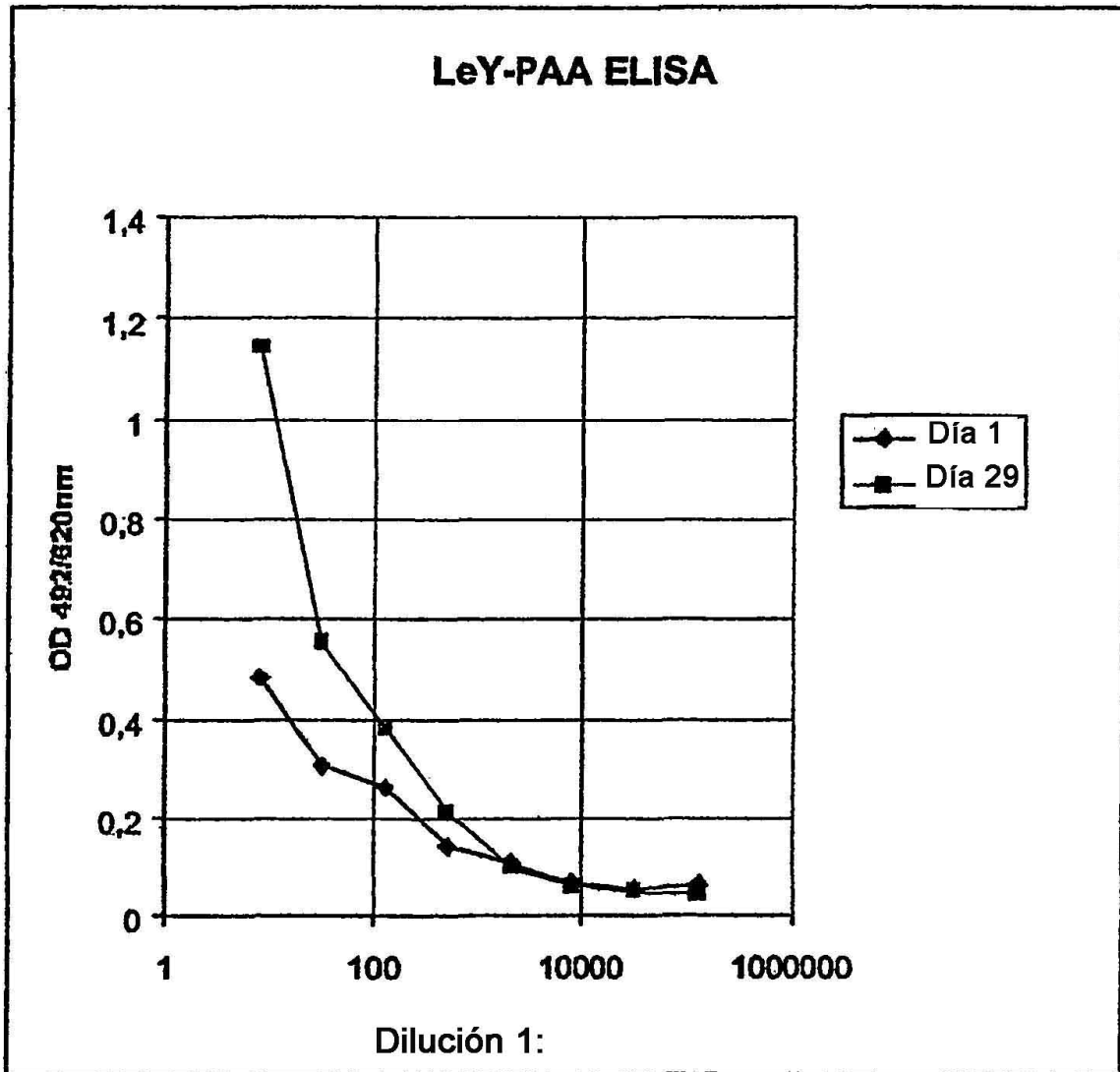


FIG. 6

