

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 204**

51 Int. Cl.:

C07K 16/46 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.02.2004 E 04714520 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.12.2014 EP 1599504**

54 Título: **Anticuerpo modificado**

30 Prioridad:

25.02.2003 US 450134 P
25.02.2004 US 786907

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.03.2015

73 Titular/es:

VACCIBODY AS (100.0%)
GAUSTADALLEEN 21
N-0349 OSLO, NO

72 Inventor/es:

BOGEN, BJARNE;
FREDRIKSEN, AGNETE, BRUNSVIK y
SANDLIE, INGER

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 531 204 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

Anticuerpo modificado

Referencias

5 La presente solicitud reivindica prioridad respecto de la solicitud provisional de los EE.UU. N° 60/450134, presentada el 25 de febrero de 2003.

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere al uso terapéutico de ácidos nucleicos que codifican moléculas humanas recombinantes basadas en anticuerpos denominadas Vaccicuerpos, que son capaces de desencadenar tanto una respuesta inmune de linfocitos T como de linfocitos B. Más particularmente, los Vaccicuerpos codificados inducen por sí mismos dichas respuestas inmunes fuertes por lo que los adyuvantes no se requieren necesariamente. La presente invención también hace posible un procedimiento para el tratamiento, por ejemplo, del mieloma múltiple por medio de dichas vacunas de ácidos nucleicos que codifican dichos Vaccicuerpos.

Antecedentes de la invención

15 El mieloma múltiple (MM) es un cáncer de médula ósea en el que un solo clon de célula plasmática se vuelve maligno y produce inmunoglobulina (Ig) monoclonal. Los pacientes de MM tienen muy mal pronóstico. A pesar de que pueden alcanzarse tasas de respuesta altas y una supervivencia aumentada usando una alta dosis de quimioterapia seguida del trasplante autólogo o alogénico de células madre, la mayor parte de los pacientes recaen y pocos, o ninguno, se curan.

20 Las células de mieloma producen Ig monoclonales que son únicas para cada tumor y, por lo tanto, para cada paciente individual. La Ig está compuesta de dos cadenas pesadas (H) y dos ligeras (L) idénticas. Las cadenas L y H tienen regiones variables (V) altamente diversificadas, V_L y V_H . V_L y V_H forman conjuntamente el Fv (fragmento variable) que contiene determinantes antigénicos únicos denominados idiotopos (Id). Los idiotopos constituyen colectivamente el idiotipo del Fv (de la Ig *in casu*). La inducción de una respuesta inmune contra el idiotipo, denominada vacunación-Id es una estrategia prometedora en el tratamiento de los linfomas de linfocitos B y el MM (Bendandi, Gocke y col. 1999) (Tao y Levy 1993) (Huang, Wu y col. 2004) (Hakim, Levy y col. 1996) (King, Spellerberg y col. 1998) (Biragyn, Tani y col. 1999; Biragyn, Ruffini y col. 2002), y tanto los anticuerpos anti-idiotípicos (Sirishna y Eisen 1971; Hough, Eady y col. 1976) como los linfocitos T específicos de Id (Lauritzsen, Weiss y col. 1994) pueden ser importantes. Sin embargo, un Id es un auto-Ag débil en su contexto original (como parte de una Ig). Por lo tanto, para fines de vacunación, es importante potenciar la inmunogenicidad del Id.

30 Los linfocitos T cooperadores (linfocitos T $CD4^+$) reconocen a su antígeno (Ag) después de que este se haya procesado a través del atrapamiento de proteínas extrañas mediante las CPA, la rotura proteolítica en fragmentos peptídicos que se cargan en moléculas del MHC de clase II y se transportan a la superficie de las CPA donde se presenta el complejo péptido-MHC a los receptores de los linfocitos T (TCR) de los linfocitos T $CD4^+$. Los linfocitos T $CD4^+$ activados estimulan a los linfocitos T citotóxicos (linfocitos T $CD8^+$) y a los linfocitos B con la correspondiente especificidad de Ag, iniciando una amplia respuesta contra el Ag original. Un problema importante que concierne a la vacunación Id de los pacientes de MM es que los linfocitos T $CD4^+$ específicos de Id en estos pacientes, como se extrapola de los experimentos en ratones [18], probablemente son tolerantes a los determinantes de la región V del Id en la proteína de mieloma altamente abundante. Los pacientes de MM que se han sometido a un trasplante autólogo de células madre (TACM) pueden estar en una fase ventajosa para la vacunación Id por los dos siguientes motivos: 1) el alivio de la tolerancia de los linfocitos T a los Id de la proteína de mieloma y 2) desarrollo de nuevos linfocitos T que pueden responder a la vacunación Id.

45 El direccionamiento de los epítomos de los linfocitos T a las moléculas de superficie en las CPA con Troyacuerpos (Lunde, Munthe y col. 1999), que están equipados con un epítomo de linfocito T incorporado en un bucle de un dominio constante de la Ig, da como resultado la estimulación aumentada de los linfocitos T mediante un factor de 100-100000 (Lunde, Rasmussen y col. 2001). Sin embargo, los Troyacuerpos no incluyen el Ag en su conformación nativa, tal como Fv, y, por lo tanto, se restringen a la inducción de respuestas de linfocitos T. Por lo tanto, para inducir una respuesta anti-Id de linfocitos B y Ac anti-Id, es necesario incluir el Fv completo del componente M del paciente. Con respecto a la inducción de una respuesta anti-Id de linfocitos T, una inclusión del Fv completo aumentará en gran medida la posibilidad de incluir secuencias idiotípicas que se unan a las moléculas de HLA del paciente, lo cual es un requisito para la activación de linfocitos T específicos de Id.

50 Ha habido varios enfoques para rendir idiotipos más inmunogénicos. La vacunación con proteínas con inmunoglobulinas (Ig) Id^+ completas fusionadas con factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (Tao y Levy 1993), o ligando CD40 (Huang, Wu y col. 2004) potencia el nivel de anticuerpos anti-Id y da como resultado la protección contra el linfoma de linfocitos B en ratones. Sin embargo, scFv-GM-CSF solamente fue eficaz cuando se inyectó como proteína y no como vacuna de ADN (Hakim, Levy y col. 1996). Por otra parte, la vacunación con ADN empleando scFv fusionado con IL-1 β indujo inmunidad tumoral (Hakim, Levy y col. 1996). En otro enfoque, se fusionó genéticamente scFv con el fragmento C de la toxina tetánica y se suministró como una vacuna de

ADN mediante inyección intramuscular (i.m.). Esta estrategia ha dado como resultado niveles aumentados de anticuerpos anti-Id, las respuestas CD4⁺ específicas de Id y la protección contra linfoma y mielomas en ratones. Se desconoce el mecanismo de la actividad adyuvante del fragmento C del toxoide tetánico (King, Spellerberg y col. 1998). En un enfoque similar, se ha fusionado el scFV con quimiocinas como MCP3, IP10 mDF2 β (Biragyn, Tani y col. 1999; Biragyn, Ruffini y col. 2002) y se ha usado tanto como vacuna de ADN como de proteínas (Biragyn, Tani y col. 1999). En varios de estos estudios, los epítomos extraños de linfocitos T que corresponden al fragmento C del TT o secuencias de fusión únicas podrían haber contribuido a las respuestas. Se han observado unas respuestas anti-Id y una protección del tumor mayores. Se desconoce el mecanismo de acción del scFv-quimiocina. Una posibilidad es que el resto de la quimiocina dirija el Fv a los receptores de quimiocina en las CPA para el suministro potenciado de scFV. Como alternativa, las quimiocinas atraen CPA al sitio de inyección. Sin embargo, tanto las estrategias de fusión del Fragmento C como las de quimiocina se basan en la unión monovalente a sus moléculas diana (King, Spellerberg y col. 1998; Biragyn, Tani y col. 1999). Esto es de interés debido a que se ha mostrado que la reticulación es importante para la estimulación óptima de los linfocitos T, por ejemplo, para los Troyacuerpos (Lunde, Munthe y col. 1999).

Con estas consideraciones en mente, los inventores han diseñado un nuevo tipo de moléculas similares a anticuerpos recombinantes denominadas Vaccicuerpos, una molécula divalente que comprende una bisagra flexible, sin unión al FcR y que contiene el Ag en su conformación nativa, con el fin de inducir tanto respuestas fuertes de Ac de Id como de linfocitos T específicos. Los Vaccicuerpos son macromoléculas grandes y complejas, pero, sorprendentemente, las células fueron capaces de producir y exportar moléculas intactas.

"Vaccibodies: future vaccines for B cell lymphoma and myeloma?" por Brunsvik A y col. es un póster publicado el 5 de Febrero en 2003 en Banff. El póster desvela un estudio inmunológico de la inmunogenicidad de las moléculas derivadas de anticuerpos denominadas "vaccicuerpos" que portan scFV (Id) de la proteína de mieloma M315.

Sumario de la invención

La presente invención se basa en la construcción de un nuevo tipo de moléculas similares a anticuerpos recombinantes humanos útiles en el tratamiento de, por ejemplo, mieloma múltiple. Estas moléculas, denominadas Vaccicuerpos, se unen a CPA y son capaces de desencadenar tanto una respuesta inmune de linfocitos T como de linfocitos B. Además, los Vaccicuerpos se unen divalentemente a las CPA para promover una iniciación más eficaz de una respuesta inmune. De este modo, un fin principal de la presente invención es inducir una respuesta inmune fuerte para hacer a los adyuvantes redundantes. Los Vaccicuerpos comprenden un dímero de una unidad monomérica que consiste en una unidad de direccionamiento con especificidad para una molécula de superficie en una CPA, conectada a través de una región bisagra y un dominio Cy3 a una unidad antigénica del extremo COOH- terminal; estando este último, por ejemplo, originado en linfoma de linfocitos B o mieloma (Fig 1), aunque cualquier origen es posible debido al sistema de clonación en casete del vector de expresión. Dicha molécula es capaz de inducir una respuesta inmune contra el mieloma múltiple, pero debería ser viable la extensión a una estrategia general de vacunación para cualquier polipéptido. También se desvela una secuencia de ADN que codifica esta molécula basada en un anticuerpo recombinante, los vectores de expresión que comprenden estas secuencias de ADN, las líneas celulares que comprenden dichos vectores de expresión, el tratamiento de mamíferos preferentemente mediante inmunización por medio del Vaccicuerpo de ADN, Vaccicuerpo de ARN, o Vaccicuerpo de proteína, y finalmente los agentes farmacéuticos y un kit que comprende dichas moléculas.

En su más amplio alcance, la presente invención se refiere por lo tanto a un ácido nucleico en la forma de un plásmido de ADN desnudo para el uso como un agente terapéutico, en el que el ácido nucleico codifica una unidad monomérica de una molécula basada en un anticuerpo recombinante dimérica que comprende dos de dichas unidades monoméricas conectadas a través de un motivo de dimerización que consiste en una región bisagra derivada de Ig y un dominio Cy3, comprendiendo dicho motivo de dimerización una región bisagra y un dominio Cy3 de cada unidad monomérica, en la que cada una de las regiones bisagra contribuye a la dimerización por medio de puentes disulfuro con la otra región bisagra y cada dominio Cy3 contribuye a la dimerización por medio de interacciones hidrófobas con el otro dominio Cy3, y en la que cada una de dichas unidades monoméricas consiste en una unidad de direccionamiento con especificidad para una molécula de superficie en una célula presentadora de antígenos, conectada a través de dicha región bisagra y dicho dominio Cy3 a una unidad antigénica del COOH- terminal, y en la que cada una de dichas unidades monoméricas carece de un dominio CH2.

En un aspecto similar, la presente invención se refiere al uso del ácido nucleico anteriormente definido para la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer o una enfermedad infecciosa.

Descripción de las figuras

Fig 1 La estructura del Vaccicuerpo. Los dos scFv en blanco dirigen el Vaccicuerpo a las moléculas de superficie en la CPA. Estas pueden reemplazarse por otras moléculas de direccionamiento, por ejemplo, receptores de quimiocinas. La bisagra proporciona la flexibilidad de la orientación relativa de los dos scFv del NH₂-terminal y puentes disulfuro de los monómeros. Los dominios C_H3 (gris claro) actúan como un espaciador entre los scFV NH₂-y COOH terminales y participan en la dimerización a través de interacciones hidrófobas. Estos motivos de dimerización pueden reemplazarse por otros dominios de dimerización o multimerización. Los dos scFv que se muestran en gris oscuro son el resto antigénico del Vaccicuerpo. Estos scFv se derivan del componente M,

alojando, por lo tanto, secuencias idiotípicas (negro). Los scFv antigénicos pueden reemplazarse por cualquier polipéptido derivado de una fuente antigénica, confiriendo estrategias de vacunación hacia cualquier antígeno.

5 **Fig 2** Principio. El Vaccicuerpo se dirige a moléculas de superficie en la APC, el complejo se capta mediante endocitosis mediada por receptor, se procesa y se presentan los péptidos Id a linfocitos T CD4⁺ en MCH de clase II. Simultáneamente, la Id puede estimular a los linfocitos B con un BCR anti-Id. Estos linfocitos B también actuarán como CPA para los linfocitos T CD4⁺. Por lo tanto, los linfocitos T y B cooperarán para potenciar la respuesta, como se indica. Los linfocitos B anti-Id se desarrollarán como consecuencia hasta células plasmáticas que producen anticuerpos anti-Id.

10 **Fig 3** Los Vaccicuerpos específicos de las MHC de clase II se unen a los esplenocitos CD19⁺ (blanco). Los Vaccicuerpos específicos de NIP (controles negativos - gris), no se unen a los esplenocitos. La unión se detectó con estreptavidina-PE y 9A8bio que es un AcMo de rata que se une al Fv antigénico originado por M315 (V λ 1/2).

15 **Fig 4** Los Vaccicuerpos control específicos de NIP muestran unión al hapteno NIP. Los sobrenadantes de células transfectadas con genes que codifican Vaccicuerpos específicos de NIP se añadieron a placas de ELISA recubiertas con NIP-BSA. Se usó 9A8 bio (antiV λ 1/2) como el Ac secundario. Se obtuvieron resultados similares con un Ac anti-Id biotinilado (Ac2.1-4 bio).

20 **Fig 5** Los Vaccicuerpos muestran unión a DNP, por lo tanto el scFv antigénico se pliega correctamente. El Ac M315, del cual se deriva el scFv antigénico, es específico para el hapteno DNP. Se recubrieron placas de ELISA con DNP-BSA. Se añadieron los sobrenadantes de células transfectadas con genes que codifican diversos Vaccicuerpos. Se detectó la unión con 9A8 bio.

25 **Fig 6** CPA pulsadas con cantidades tituladas de Vaccicuerpos específicos de MHC de clase II estimularon linfocitos T polarizados específicos para M315 de los ratones SCID transgénicos para el TCR >100-1000 veces mejores que los Vaccicuerpos control específicos de NIP no dirigidos. No hubo diferencias significativas entre los Vaccicuerpos con una secuencia larga antes del primer puente disulfuro de la bisagra (h1+h4) en comparación con los Vaccicuerpos con una secuencia bisagra corta por encima del primer puente disulfuro (h4).

30 **Fig 7** Los Vaccicuerpos específicos de MHC de clase II inducen una fuerte respuesta de Ac anti-Id en ausencia de adyuvante. A los ratones BALB/c se les inyectaron Vaccicuerpos, 20 μ g y 200 μ g, respectivamente. Se tomaron muestras de sangre en distintos instantes para el análisis del suero. Se muestran datos de los sueros tomados en el día 28, 14 días después de la segunda inmunización de Vaccicuerpos. Los Vaccicuerpos específicos de MHC de clase II indujeron una fuerte respuesta de Ac anti-Id. Los Vaccicuerpos con la bisagra más larga (h1+h4) indujeron la respuesta de Ac anti-Id más fuerte alcanzando 3-4 μ g/ml en suero.

35 **Fig 8** Construcción de dos variantes de bisagra-Cy3 derivadas de hlgG3 mediante PCR. Los moldes fueron de pUC19 que contenía regiones constantes hlgG3 modificadas en las que el exón h4 estaba conectado con el dominio CH3 (A) o el exón h1 estaba conectado con el exón h4 conectado adicionalmente con el dominio CH3 (B) (Olafsen T y col, 1998). Los cebadores insertaron los sitios de las enzimas de restricción de HindIII (5') y Sfil (3'). La bisagra y el dominio CH3 se conectan mediante un triplicado de los aminoácidos GlyGlySerSer.

40 **Fig 9** Construcción de los segmentos bisagra-Cy3 derivados de mlgG2b. La bisagra y los genes CH3 se amplificaron de un vector pUC18 que contenía la región constante de mlgG2b mediante PCR con dos cebadores que codifican un sitio de enzimas de restricción de HindIII (5') y uno de Sfil (3'). Los dos fragmentos de PCR se unieron mediante PCR de SOEing. En esta reacción, la bisagra y el dominio C_H3 se conectaron mediante un triplicado de los aminoácidos Gly-Gly-Gly-Ser-Ser.

45 **Fig 10** Construcción del scFv derivado de la proteína de mieloma M315. Los ADNc que funcionaron como un molde en las reacciones de PCR se derivaron de ARNm extraído de células MOPC315.4. Las regiones V se unieron mediante PCR de SOEing dando como resultado un scFv. En esta reacción, las regiones V se conectaron mediante un triplicado de GlyGlyGlySerSer. Además, los fragmentos génicos que codifican el scFv completo se flanquearon por sitios de enzimas de restricción de Sfil y Sall.

Fig 11 Unión de los segmentos bisagra-Cy3 y el scFv de M315 mediante PCR de SOEing. Esta reacción introdujo el sitio 5' de Sfil de la región codificante del scFv antigénico.

50 **Fig 12** Subclonación de la bisagra-Cy3-M315 scFv en pUC19. Se incluyeron tres motivos de dimerización distintos, derivados de mlgG2b o IgG3. En todos los casos, estos consistían en la bisagra seguida de un triplicado de GlyGlyGlySerSer y CH3. Se derivaron dos bisagras distintas de hlgG3, una que consistía en h1 unido a h4, y otra que consistía en h4, solamente.

Fig 13 Eliminación de dos sitios de enzimas de restricción inconvenientes de BamHI dentro del fragmento génico codificante del scFv antigénico mediante PCR QuickChange.

55 **Fig 14** Introducción de codón de terminación, un sitio de enzimas de restricción de Sfill y BamHI corriente abajo de la región codificante mediante PCR QuickChange.

Fig 15 Subclonación en el casete C del vector de expresión pLNOH₂ en HindIII-BamHI.

Fig 16 Clonación de las regiones V específicas de NIP y MHCII. Las regiones V se amplificaron y se unieron mediante PCR de soeing dando como resultado los scFv. El engarce que conectaba las regiones V consistía en un triplicado de GlyGlyGlyGlySer. Los fragmentos génicos que codifican los scFv completos están flanqueados por sitios BsmI/MunI y BsiWI. Los engarces y los sitios de restricción se introdujeron en las reacciones de PCR.

Fig 17 Subclonación en el vector de expresión pLNOH₂ en BsmI/MunI y BsiWI.

Fig 18 La construcción de Vaccicuerpos final.

Fig 19 Figura detallada de la construcción génica del Vaccicuerpo. La unidad de direccionamiento se inserta entre los sitios de restricción de enzimas de BsmI/MfeI y BsiWI (El casete V del vector pLNOH₂). La bisagra-Cy3-Fv³¹⁵ se inserta entre los sitios de HindIII y BamHI en el casete C de pLNOH₂. La bisagra y el dominio Cy3, así como los dos scFv se conectan con los engarces (G₄S)₃ (cajas negras). El Cy3 y el Fv³¹⁵ se conectan a través de un engarce GLSGL. El Fv³¹⁵ se inserta entre dos sitios de enzimas de restricción de Sfil no idénticos. La unidad antigénica y el motivo de dimerización pueden ser de cualquier origen apropiado. También, pueden emplearse fragmentos de Cy3 funcionales, o una secuencia que sea sustancialmente homóloga a la secuencia de Cy3 o los fragmentos Cy3.

Fig 20 Los vaccicuerpos se secretan como moléculas funcionales. Se ensayaron dos Vaccicuerpos distintos, uno que porta el hapteno específico de Fv^{NIP} como unidad de direccionamiento, mientras que el otro porta el Fv^{I-E} específico de MHC de clase II como unidad de direccionamiento. Ambos portaban el scFv de M315 (Fv³¹⁵) como unidad antigénica. a) SDS-PAGE del 10 % de Vaccicuerpos marcados metabólicamente, inmunoprecipitados de sobrenadantes de cultivo de transfectantes con o sin la reducción de los enlaces disulfuro mediante mercaptoetanol (ME). b) La especificidad de DNP de los Vaccicuerpos se midió mediante ELISA. Los sobrenadantes de las células NSO transfectadas con los Vaccicuerpos se añadieron a placas de ELISA recubiertas con DNP-BSA. Los datos se ilustran como la media de los triplicados y las barras de error indican la ETM. c) La especificidad de NIP se midió mediante ELISA. Las placas de ELISA se revistieron con NIP-BSA. Tanto los Vaccicuerpos de b) como los de c) se detectaron bien con 9A8-bio (α V λ 1/2) o Ac2.1-4 (específicos para Id de Fv³¹⁵) Fv³¹⁵ porta V λ 2 y Fv^{NIP} porta V λ 1 y ambos se unirán al AcMo 9A8. Solamente Fv³¹⁵ se unirá al AcMo Ac2.1-4. Fv^{I-E} porta V κ y se unirá a cualquiera de los AcMo.