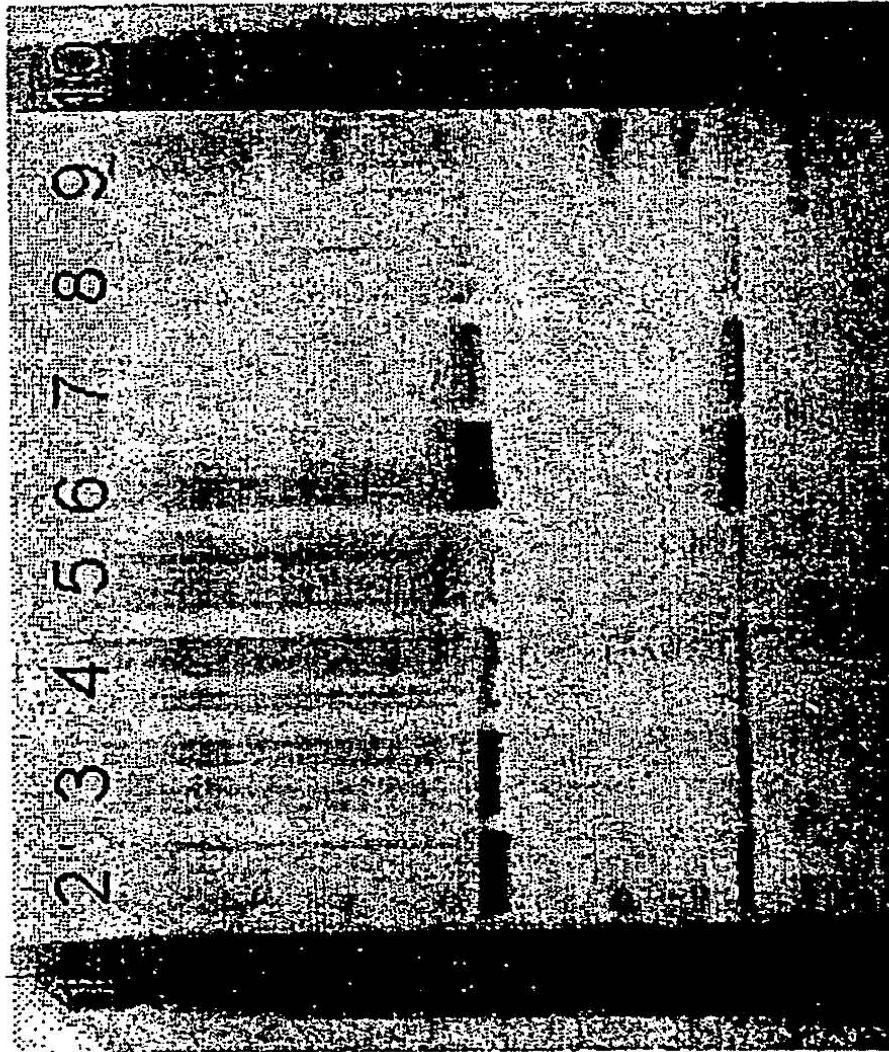


Fig. 7

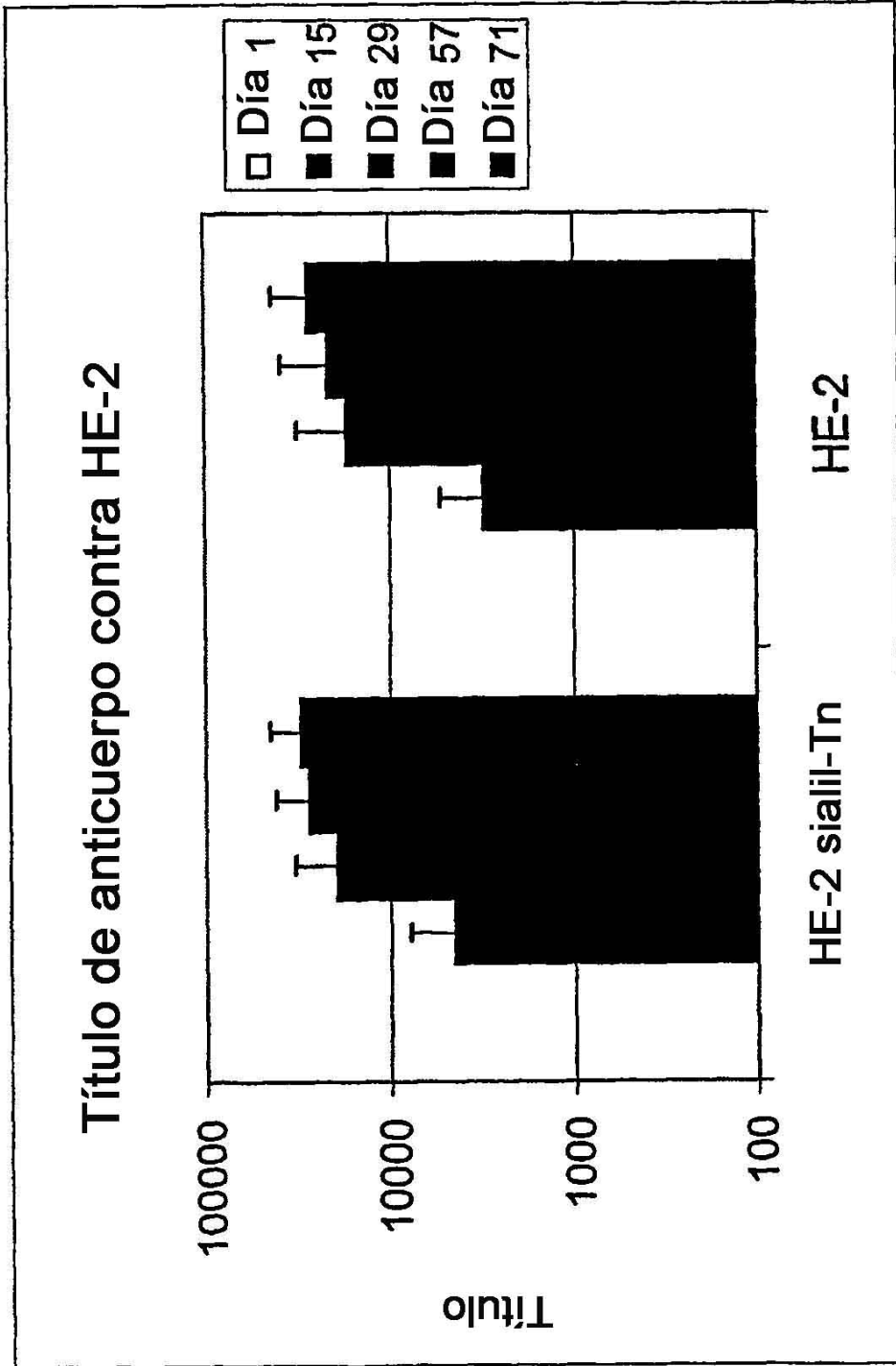