Fig 21 Producción de Vaccicuerpos mediante inyección intramuscular de plásmidos de ADN desnudo seguida de electroporación *in vivo*. Las muestras de suero se recogieron en el día 14. Se inyectaron plásmidos de Vaccicuerpos en ratones BALB/c positivos para I-E^d, a los que se electroporó posteriormente. a) El nivel de Vaccicuerpos en suero se midió mediante ELISA, con DNP-BSA y 9A8bio tal como se ha descrito anteriormente. b) El mismo día 14 se analizaron las muestras de suero para los anticuerpos anti-Id mediante ELISA. Las placas de microtitulación se recubrieron con M315 y 187-bio (Ac κ anti-ratón) se usó para la detección. c) Comparación de niveles detectables de Vaccicuerpos y anticuerpos anti-Id. La cantidad de Vaccicuerpos detectables en suero se muestra en el eje y, y el nivel de los Ac ald se muestra en el eje x.

Fig 22 Prevención tumoral. Se inmunizó a los ratones BALB/c una vez con plásmidos desnudos que codifican Vaccicuerpos específicos de MHC de clase II (Fv^{I-E} Fv³¹⁵), Vaccicuerpos específicos de NIP no dirigidos (Fv^{NIP} Fv³¹⁵) o NaCl al 0,9 % mediante inmunización i.m. en los dos músculos cuádriceps (25 μ g/músculo) seguido de electroporación *in vivo*. Se estimularon con 1,6 x 10⁵ células MOPC315.4 de mieloma s.c y se registró el prendimiento de tumor el primer día. Un tumor de >3 mm se puntuó como un prendimiento de tumor positivo.

Fig 23 Inducción de inmunidad protectora contra el plasmacitoma MOPC315.4. Se inmunizó a los ratones BALB/c una vez con plásmidos desnudos que codifican Vaccicuerpos específicos de MHC de clase II (Fv^{I-E} Fv³¹⁵), Vaccicuerpos específicos de NIP no dirigidos (Fv^{NIP} Fv³¹⁵) o NaCl al 0,9 % mediante inmunización i.m. en los dos músculos cuádriceps (25 μ g/músculo) seguido de electroporación *in vivo*. Se estimularon con 1,6 x 10⁵ células MOPC315.4 de mieloma s.c y se comparó su supervivencia.

Fig 24 Nivel de proteína de mieloma M315 en el suero de los ratones en el a) día 18 y b) día 24 después de la estimulación con MOPC315.4 en ratones BALB/c vacunados i.m. con plásmidos de Vaccicuerpos seguida de electroporación *in vivo*. Se midió la M315 en las muestras de suero mediante ELISA revestidos con AcMo anti-Id (Ac2.1-4) y se detectó mediante AcMo anti-IgA (8D2) biotinilado.

Fig 25 Los vaccicuerpos de quimiocinas se secretan como moléculas funcionales. MIP-1 α Fv³¹⁵ tiene la proteína inflamatoria de macrófagos 1 α de ratón como la unidad de direccionamiento y el scFv de M315 (Fv³¹⁵) como la unidad antigénica. La funcionalidad de MIP-1 α en formato de Vaccicuerpo se midió en un ELISA. Los sobrenadantes de células 293E transfectadas con Vaccicuerpos se añadieron a placas de ELISA recubiertas con AcMo MIP-1 α anti-ratón (R&D Systems) y se detectaron mediante 9A8-bio (α V λ 1/2).

Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en la construcción de moléculas basadas en anticuerpos recombinantes humanos, denominadas Vaccicuerpos, que comprenden dímeros de una unidad monomérica que consiste en un fragmento variable monocatenario (scFv) de inmunoglobulinas (Ig) con especificidad para moléculas de superficie en las células presentadoras de Ag (CPA), conectada a través de una región bisagra y un dominio C γ 3 a un scFv del extremo COOH-terminal, derivándose este último de una proteína de mieloma (Fig 1), aunque cualquier origen es posible debido al sistema de clonación en casete del vector de expresión. La región bisagra y los dominios C γ 3 (dominio C carboxiterminal de Ig) contribuyen a la dimerización del Vaccicuerpo a través de puentes disulfuro en la bisagra e interacciones hidrófobas fuertes entre los dos dominios C γ 3. Por lo tanto, el producto dímérico incluirá dos scFv preferentemente idénticos con especificidad de unión por las mismas moléculas de superficie en la CPA (Fig 2), permitiendo la unión bivalente. La unión bivalente (es decir, reticulación) es importante para desencadenar la activación de la célula diana y de ese modo la iniciación de una respuesta inmune. También, una unión bivalente proporciona fuerza de unión aumentada debido a efectos de avidéz, y aumenta la probabilidad de endocitosis mediada por receptor en la CPA y posterior degradación dentro de la CPA. Además, la unión bivalente puede proporcionar una señalización intracelular mediada por receptor importante a la CPA. Los scFv con una función de direccionamiento se derivan bien de hibridomas de linfocitos B que expresan anticuerpos monoclonales (AcMo) que se unen a moléculas de superficie en las CPA, o pueden derivarse de cualquier fuente, por ejemplo, fagotecas de exposición. El uso de scFv de hibridomas de linfocitos B como el resto de direccionamiento abre una gran gama de posibles dianas debido a la gran colección de hibridomas de linfocitos B que producen los AcMo que se unen a distintas moléculas de superficie en la CPA. Además, se puede elegir la naturaleza de la señal dada a la célula diana empleando AcMo agonistas o antagonistas. Los conocimientos crecientes de las interacciones Ac-Ag permitirán la mejora de la afinidad de unión de dichos AcMo a su Ag mediante reemplazamientos de aminoácidos en los sitios de unión. Esto puede realizarse mediante mutagénesis dirigida ordinaria. Para fines de vacunación, un enfoque atractivo es dirigir los Vaccicuerpos a moléculas de superficie que se expresan exclusivamente en subconjuntos de células dendríticas (CD) que son capaces de iniciar una respuesta inmune específica fuerte hacia los propios Id de los pacientes. Los ejemplos de dichas moléculas diana de superficie en las CPA son HLA, por ejemplo, HLA-DP, CD14, CD40, receptores de tipo Toll, por ejemplo, receptor de tipo Toll 2 o receptores de quimiocinas. El Vaccicuerpo puede dirigirse a dichas moléculas de superficie por medio de unidades de direccionamiento que comprenden, por ejemplo, regiones de unión a anticuerpos con especificidad para, por ejemplo, HLA, HLA-DP, CD14, CD40, receptores de tipo Toll, ligandos, por ejemplo, ligando CD40 soluble; ligandos naturales como quimiocinas, por ejemplo, RANTES o MIP-1 α ; o antígenos bacterianos como, por ejemplo, flagelina o una parte de la misma. Debido a que la unidad de direccionamiento se inserta en el casete V del vector de expresión pLNOH₂ (Norderhaug, Olafsen y col. 1997), se intercambia fácilmente con otras unidades (Fig 17).

Los motivos cruciales de dimerización de los Vaccicuerpos que se han construido en los ejemplos hasta el momento, incluyen regiones bisagra y un dominio de inmunoglobulina (por ejemplo, dominio C γ 3), por ejemplo, el dominio C carboxiterminal (dominio C γ 3), o una secuencia que sea sustancialmente homóloga a dicho dominio C. La bisagra se deriva de la Ig y contribuye a la dimerización a través de la formación de un(os) enlace(s) intercatenario(s) covalente(s), por ejemplo, puente(s) disulfuro. Además, esta actúa como un espaciador flexible entre los dominios permitiendo que los dos scFv con tareas de direccionamiento se unan simultáneamente con dos moléculas diana que se expresan con distancias variables (Fig 2). Los dominios de inmunoglobulina contribuyen a la homodimerización a través de interacciones no covalentes, por ejemplo, interacciones hidrófobas. En una realización preferente el dominio C γ 3 se deriva de IgG. Estos motivos de dimerización pueden intercambiarse con otros restos de multimerización (por ejemplo, otros isotipos/subclases de Ig).

El scFv C-terminal derivado de la Ig monoclonal producida por células de mieloma o linfoma, también denominado el componente M de mieloma/linfoma, puede intercambiarse genéticamente con otros scFv o cualquier antígeno debido a que el vector se ha construido con un sitio de restricción de Sfi I (Fig 8). Por lo tanto, el scFv derivado de la proteína del modelo de mieloma que se usa en el presente ejemplo se intercambia fácilmente con el scFv del componente M de cualquier paciente con linfoma de linfocitos B o mieloma múltiple. Por lo tanto, este vector permitirá la construcción rápida de vacunas específicas para pacientes individuales. La estructura dímica del Vaccicuerpo no solamente permite la reticulación, sino que debe permitir también la doble carga del Fv del paciente a la CPA por cada molécula de Vaccicuerpo en comparación con un scFv solo combinado con un solo resto diana. Además, existe una sola duplicación en el Vaccicuerpo de los determinantes idiotípicos serológicos, que podría ser importante para la respuesta anti-Id del linfocito B. Los Vaccicuerpos carecen de un dominio C γ 2 y por lo tanto de todos los sitios de unión a FcR, y deben por lo tanto captarse exclusivamente a través de sus moléculas diana, tales como las MHC de clase II en el ejemplo que se usa y no mediante cualquiera de los FcR, asegurando que una gran proporción de la vacuna llegará a las células diana a las que se destina. Esto es al contrario que en las vacunas que ejercen su efecto a través de la unión a un FcR en una célula diana (Ravetch y Bolland 2001).

Los Vaccicuerpos pueden extenderse a un tratamiento médico general a través de la inducción de una respuesta inmune contra cualquier polipéptido de cualquier origen. Es posible reemplazar el scFv idiotípico con otras secuencias antigénicas de suficiente longitud para permitir el plegamiento adecuado del polipéptido. Esta secuencia puede derivarse de otras proteínas de cáncer o agentes infecciosos. Los ejemplos de dichas secuencias de cáncer son la telomerasa, más específicamente hTERT. Los agentes infecciosos pueden ser de origen bacteriano, por ejemplo, antígenos de tuberculosis, o de origen viral, más específicamente secuencias derivadas del VIH como, por ejemplo, las

secuencias derivadas de gp120. La inserción de dichas secuencias en un formato de Vaccicuerpo, podría conducir también a la activación de ambas ramas de la respuesta inmune, de modo similar a los Vaccicuerpos que se describen en el presente documento, que comprenden al scFv idiotípico. La inmunización por medio de Vaccicuerpos de proteína, Vaccicuerpos de ADN, o Vaccicuerpos de ARN, estas últimas dos ejecutadas, por ejemplo, mediante inyección intramuscular seguida por electroporación (Véase los Ejemplos), son todas procedimientos viables.

Los scFv en el extremo NH₂- terminal de los Vaccicuerpos dirigen a los Vaccicuerpos a las CPA a través de la unión a moléculas de superficie (Fig 2), y en el ejemplo que se muestra estos se unen a las MHC de clase II. Las MHC de clase II se expresan en todas las CPA profesionales, de modo que los Vaccicuerpos que se describen en el presente documento son capaces de dirigirse a linfocitos B, CD y macrófagos. El direccionamiento de los complejos Ag-Ac convencionales a las MHC de clase II induce la activación de linfocitos T CD4⁺ específicos (Snider y Segal 1987; Casten y Pierce 1988). Se ha mostrado anteriormente que el direccionamiento de los Troyacuerpos a las MHC de clase II potencia la presentación de Ag y la activación de linfocitos T *in vitro* así como *in vivo* (Lunde, Western y col. 2002). En la región antigénica de la molécula, los Vaccicuerpos de los ejemplos contienen los scFv de la proteína de mieloma M315 derivada del plasmacitoma de BALB/c MOPC315.4. La cadena ligera λ²³¹⁵ de M315 aloja tres mutaciones somáticas definidas en el bucle CDR3 y funciona como un modelo idiotípico de epítipo de linfocito T en un sistema bien definido (Bogen, Malissen y col. 1986; Bogen y Lambris 1989).

Los Vaccicuerpos se han ensamblado genéticamente, y el ADN se ha transfectado en las células NSO, las células 293E y las células Cos-7. Los transfectantes producen y secretan las moléculas recombinantes de Vaccicuerpos. Los scFv de direccionamiento en un extremo de los Vaccicuerpos muestran unión a MHC de clase II (Fig 3). El scFv antigénico en el otro extremo del Vaccicuerpo se une a DNP (dinitrofenilo, la especificidad de M315) (Fig 5). Por lo tanto, tanto el scFv de direccionamiento como el antigénico retienen el mismo patrón de plegamiento que en su contexto original. Se tienen pruebas de que los Vaccicuerpos tienen la capacidad de inducir respuestas fuertes de linfocitos T a través de su unión a CPA y la presentación de los péptidos-Id en moléculas de clase II a linfocitos T CD4⁺ específicos de Id *in vitro* (Fig 6). Además, ya que estas tienen el Fv del componente M intacto, provocan anticuerpos anti-Id en cantidades significativas *in vivo* cuando se inyectan en ratones BALB/c sin adyuvantes (Fig 7).

Para determinar si los pacientes de MM tratados con TACM alcanzan la remisión con una concentración de proteína de mieloma en suero baja, debe realizarse un ELISA para la proteína de mieloma de cada paciente debido a que los ensayos rutinarios (electroforesis en gel de agarosa, combinada con inmunofijación) tienen solamente una sensibilidad de aproximadamente 0,2-1 mg/ml, que es demasiado insensible. Los datos de la cinética de los niveles de la proteína de mieloma en suero indicarán si y cuando se podría realizar mejor la vacunación Id después del TACM para evitar el problema de la tolerancia de los linfocitos T o de las emigrantes tímicas recién educadas. Para alcanzar esto, los ratones se inmunizan con ADN que codifica Vaccicuerpos específicos de un paciente mediante electroporación *in vivo* de las células musculares. Los sueros de los ratones inmunizados se absorben en Ig humana-Sepharose para eliminar los anticuerpos con reactividad cruzada y posteriormente eluirlos para obtener anticuerpos altamente específicos de Id purificados. Los ELISA de tipo sándwich para el mieloma de cada paciente se realizan del siguiente modo: Se revisten los pocillos con Ac anti-Id purificados de ratones. Se añade el suero del paciente *in casu*. La proteína de mieloma que se une a los anticuerpos anti-Id se detectará mediante el uso de Ac específicos para IgG o IgA humana. La sensibilidad de dichos ELISA de tipo sándwich es habitualmente < 1 ng/ml, que es > 10⁶ veces más sensible que los ensayos rutinarios. Además, para controlar el desarrollo de nuevos linfocitos T, se controlará el perfil de los linfocitos T en sangre mediante citometría de flujo con AcMo específicos de Vβ, en combinación con otros marcadores.

La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende las secuencias de ADN/ARN recombinante anteriormente descritas, o vectores de expresión de acuerdo con la invención. En los casos en donde sea apropiado, este agente farmacéutico comprende adicionalmente un transportador farmacéuticamente compatible. Los transportadores adecuados y la formulación de dichos agentes farmacéuticos son conocidos para una persona experta en la materia. Los transportadores adecuados son, por ejemplo, soluciones salinas de fosfato tamponado comunes, agua, emulsiones, por ejemplo, emulsiones de aceite en agua, agentes humectantes, soluciones estériles, etc. Los agentes farmacéuticos pueden administrarse por vía oral o parenteral. Los métodos de administración parenteral comprenden la administración tópica, intraarterial, intramuscular, subcutánea, intramedular, intratecal, intraventricular, intravenosa, intraperitoneal o intranasal. La dosis adecuada se determina por el médico tratante y depende de distintos factores, por ejemplo, la edad del paciente, sexo y peso, el tipo de administración, etc. Además, la presente invención proporciona una composición de vacunación contra el cáncer o enfermedades infecciosas que comprende una cantidad inmunológicamente eficaz del ácido nucleico que codifica la molécula de la invención o variantes degradadas de la misma, en la que dicha composición es capaz de desencadenar tanto una respuesta inmune de linfocitos T como de linfocitos B.

También se describe un procedimiento para preparar la molécula recombinante que comprende, transfectar el vector que comprende los ácidos nucleicos que se describen en el presente documento en una población celular; cultivar la población celular; recoger la proteína recombinante que se expresa de la población celular; y purificar la proteína expresada.

Las secuencias de nucleótidos anteriormente descritas pueden insertarse preferentemente en un vector adecuado para la terapia génica, por ejemplo, bajo el control de un promotor específico, e introducirse en las células. Para el fin de terapia génica, las secuencias de ADN/ARN para el uso de la invención pueden transportarse también a las células

diana en la forma de dispersiones coloidales. Estas comprenden, por ejemplo, liposomas o lipoplexos.

En una realización preferente de la presente invención se usa la construcción de ADN desnudo del Vaccicuerpo en un procedimiento en el que se inyecta por vía intramuscular en ratones, después de lo cual el sitio de inyección se somete a electroporación *in vivo*. Esta vacunación con ADN da como resultado la producción de la proteína del Vaccicuerpo que confiere inmunidad protectora para salvar la vida a la mayor parte de los ratones. Más específicamente, el ejemplo 4 demuestra que después de una sola inyección del plásmido del Vaccicuerpo en el cuádriceps y la electroporación, se detectó la proteína del Vaccicuerpo $F_V^{NIP} F_V^{315}$ en cantidades significativas en suero, mientras que no hubo $F_V^{IE} F_V^{315}$ detectable (Fig 21a). Además, el ejemplo 5 muestra la presencia de anticuerpos anti-Id en suero después de la inyección del Vaccicuerpo de ADN por vía intramuscular y electroporación. Tomados conjuntamente, los resultados demuestran un efecto formidable del direccionamiento a células positivas para MHC de clase II (I-E^d) para el desarrollo de una respuesta humoral fuerte. Además, el ejemplo 6 muestra que puede alcanzarse protección contra el mieloma mediante vacunación i.m de ADN seguida de electroporación y que la protección requiere el direccionamiento del scFv derivado del tumor a CPA. El ejemplo 7 demuestra que las quimiocinas son funcionales como unidades de direccionamiento en el formato de Vaccicuerpo.

15 Materiales y métodos

Ratones

Los BALB/cABom eran de Bomholtgaard (Ry, Dinamarca), los ratones transgénicos para el TCR específico de $\lambda 2^{315}$ sobre un fondo BALB/c (Bogen, Gleditsch y col. 1992) se criaron en instalaciones de animalario propias.

Líneas celulares

20 El hibridoma 14-4-4S (Ozato, Mayer y col., 1980) y las células NSO se adquirieron en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Manassas, VA), células 293E, una variante de la línea celular 293 que expresa la proteína del virus de Epstein-Barr 1 EBNA1.

Construcción de Vaccicuerpos

25 El gen para la bisagra hlgG3 y el dominio C_{H3} se clonó del vector pUC19 que contenía la bisagra combinada genéticamente con los genes Cy3 de la subclase hlgG3 (Olafsen, Rasmussen y col. 1998). Se hicieron dos variantes de la longitud de la bisagra en los Vaccicuerpos humanizados; uno solamente con el exón h4 conectado con el dominio C_{H3} (sh) y uno con ambos exones h1 y h4 conectados al dominio C_{H3} (1h) (Fig 8). Los cebadores incluyeron sitios de enzimas de restricción (subrayados): 5'h4: tag caa gct tgg cca gcg cag gga g; 3'CH3: cag gcc acc gag gcc ttt acc cgg aga cag gga. El exón h1 se introdujo directamente corriente arriba del exón h4 mediante PCR QuickChange usando estos cebadores Qh1a: ctccaatcttctctgca **gag ctc aaa acc cca ctt ggt gac aca act cac aca** gag ccc aaa tct tgt gac ac y Qh1b: gt gtc aca aga ttt ggg ctc **tgt gtg agt tgt gtc acc aag tgg ggt ttt gag ctc** tgacagagagaagattgggag.

30 Los Vaccicuerpos murinos tienen una bisagra y un dominio C_{H3} completo de la subclase mlgG2b recogido mediante PCR de un vector pUC18 que contenía los genes Cy2b (Fig 9). Los cebadores incluyeron sitios de enzimas de restricción (subrayados) o engarces (negrita) con las secuencias complementarias (cursiva): 5' bisagra: tagcagcgtt ca gag ccc agc ggg ccc; 3' bisagra: **5'tcc acc tcc gct tcc acc gcc** tgg gca ttt gtg aca ctc ctg g; 5'C_{H3}: **gga agc gga ggt gga agt gga** ggg cta gtc aga gct cca ca; 3'C_{H3}: cag gcc acc gag gcc acc cgg aga ccg gga gat g. La bisagra y el dominio C_{H3} se unieron después mediante PCR de SOEing.

40 Los genes de la región Antigenica V se clonaron del plasmacitoma MOPC315.4 (Eisen, Simms y col. 1968). Las regiones V se obtuvieron extrayendo ARNm de la línea celular MOPC315.4 con Dyna-beads magnéticas recubiertas de oligo (dT) (Dyna). Se hicieron después ADNc de la primera hebra y se usaron como moldes para la amplificación por PCR de los genes de la región V usando cebadores específicos que hibridan con los extremos exactos de las secuencias de la región V de M315. Los cebadores incluyeron sitios de enzimas de restricción (subrayados) o engarces (negrita) con las secuencias complementarias (cursiva). Las secuencias de los cebadores fueron: 5'^{V_H}: ggc ctc ggt ggc ctg gat gta cag ctt cag gag tca; 3'^{V_H}: **gcc aga gcc acc tcc gcc_aga tcc gcc tcc acc** tga gga gac tgt gag agt ggt; 5'^{V_L}: **ggc gga ggt ggc tCt ggc_ggt ggc gga tcg** cag gct gtt gtg act cag gaa; 3'^{V_L}: gacg tgcac tag gac agt gac ctt ggt tcc. Después se unieron los genes V_H y V_L mediante PCR de soeing a un formato de scFv (Fig 10).