Fig. 8

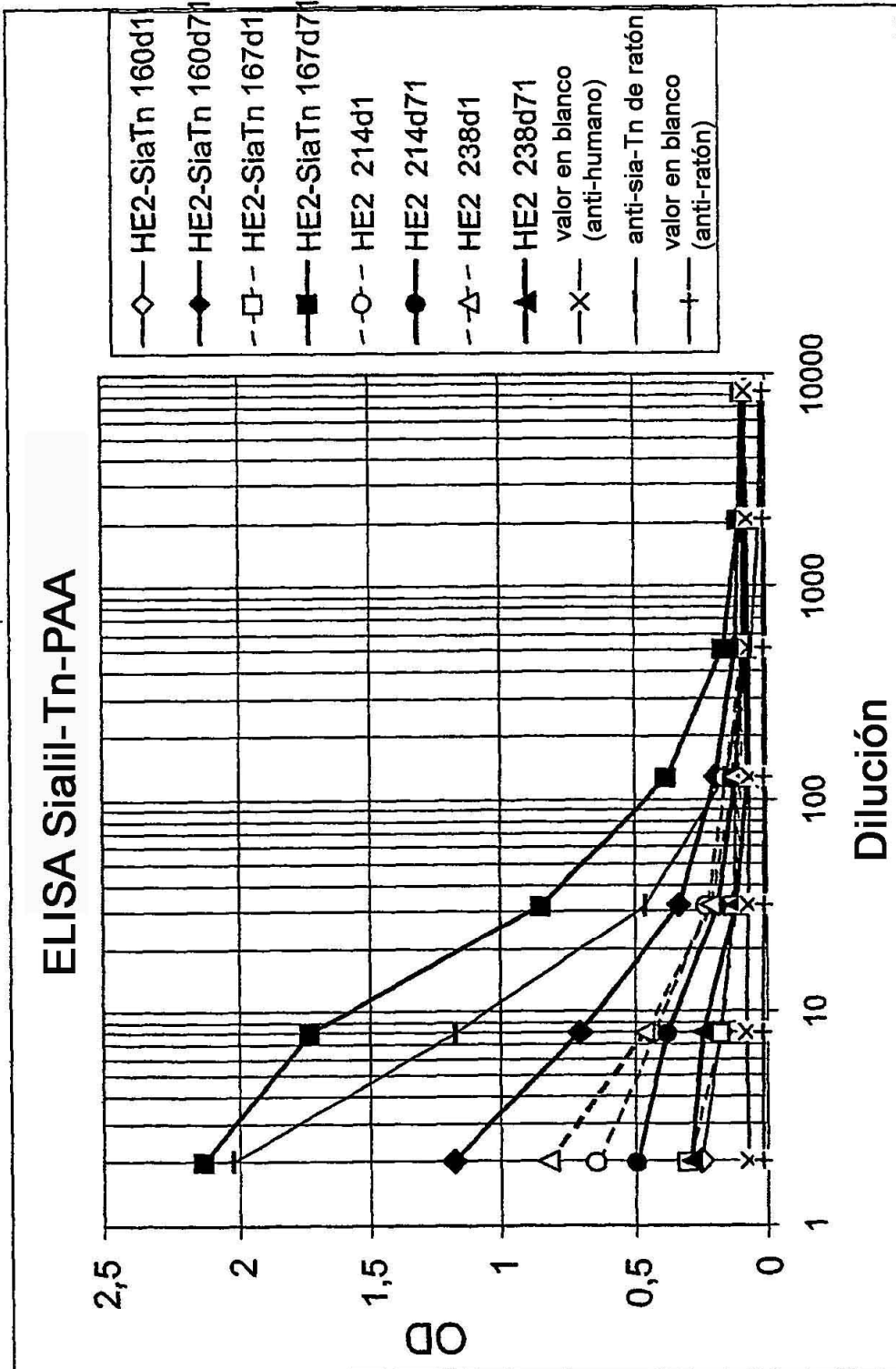