50 Las secuencias complementarias en los marcadores 3' de la región codificante de Cy3 y 5' de la región codificante del V_H de M315 permitieron que el scFv de M315 se combinara con los tres genes bisagra-C_{H3} distintos mediante PCR de SOEing (Fig 11). Los productos de esta reacción se digirieron después con HindIII y Sall y se subclonaron en un vector pUC19 (Fig 12). Se eliminaron dos sitios de enzimas de restricción de BamHI dentro de las regiones V de M315 mediante PCR QuickChange (Fig 13) usando los cebadores: BamHI V_L1: at gcc aac tgg ata caa gaa aaa cc; BamHI V_L2: gg ttt ttc ttg tat cca gtt ggc at, BamHI V_H1: tgg aac tgg ata cgg cag ttt cc y BamHI V_H2: gg aaa ctg ccg tat cca gtt cca. Una PCR QuickChange a continuación usando los cebadores: 3'^{V_L} terminación1: gtc act gtc cta tga ggcctgcagggcc ggatcc gtcgactctag y 3'^{V_L} terminación2: cta gag tgc ac ggatcc ggcctgcaggcc tca tag gac agt gac, se realizó después para introducir un codón de terminación (negrita), un sitio de enzimas de restricción de Sfill y BamHI (subrayado) corriente abajo de la región codificante (Fig 14).

La construcción final se digiere después con HindIII y BamHI y se subclona en el vector de expresión pLNOH₂ (Fig 15) (Norderhaug, Olafsen y col. 1997).

Los genes de la región V que proporcionan especificidad para MHC de clase II se clonaron anteriormente del hibridoma 14-4-4S (Lunde, Western y col. 2002), que produce un anticuerpo específico para la cadena E α (determinante Ia.7) de la molécula MHC de clase II I-E (Ozato, Mayer y col., 1980). Los cebadores específicos que hibridaban con los extremos exactos de las secuencias de la región V con marcadores se diseñaron para incluir sitios de enzimas de restricción (subrayados) o secuencias de engarce (negrita) con las secuencias complementarias (cursiva). Las secuencias de los cebadores fueron: 5'^V_L: gac att caattg aca cag tct tct cct gct tcc; 3'^V_L: ***gcc aga gcc acc tcc gcc aga tcc gcc tcc acc*** ttt gat ttc cag ctt ggt gcc; 5'^V_H: ***ggc gga ggt ggc tct ggc ggt ggc gga tcg*** cag gtc cag ctg cag cag t; 3'^V_H: ga cgtacg actcacc tga gga gac ggt gac tga gg. Los genes de la región V que conferirían especificidad para el hapteno NIP (Neuberger 1983) se diseñaron con secuencias marcadoras similares excepto por el cebador 5'^V_L: 5'^V_L: ggtg tgcatcc cag gct gtt gtc act cag gaa; 3'^V_L: ***gcc aga gcc acc tcc gcc aga tcc gcc tcc acc*** tag gac agt cag ttt ggt acc t; 5'^V_H: ***ggc gga ggt ggc tct ggc ggt ggc gga tcg*** cag gtc caa ctg cag cag cc; 3'^V_H: ga cgtacg a ctc acc tga gga gac tgt gag agt ggt. Después se unieron tanto V_L como V_H mediante PCR de SOEing (Fig 16) y se subclonaron en el casete V del vector pLNOH₂ que contiene los genes bisagra-CH3-scFvM315 (Fig 17 y Fig 18). Del mismo modo, se aíslan otros genes V que confieren una especificidad deseada de hibridomas o fagos seleccionados de fagotecas de exposición. Estas se amplifican después por PCR usando cebadores diseñados del mismo modo que anteriormente y se subclonan después de la PCR de SOEing en el casete de direccionamiento (Fig. 17 y 18). Los genes V_H y VK reordenados que confieren especificidad para HLA-DP se amplificaron mediante PCR a partir del ADNc del hibridoma 22C1, que produce un anticuerpo con especificidad pan HLA-DP. Los genes V se reamplificaron con nuevos cebadores que contienen sitios para la clonación directa en los vectores de expresión pLNOK y pLNOH₂ (Norderhaug y Olafsen, 1997); 5'-V_L, ggtgt-gcattccgacattgtgctcacc; 3'-V_L, cgtacgttctactcacgtttattccagct; 5'-V_H, gtgcattccgaggtgcagctgcaggagtct; 3'-V_H, cgtacgact-cacctgaggagaccgtagc. Además, el scFv se generó mediante PCR de SOEing usando los siguientes cebadores:

25 5'^V_L g gtg tgcatcc cga cat tgt gct cac c
 3'^V_L: ***gcc aga gcc acc tcc gcc aga tcc gcc tcc acc gtt*** tta ttt cca ***gct***
 5'^V_H: ***ggc gga ggt ggc tct ggc ggt ggc gga tcg*** gag gtc cag ctg cag gag tct
 3'^V_H, cgtacg act cac ctg agg aga ccg tag c

30 En 3'^V_L y 5'^V_H las secuencias en negrita+cursiva son complementarias y antiparalelas, hibridando por lo tanto para generar el fragmento génico que codifica la región de engarce.

Las regiones V de anti-CD14 se clonan del hibridoma de ratón 3C10 (ATCC).

Los genes de quimiocinas se clonaron de macrófagos peritoneales estimulados con tioglicolato. Se inyectaron i.p 4 ml de tioglicolato al 2 % en ratones Balb/c. 3 días después se recogieron los macrófagos intraperitoneales y se extrajo el ARNm con Dynabeads magnéticas revestidas con oligo (dT). El ADNc de la primera hebra se hizo y se usó como molde para la amplificación mediante PCR de los genes de las quimiocinas (RANTES y MIP-1 α) usando cebadores específicos: 5'MIP-1 α : ggtg tgcatcc cgc gcc ata tgg agc tga cac, 3'MIP-1 α : ga cgtacg act cac ctg cat tca gtt cca ggt cag tg 5'RANTES: ggtg tgcatcc c gcc tca cca tat ggc tgc g 3'RANTES: ga cgtacg a ctc acc tga cat ctc caa ata gtt gat gta ttc. Los distintos genes de las unidades de direccionamiento se digirieron después con MunI y BsiWI o BsmI y BsiWI, respectivamente y se subclonaron en el casete V del vector pLNOH₂ que contiene los genes bisagra-CH3-scFvM315 (Fig 17 y Fig 18). El ligando CD40 se clona de linfocitos T que están activados con LPS durante 4 horas antes de que el ARNm se extraiga para la preparación del ADNc. El ADNc se usa como molde para una reacción de PCR con cebadores específicos para la secuencia del ligando CD40. Además, esta secuencia se reamplifica con cebadores diseñados para facilitar la subclonación en el casete de direccionamiento descrito anteriormente.

Producción y purificación de Vaccicuerpos

45 El vector pLNOH₂ que portaba los genes del Vaccicuerpo se transfectó en células NSO mediante electroporación, y los sobrenadantes de colonias individuales resistentes a 800 μ g/ml de G418 se analizaron para la secreción de Vaccicuerpos después de 2-3 semanas, usando ELISA. Se usó DNP-BSA como recubrimiento, y se usó V λ 1/2 (9A8-bio) de ratón anti-rata biotinilado para la detección. Los Vaccicuerpos específicos de NIP se exploraron adicionalmente en un ELISA usando NIP-BSA como revestimiento. Las células seleccionadas para la alta producción de Vaccicuerpos crecieron en frascos rotatorios (VWR) y se purificaron por afinidad del sobrenadante usando una columna hecha de DNP-lisina (Sigma) acoplada a Sepharose de flujo rápido. Los Vaccicuerpos se eluyeron con DNP-glicina 0,05 M (Sigma) y el flujo continuo se procesó en una columna de resina de intercambio iónico Dowex de Cl⁻ de 1x8 (Sigma). Los Vaccicuerpos eluidos se dializaron contra PBS/ Na₃N al 0,05 % y PBS estéril, antes de que la concentración de vaccicuerpos se calculara a partir de los valores de absorbancia a 280 nm.

55 Ac y citometría de flujo

Los anticuerpos y reactivos que se usaron para la citometría de flujo fueron 9A8 biotina, FGK.45 biotina, estreptavidina PerCP, anti-CD19 PE y anti-mIgG2a PE (BD Pharmingen). Las células de bazo de los BALB/c se tñieron doblemente con anti-CD19 PE y Vaccicuerpos. Los Vaccicuerpos unidos se detectaron mediante 9A8-bio y estreptavidina PerCP.

Se procesaron veinte mil células en un FACSCalibur (BD Biosciences, Mountain View, CA) y se analizaron usando el programa WinMDI.

Marcaje metabólico e inmunoprecipitación

5 Se marcaron 2×10^6 células durante 6 h a 37 °C en RPMI que carecía de metionina, cisteína (BioWhittaker) que contenía 100 μCi de ^{35}S -metionina, cisteína (Amersham). Los SN se recogieron e inmunoprecipitaron con V λ 1/2 (9A8) de rata anti-ratón en una rueda ENCENDIDA a 4 °C. Se incubaron 10 μl de Dynabeads revestidas con IgG de oveja anti-rata (Dynal AS, Oslo, Noruega) con el precipitado durante 1 hora en una rueda y las Dynabeads se recogieron con una gradilla concentradora de Partículas Magnéticas Dynal (Dynal CPM). Las esferas se lavaron tres veces en PBS helado con el 1 % NP40 y se resuspendieron en 10 μl de tampón de la muestra 1x. Las proteínas se eluyeron de las esferas mediante la incubación de las muestras a 95 °C durante 3 minutos. Los Vaccicuerpos se procesaron en un gel de SDS-PAGE del 10 %, con un gel concentrador del 5 %, a 40 mA durante 1 h, usando un aparato de electroforesis en gel miniprotean II de BIO RAD. Los geles se fijaron posteriormente en metanol al 30 % y ácido acético al 10 % durante 30 minutos antes de una incubación de 30 min con Amplify (Amersham), antes de secarse y exponerse a una película BIOMAX-MR (Eastman Kodak Company, Utah, EE.UU).

15 Ensayo de proliferación de linfocitos T

Los esplenocitos de BALB/c irradiados (2000 rad) BALB/c (5×10^5 células/pocillo) se usaron como una fuente de CPA. Se añadieron cantidades tituladas de distintos Vaccicuerpos específicos de MHC de CLASE II y NIP a los esplenocitos. Un péptido sintético 91-107 $\lambda 2^{315}$ se usó como un control positivo. Los ensayos se colocaron en cultivos de 150 μl en placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano y se incubaron durante 4 h a 37 °C (Lunde, Western y col. 2002). Los cultivos se lavaron después tres veces antes de la adición de 200 μl de células Th2 polarizadas específicas para $\lambda 2^{315}$ (2×10^4) derivadas de ratones SCID transgénicos para el TCR. Después de 48 h, los cultivos se pulsaron durante 16-24 h con 1 μCi de ^3H dThd. Se recogieron los cultivos y se midió el ^3H incorporado usando un contador de centelleo TopCount NXT (Packard, Meriden, CT).

Experimentos *in vivo*

25 A los ratones BALB/c se les inyectaron por vía subcutánea (s.c) 200 μg o 20 μg de proteínas de Vaccicuerpos purificadas en PBS en el día 0, 14 y 28. Se tomaron muestras de sangre en el día 14 y el 28 antes de la revacunación y después en el día 35, 42 y 49, antes de que se sacrificaran de acuerdo con el procedimiento de Punto Final Humanitario.

Medición de las respuestas a anticuerpos

30 Los Ac anti-idiotípicos contra M315 se midieron mediante ELISA. Los pocillos se revistieron con 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de M315. Los Ac Anti-Id en el suero se detectaron mediante un Ac de Vk anti-ratón biotinilado (187.1 bio), IgG1 bio anti-ratón o IgG2 bio anti-ratón (ambos de BD Pharmingen): El Ac2.1-4 (un AcMo anti-Id que se une a $\lambda 2^{315}$) se usó como patrón.

Vacunación

35 *Vacunación de proteínas:* A los ratones BALB/c se les inyectaron por vía subcutánea (s.c) en la región del flanco derecho 20 μg o 200 μg de Vaccicuerpos específicos purificados de clase II o NIP ($F_v^{I-E} F_v^{315}$, $F_v^{NIP} F_v^{315}$) en PBS en los días 0 y 14. Se inyectó PBS como control negativo. Se recogieron muestras de sangre de la vena de la pata en distintos instantes después de la última inmunización. Los anticuerpos anti-idiotípicos con especificidad con especificidad para F_v^{315} se midieron mediante ELISA. Los pocillos se recubrieron con 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de M315. Los Ac Anti-Id en el suero se detectaron mediante un AcMo k anti-ratón biotinilado (187.1 bio). El Ac2.1-4 (un AcMo anti-Id que se une a F_v^{315} (Kristoffersen, Hannestad y col. 1987)) se usó como patrón.

Vacunación con ADN y electroporación

45 Se adquirieron ratones Balb/c de cinco a diez semanas de edad de Bomholtgaard (Ry, Dinamarca). Se anestesió a los animales mediante inyección intraperitoneal con 9 g de Pentobarbital/ratón y se afeitaron las patas. Se aplicó gel conductor en la piel y 50 μl de vector de ADN diluidos en NaCl al 0,9 %, se inyectaron en los cuádriceps. Después de la inyección, se realizó la electroporación, aplicando electrodos de varilla a la piel cerca del sitio de inyección y se sometió el sitio a un potencial eléctrico que comprende 10 trenes de 1000 pulsos cada uno, con una longitud de pulso a dos veces cada 200 segundos (positivo 200 seg y negativo 200 seg) con un intervalo de 600 s entre cada pulso y con un límite de corriente de 50 mA (aproximadamente 150-174 V/cm) (Tollefsen, Tjelle y col. 2002).

50 Se recogieron muestras de sangre de la vena de la pata en distintos instantes y se realizó una punción cardíaca en el día en el que se sacrificaron. Se analizaron las muestras de suero para la presencia de Vaccicuerpos correctamente plegados. El ELISA se realizó con DNP-BSA como revestimiento y 9A8-bio como Ac detectado, tal como se ha descrito anteriormente. Además, se analizaron muestras de suero para los Ac anti-Id mediante ELISA tal como se ha descrito anteriormente.

Estimulación tumoral

Vaccicuerpos de proteína-MOPC315.4: A los ratones BALB/c (6-10 semanas de edad) se les inyectaron s.c. con 160 µg de Vaccicuerpos específicos de clase-II o de NIP en PBS en la región del flanco derecho en el día 0 y en el 14. En el día 28, se inyectaron s.c. $1,6 \times 10^5$ células MOPC315.4 en el flanco derecho. Se inspeccionó a los ratones dos veces a la semana. Se controló el tamaño del desarrollo tumoral mediante palpación y uso de un calibrador. Un tumor de 3 mm de diámetro se puntuó como un prendimiento de tumor. Se mató a los ratones cuando el tamaño tumoral alcanzó los 20 mm sin signos de necrosis tumoral.

Vaccicuerpos de ADN-MOPC315.4: La vacunación con ADN se realizó en el día 0 tal como se ha descrito anteriormente. En el día 14, se inyectaron s.c. $1,6 \times 10^5$ células MOPC315.4 en la región del flanco derecho. Se controló el tamaño del desarrollo tumoral mediante palpación y uso de un calibrador. Se sacrificó a los ratones cuando el tamaño tumoral alcanzó 20 mm. Se recogieron muestras de sangre en distintos instantes de la vena de la pata. Los niveles de proteína de mieloma M315 en suero se cuantificaron en un ELISA de tipo sándwich con Ac2.1-4 como recubrimiento mediante el AcMo biotinilado anti-C α como Ac de detección. El tamaño tumoral, prendimiento del tumor, las curvas de supervivencia y los análisis estadísticos se calcularon mediante el uso del programa Graph Pad Prism 3.0 (San Diego, CA).

Ejemplos

A modo de ejemplo los siguientes experimentos demuestran que los Vaccicuerpos se unen a las CPA y son capaces de desencadenar tanto la respuesta inmune de linfocitos T como la de linfocitos B. Además, los siguientes experimentos muestran que los Vaccicuerpos inducen una respuesta inmune fuerte haciendo a los adyuvantes redundantes. Los experimentos demuestran que dicha molécula es capaz de inducir una respuesta inmune contra el mieloma múltiple y, además, la viabilidad del tratamiento de mamíferos mediante inmunización por medio de Vaccicuerpos de ADN o Vaccicuerpos de proteína. Los experimentos también demuestran que otro enfoque atractivo es dirigir los Vaccicuerpos a moléculas de superficie que se expresan exclusivamente en los subconjuntos de células dendríticas (CD), como por ejemplo, receptores de quimiocinas. Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar cómo hacer y usar la invención. No se pretende que estos limiten el alcance de la invención de ningún modo o en cualquier grado.

Ejemplo 1

Los Vaccicuerpos se producen y se secretan como moléculas dimerizadas funcionales y se unen por sí mismos mediante el anticuerpo anti-V λ 1/2 (9A8) (Bogen 1989) y el anticuerpo anti-idiotípico Ac2.1-4 (Lauritzsen, Weiss y col. 1994).

El AcMo M315 se une al hapteno dinitrofenilo (DNP) (Eisen, Simms y col. 1968). Por lo tanto, para verificar que se produjeron los Vaccicuerpos, se secretaron y se plegaron correctamente como moléculas funcionales, las unidades antigénicas de los Vaccicuerpos se ensayaron en un ELISA para su capacidad para unirse a los AcMo DNP, 9A8 y Ac2.1-4. La Fig 20b muestra que tanto los Vaccicuerpos específicos de NIP como los específicos de MHCII, teniendo ambos scFv³¹⁵, se unen a DNP, 9A8 y Ac2.1-4. Este fue el caso con todos los Vaccicuerpos que contenían scFv³¹⁵, tanto los que tenían la unidad de dimerización humana larga, como la unidad de dimerización humana corta y la unidad de dimerización murina (Fig 5). A continuación se ensayaron las unidades de direccionamiento de los Vaccicuerpos. Se descubrió que estas eran correctas; en primer lugar, los Vaccicuerpos específicos de NIP se unieron a NIB-BSA en el ELISA (Fig 4 y Fig 20c), mientras que los Vaccicuerpos específicos de MHCII no lo hicieron (Fig 20c). En segundo lugar, los Vaccicuerpos específicos de MHCII se unieron a linfocitos B del bazo de BALB/C que expresaban I-E (H-2^d) tal como se detectó por citometría de flujo, mientras que los Vaccicuerpos específicos de NIP no lo hicieron (Fig 3). Para comprobar la correcta homodimerización, los Vaccicuerpos se marcaron metabólicamente mediante el crecimiento de la células transfectadas en medio que contenía ³⁵S-metionina, los vaccicuerpos se inmunoprecipitaron de sobrenadantes usando anticuerpos específicos, y se analizaron por SDS-PAGE. Tal como debería esperarse de la consideración teórica de la Fig.2, tanto los transfectomas F_v^{NIP} F_v³¹⁵ como los F_v^{I-E} F_v³¹⁵ secretaron Vaccicuerpos diméricos de ~ 130 kDa. Después de la reducción de los enlaces disulfuro, los Vaccicuerpos se degradan a cadenas monoméricas de ~ 65 kDa (Fig 20a).

Ejemplo 2

Los Vaccicuerpos específicos de MHC de clase II potencian la estimulación específica de λ 2³¹⁵ de linfocitos T CD4⁺.

Los Vaccicuerpos específicos de clase II y específicos de NIP no dirigidos se mezclaron con células presentadoras de antígenos (CPA) y se compararon para su capacidad de inducir la activación específica de linfocitos T. Los esplenocitos de BALB/c irradiados se usaron como CPA. La cepa BALB/c tiene el haplotipo H-2^d, por lo tanto estos expresan moléculas I-E^d necesarias tanto para el direccionamiento de los Vaccicuerpos específicos de MHC II como la presentación del epítipo λ 2³¹⁵ a linfocitos T CD4⁺ específicos.

Se pulsaron las CPA con los distintos Vaccicuerpos durante 4 h y se lavaron posteriormente. El lavado se realizó para reducir la posibilidad de que los Vaccicuerpos específicos de I-E^d del medio de cultivo pudieran disminuir la estimulación de linfocitos T mediante el bloqueo de las moléculas I-E^d (Lunde, Western y col. 2002). Las células Th2

polarizadas de ratones transgénicos para un TCR restringido a I-E^d específico de $\lambda 2^{315}$ (Lauritzsen, Weiss y col. 1993) se añadieron como linfocitos T respondedores. La curva de dosis respuesta de la fig 6 muestra que el epítipo $\lambda 2^{315}$ se presentó de 100-1000 veces más eficazmente a las células Th2 del TCR transgénico cuando lo portaban los Vaccicuerpos específicos de MHC II dirigidos a las CPA (tanto los que tenían unidades de dimerización humanas largas como cortas) en comparación con los Vaccicuerpos específicos de NIP no dirigidos. Debe observarse que los Vaccicuerpos no incluyen un sitio de unión a Fc γ R; por lo tanto los Vaccicuerpos específicos de NIP no deben ser capaces de entrar en las células por medio de endocitosis mediada por receptor.