Fig. 9

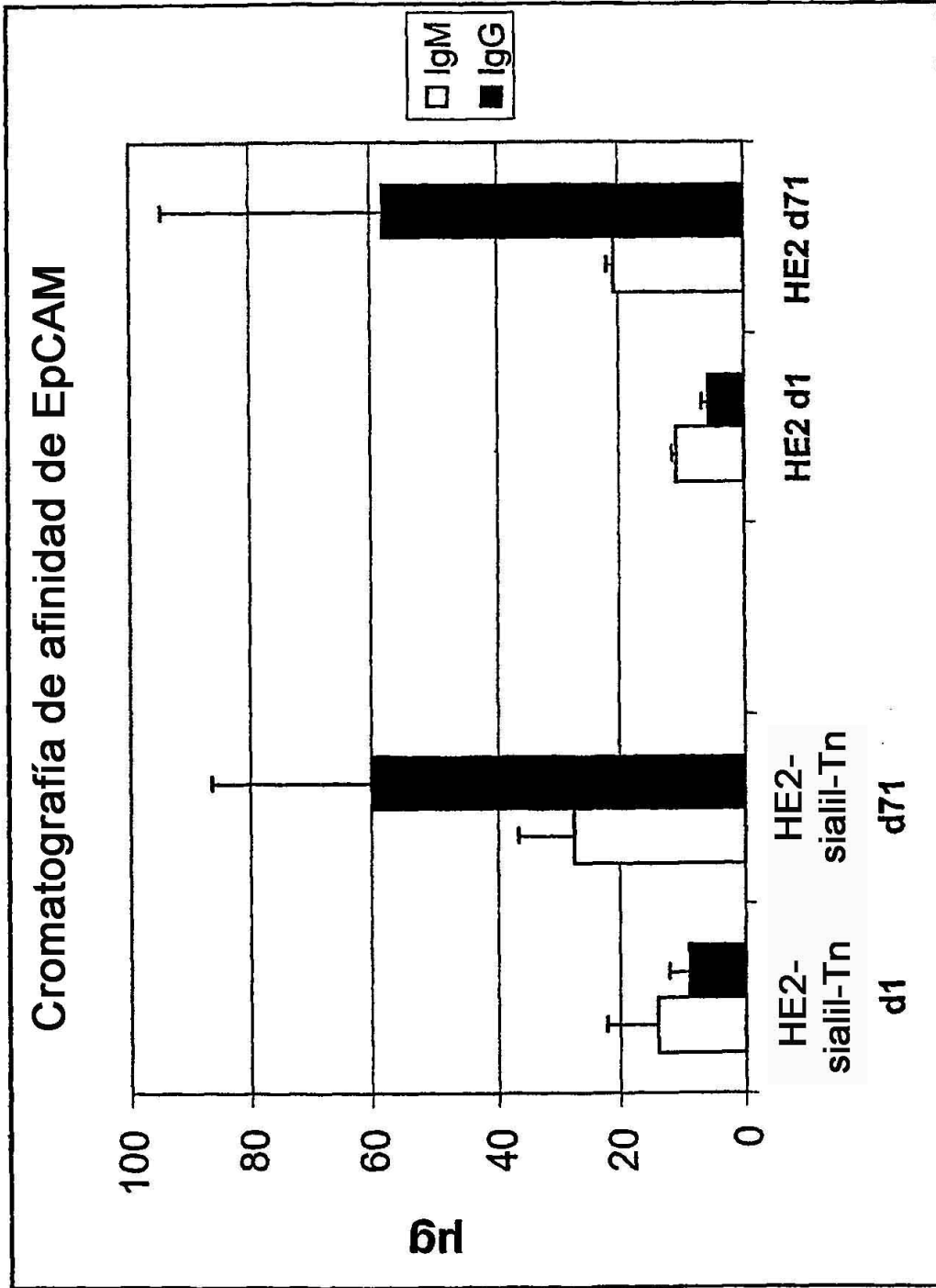


Fig. 10