Ejemplo 3

Nivel de anticuerpos anti-idiotípicos en suero de los ratones que recibieron los Vaccicuerpos como proteínas en solución salina s.c. en ausencia de adyuvante.

En el protocolo de vacunación con proteínas, se inmunizó a los ratones BALB/c dos veces, espaciadas en dos semanas distintas, con 20 o 200 μ g de Vaccicuerpos específicos de MHCII o Vaccicuerpos específicos de NIP en PBS. Obsérvese que no se empleó adyuvante. Los sueros de los ratones inmunizados que se tomaron en diversos instantes después de la segunda vacunación se analizaron después para la unión de anticuerpos anti-idiotípicos a M315 en un ELISA. Los Vaccicuerpos específicos de MHCII provocaron una respuesta de anticuerpos anti-idiotípicos significativamente mayor después de 14 días después de la segunda inmunización de lo que lo hicieron los Vaccicuerpos específicos de NIP. Los Vaccicuerpos con una unidad de dimerización humana larga indujeron las mejores respuestas de Ac anti-idiotípicos (Fig 7). Dirigiendo por lo tanto las inmunorrespuestas anti-Id potenciadas de los Vaccicuerpos, sin embargo, mediante esta vía de inmunización, los Vaccicuerpos no dirigidos también indujeron algunas respuestas.

Ejemplo 4

Vaccicuerpos de proteína detectados en suero después de la inyección de ADN por vía intramuscular y electroporación in vivo.

Se ha descrito recientemente, que el músculo esquelético puede producir anticuerpos después de la inyección de genes de Ig y electroporación (Tjelle 2004). Por lo tanto, se investigó si se producían Vaccicuerpos funcionales mediante inyección de plásmido i.m. y electroporación. Dado que los Vaccicuerpos de F_v^{I-E} F_v³¹⁵ son específicos para las moléculas I-E^d presentes en los BALB/c (H-2^d), estos Vaccicuerpos deben absorberse rápidamente por las células positivas para I-E^d en los BALB/c. Por el contrario, los Vaccicuerpos de F_v^{NIP} F_v³¹⁵ no dirigidos no deben absorberse. De hecho, 14 días después de una sola inyección con 50 μ g del plásmido del Vaccicuerpo en el cuádriceps y la electroporación, se detectó la proteína del Vaccicuerpo F_v^{NIP} F_v³¹⁵ en cantidades significativas en suero, mientras que no hubo F_v^{I-E} F_v³¹⁵ detectable (Fig 21a).

Ejemplo 5

Anticuerpos anti-Id en suero después de la inyección del Vaccicuerpo de ADN por vía intramuscular y electroporación.

El análisis de las muestras de suero del mismo día 14 para los anticuerpos anti-idiotípicos demostró que los ratones a los que se les inyectó i.m./electroporó con el Vaccicuerpo de ADN de MHC de clase II F_v^{I-E} F_v³¹⁵ dirigido, desarrollaron anticuerpos que se unían al Fv idiotípico del tumor MOPC315.4 (Fig 21b). Este resultado estuvo en claro contraste con la carencia de cualquier respuesta de anticuerpo anti-idiotípica en ratones inyectados con el Vaccicuerpo de ADN de F_v^{NIP} F_v³¹ (Fig 21b) no dirigido. Tomados en conjunto con los resultados que se describen en el ejemplo 4, los resultados demuestran un efecto formidable del direccionamiento a células positivas para MHC de clase II (I-E^d) para el desarrollo de una respuesta humoral fuerte. Los ratones control inyectados i.m con NaCl al 0,9 % seguido por electroporación no tuvieron Vaccicuerpos ni Ac anti-idiotípicos en los sueros en el día 14 (Fig 21a-c).

Ejemplo 6

Inducción de inmunidad protectora contra el mieloma MOPC315.4: Inyección/electroporación de Vaccicuerpo de ADN.

La vacunación intramuscular con plásmidos de Vaccicuerpos dirigidos a MHC de clase II de F_v^{I-E} F_v³¹⁵ y la posterior electroporación indujo fuerte protección contra una estimulación con células de mieloma MOPC315.4, p<0,001, en comparación con los ratones control inyectados con NaCl al 0,9 % y electroporados (Fig 23). Por el contrario, la inmunización con el plásmido del Vaccicuerpo de F_v^{NIP} F_v³¹⁵ no dirigido fue ineficaz en comparación con el grupo control con solución salina, p= 0,2739 (Fig 23). La aparición de tumores se retrasó en ratones vacunados con F_v^{I-E} F_v³¹⁵ en comparación con F_v^{NIP} F_v³¹⁵ (Fig 22). Uno de los ratones vacunados con F_v^{I-E} F_v³¹ desarrolló un tumor de un máximo de 6 mm (día 20) de diámetro que retrocedió y fue completamente indetectable desde el día 28 (los datos no se muestran). La presencia de la proteína de mieloma M315 en suero confirmó las mediciones del tamaño tumoral (Fig 24). Estos resultados muestran que la protección contra el mieloma MOPC315.4 puede alcanzarse mediante vacunación i.m de ADN seguida por electroporación y que la protección requiere el direccionamiento del scFv derivado del tumor a células positivas para MHC de clase II (I-E^d).

Ejemplo 7

Las quimiocinas son funcionales como unidades de direccionamiento en el formato de Vaccicuerpo.

5 Se ensambló un vector que porta el gen que codifica un Vaccicuerpo tal como se explica esquemáticamente en la Figura 18, pero específicamente con MIP-1 α en la unidad de direccionamiento, la bisagra humana larga en la unidad de dimerización y scFv de M315 en la unidad antigénica. El sobrenadante de las células transfectadas con esta construcción se recogió y ensayó en un ELISA para la presencia de Vaccicuerpos que se unen a un AcMo de MIP-1 α anti-ratón y 9A8 bio. Los resultados mostraron que se produjeron dichos Vaccicuerpos con la especificidad deseada, y además, que estos se unieron al AcMo anti-MIP-1 α , mientras que los Vaccicuerpos específicos de NIP no lo hicieron (Fig 25).

10 **Ejemplo 8**

La quimiocina RANTES es funcional como unidad de direccionamiento en el formato de Vaccicuerpo.

15 Del mismo modo, se produjo un vector con un gen que codifica Vaccicuerpos como aquellos que se describen en el ejemplo 7, con la excepción de que la unidad de direccionamiento fue la quimiocina de ratón RANTES. El sobrenadante de las células transfectadas con esta construcción se recogió y ensayó en un ELISA para la presencia de Vaccicuerpos. El experimento mostró que esta variante de Vaccicuerpo se expresó y exportó como una molécula funcional.

Ejemplo 9

La flagelina como unidad de direccionamiento en el formato de Vaccicuerpo.

20 Del mismo modo, se produjo un vector con un gen que codifica Vaccicuerpos como los que se describen en el ejemplo 7, con la excepción de que la unidad de direccionamiento fue la flagelina. El sobrenadante de las células transfectadas con esta construcción se recogerá y ensayará en un ELISA para la presencia de Vaccicuerpos.

Ejemplo 10

Ligando CD40 soluble como unidad de direccionamiento en el formato de Vaccicuerpo.

25 Del mismo modo, se produjo un vector con un gen que codifica Vaccicuerpos como los que se describen en el ejemplo 7, con la excepción de que la unidad de direccionamiento fue un ligando CD 40 soluble del ratón. El sobrenadante de las células transfectadas con esta construcción se recogerá y ensayará en un ELISA para la presencia de Vaccicuerpos.

Ejemplo 11

El anti-receptor de tipo Toll 2 como unidad de direccionamiento en el formato de Vaccicuerpo.

30 Del mismo modo, se produjo un vector con un gen que codifica Vaccicuerpos como los que se describen en el ejemplo 7, con la excepción de que la unidad de direccionamiento fue un scFv con especificidad por el receptor de tipo toll 2 del ratón. El sobrenadante de las células transfectadas con esta construcción se recogerá y ensayará en un ELISA para la presencia de Vaccicuerpos.

Ejemplo 12

35 *Los anti-CD14 son funcionales como unidades de direccionamiento en el formato de Vaccicuerpo.*

40 Del mismo modo, se produjo un vector con un gen que codifica Vaccicuerpos como los que se describen en el ejemplo 7, con la excepción de que la unidad de direccionamiento fue un scFv con especificidad por el CD 14 humano. El sobrenadante de las células transfectadas con esta construcción se recogió y ensayó en un ELISA para la presencia de Vaccicuerpos. Los resultados mostraron que esta variante de Vaccicuerpo se expresó y exportó como una molécula funcional.

Ejemplo 13

Los anti-HLA-DP son funcionales como unidades de direccionamiento en el formato de Vaccicuerpo.

45 Del mismo modo, se produjo un vector con un gen que codifica Vaccicuerpos como aquellos que se describen en el ejemplo 7, con la excepción de que la unidad de direccionamiento fue un scFv con especificidad por HLA-DP. El sobrenadante de las células transfectadas con esta construcción se recogió y ensayó en un ELISA para la presencia de Vaccicuerpos. Los resultados mostraron que esta variante de Vaccicuerpo se expresó y exportó como una molécula funcional.

Ejemplo 14

Antígeno de tuberculosis en el casete antigénico del Vaccicuerpo.

Un ácido nucleico que codifica un antígeno de tuberculosis (antígeno bovino) se insertará en la unidad antigénica de la construcción del Vaccicuerpo.

5 **Ejemplo 15**

El antígeno de la telomerasa en el casete antigénico del Vaccicuerpo.

hTERT, una región antigénica de la ribonucleoproteína telomerasa, se insertará en la unidad antigénica de la construcción del Vaccicuerpo.

Ejemplo 16

10 *Gp120 antigénica de VIH en el casete antigénico del Vaccicuerpo.*

Un ácido nucleico que codifica una molécula derivada de gp120 se insertará en la unidad antigénica de la construcción del Vaccicuerpo.

Ejemplo 17

Vaccicuerpos con scFv específicos del paciente originados en mieloma en el casete antigénico.

15 Se recogieron los aspirados de médula ósea de pacientes que padecían mieloma múltiple. Las células mononucleares (CMN) se separaron usando una solución de gradiente de densidad de Ficoll-Isopaque (Lymphoprep™ de Axis-Shield PoC AS). El ARN total se aisló (reactivo TRIzol® de Invitrogen™ Life Technologies) de las CMN, y se hizo el ADNc del ARNm (Kit de síntesis de la primera hebra de ADNc de Amersham Biosciences (cebador bifuncional no I-d(T)18)). Este ADNc se usó como molde en la PCR con los cebadores que amplifican los genes V de la cadena pesada o ligera de la Ig de mieloma múltiple. Los cebadores sentido son específicos de familia y se localizan en las regiones líder (VH1-7, VK1-6 y VL1-10), y los cebadores anti-sentido se localizan en la primera parte de las regiones C (un cebador para cada IgG, IgA, kappa y lambda). Los productos de PCR se ligaron en un vector (pGEM®-T Easy Vector de Promega), y se transformaron en *E.coli*. Las muestras de ADN se aislaron de colonias individuales y se secuenciaron. Obteniendo la misma secuencia de las tres distintas colonias originadas de tres PCR distintas se confirma que se han aislado las regiones V de la Ig de mieloma. La PCR de SOEing se realiza y se hace la reamplificación con cebadores que incluyen marcadores con sitios para Sfil tal como se describe en la Figura 19. Para un paciente cuyos cebadores tenían la secuencia:

5'TAVH 5' ACGTAGGCCTCGGTGGCCTGCAGATCACCTTGAAGGAGTCT

3'TAVK 5' GATCCGGCCCTGCAGGCCTCATTGATCTCCAGCTTGGTCCC

30 El vector resultante se transfectó transitoriamente en células 293E. Los sobrenadantes se ensayaron en un ELISA para la presencia de Vaccicuerpos. Estos también se inyectaron en ratones BALB/c. La presencia de anticuerpos anti-idiotípicos se mide en un ELISA contra el suero de los ratones y el suero de los pacientes.

Referencias

Bendandi, M., C. D. Gocke, y col. (1999). "Complete molecular remissions induced by patient-specific vaccination plus granulocyte-monocyte colony-stimulating factor against lymphoma." *Nat Med* 5(10): 1171-7.

35 Biragyn, A., P. A. Ruffini, y col (2002). "Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2." *Science* 298(5595): 1025-9.

Biragyn, A., K. Tani, y col. (1999). "Genetic fusion of chemokines to a self tumor antigen induces protective, T-cell dependent antitumor immunity." *Nat Med* 17(3): 253-8.

40 Bogen, B. (1989). "Monoclonal antibodies specific for variable and constant domains of murine lambda chains." *Scand J Immunol* 29(3): 273-9.

Bogen, B., Peripheral T cell tolerance as a tumor escape mechanism: deletion of CD4+ T cells specific for a monoclonal immunoglobulin idiotype secreted by a plasmacytoma. *Eur J Immunol*. Noviembre de 1996; 26(11):2671-9.

45 Bogen, B., L. Gleditsch, y col. (1992). "Weak positive selection of transgenic T cell receptor-bearing thymocytes: importance of major histocompatibility complex class II, T cell receptor and CD4 surface molecule densities." *Eur J Immunol* 22(3): 703-9.

Bogen, B. y J. D. Lambris (1989). "Minimum length of an idiotypic peptide and a model for its binding to a major histocompatibility complex class II molecule." *Embo J* 8(7): 1947-52.

- Bogen, B., B. Malissen, y col. (1986). "Idiotope-specific T cell clones that recognize syngeneic immunoglobulin fragments in the context of class II molecules." *Eur J Immunol* 16(11): 1373-8.
- Casten, L. A. y S. K. Pierce (1988). "Receptor-mediated B cell antigen processing. Increased antigenicity of a globular protein covalently coupled to antibodies specific for B cell surface structures." *J Immunol* 140(2): 404-10.
- 5 Eisen, H. N., E. S. Simms, y col. (1968). "Mouse myeloma proteins with antihapten antibody activity. The protein produced by plasma cell tumor MOPC-315." *Biochemistry* 7(11): 4126-34.
- Hakim, I., S. Levy, y col. (1996). "A nine-amino acid peptide from IL-1beta augments antitumor immune responses induced by protein and DNA vaccines." *J Immunol* 157(12): 5503-11.
- Hough, D. W., R. P. Eady, y col. (1976). "Anti-idiotypic sera raised against surface immunoglobulin of human neoplastic lymphocytes." *J Exp Med* 144(4): 960-9.
- 10 Huang, H. I., P. Y. Wu, y col. (2004). "Improved immunogenicity of a self tumor antigen by covalent linkage to CD40 ligand." *Int J Cancer* 108(5): 696-703.
- King, C. A., M. B. Spellerberg, y col. (1998). "DNA vaccines with single-chain Fv fused to fragment C of tetanus toxin induce protective immunity against lymphoma and myeloma." *Nat Med* 4(11): 1281-6.
- 15 Kristoffersen, G., K. Hannestad, y col. (1987). "Two M315 idiotypes defined by isologous monoclonal antibodies: one depends on germline and the other on mutated murine lambda 2 light chain sequences." *Scand J Immunol* 26(5): 535-46.
- Lauritzsen, G. F., S. Weiss, y col. (1993). "Anti-tumour activity of idiotype-specific, MHC-restricted Th1 and Th2 clones in vitro and *in vivo*." *Scand J Immunol* 37(1): 77-85.
- 20 Lauritzsen, G. F., S. Weiss, y col. (1994). "Naive idiotype-specific CD4+ T cells and immunosurveillance of B-cell tumors." *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 2011 91:12-13001. 5700-4.
- Lunde, E., L. A. Munthe, y col. (1999). "Antibodies engineered with IgD specificity efficiently deliver integrated T-cell epitopes for antigen presentation by B cells." *Nat Med* 17(7): 670-5.
- Lunde, E., I. B. Rasmussen, y col. (2001). "'Troy-bodies': antibodies as vector proteins for T cell epitopes." *Biomol Eng* 18(3): 109-16.
- 25 Lunde, E., K. H. Western, y col. (2002). "Efficient delivery of T cell epitopes to APC by use of MHC class II-specific Troybodies." *J Immunol* 168(5): 2154-62.
- Neuberger, M. S. (1983). "Expression and regulation of immunoglobulin heavy chain gene transfected into lymphoid cells." *Embo J* 2(8): 1373-8.
- 30 Norderhaug, L., T. Olafsen, y col. (1997). "Versatile vectors for transient and stable expression of recombinant antibody molecules in mammalian cells." *J Immunol Methods* 204(1): 77-87.
- Olafsen, T., I. B. Rasmussen, y col. (1998). "IgM secretory tailpiece drives multimerisation of bivalent scFv fragments in eukaryotic cells." *Immunotechnology* 4(2): 141-53.
- Ozato, K., N. Mayer, y col. (1980). "Hybridoma cell lines secreting monoclonal antibodies to mouse H-2 and Ia antigens." *J Immunol* 124(2): 533-40.
- 35 Ravetch, J. V. y S. Bolland (2001). "IgG Fc receptors." *Annu Rev Immunol* 19: 275-90.
- Sirishinha, S. y H. N. Eisen (1971). "Autoimmune-like antibodies to the ligand-binding sites of myeloma proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* 68(12): 3130-5.
- Snider, D. P. y D. M. Segal (1987). "Targeted antigen presentation using crosslinked antibody heteroaggregates." *J Immunol* 139(5): 1609-16.
- 40 Tao, M. H. y R. Levy (1993). "Idiotype/granulocyte-macrophage colony-stimulating factor fusion protein as a vaccine for B-cell lymphoma." *Nature* 362(6422): 755-8.
- Tjelle, T., Corthay, A., Lunde, E., Sandlie, I., Michaelsen, TE., Mathiesen, I y Bogen, B. (2004). "Monoclonal antibodies produced by muscle after plasmid injection and electroporation." *J Mol Ther.*
- 45 Tollefsen, S., T. Tjelle, y col. (2002). "Improved cellular and humoral immune responses against Mycobacterium tuberculosis antigens after intramuscular DNA immunisation combined with muscle electroporation." *Vaccine* 20(27-28): 3370-8.

REIVINDICACIONES

1. Un ácido nucleico en la forma de un plásmido de ADN desnudo para su uso como un agente terapéutico, en el que el ácido nucleico codifica una unidad monomérica de una molécula basada en un anticuerpo recombinante dimérica que comprende dos de dichas unidades monoméricas conectadas a través de un motivo de dimerización que consiste en una región bisagra derivada de Ig y un dominio Cy3, comprendiendo dicho motivo de dimerización una región bisagra y un dominio Cy3 de cada unidad monomérica, en la que cada una de las regiones bisagra contribuye a la dimerización por medio de puentes disulfuro con la otra región bisagra y cada dominio Cy3 contribuye a la dimerización por medio de interacciones hidrófobas con el otro dominio Cy3, y en la que cada una de dichas unidades monoméricas consiste en una unidad de direccionamiento con especificidad para una molécula de superficie en una célula presentadora de antígenos, conectada a través de dicha región bisagra y dicho dominio Cy3 a una unidad antigénica del COOH- terminal, y en la que cada una de dichas unidades monoméricas carece de un dominio CH2.
2. El ácido nucleico para el uso de la reivindicación 1, en el que dicha unidad de direccionamiento es un fragmento variable monocatenario de Ig (scFv).
3. El ácido nucleico para el uso de la reivindicación 2, en el que dicho scFv es anti-HLA, anti-CD14 o anti-receptor de tipo toll.
4. El ácido nucleico para el uso de la reivindicación 3, en el que dicho anti-HLA es anti-HLA-DP.
5. El ácido nucleico para el uso de la reivindicación 3, en el que dicho anti-receptor de tipo toll es un anti-receptor de tipo toll 2.
6. El ácido nucleico para el uso de la reivindicación 1, en el que dicha unidad de direccionamiento es un ligando.
7. El ácido nucleico para el uso de la reivindicación 6, en el que dicho ligando es el ligando CD40 soluble o una quimiocina.
8. El ácido nucleico para el uso de la reivindicación 6, en el que dicho ligando es una quimiocina.
9. El ácido nucleico para el uso de la reivindicación 7 u 8, en el que dicha quimiocina es RANTES o MIP-1 α .
10. El ácido nucleico para el uso de la reivindicación 7 u 8, en el que dicha quimiocina es MIP-1 α .
11. El ácido nucleico para el uso de la reivindicación 1, en el que dicha unidad de direccionamiento es un antígeno bacteriano.
12. El ácido nucleico para el uso de la reivindicación 11, en el que el antígeno bacteriano es una flagelina.
13. El ácido nucleico para el uso de la reivindicación 1, en el que la unidad de direccionamiento tiene la capacidad de dirigirse a HLA-DP, CD14, CD40, receptores de tipo toll, o receptores de quimiocinas.
14. El ácido nucleico para el uso de la reivindicación 13, en el que la unidad de direccionamiento tiene la capacidad de dirigirse a HLA-DP.
15. El ácido nucleico para el uso de la reivindicación 1, en el que la unidad de direccionamiento tiene la capacidad de dirigirse a receptores de quimiocinas.
16. El ácido nucleico para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la unidad antigénica es un scFv antigénico.
17. El ácido nucleico para el uso de la reivindicación 16, en el que el scFv antigénico se deriva de una Ig monoclonal producida por mieloma o linfoma.
18. El ácido nucleico para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en el que la(s) unidad(es) antigénica(s) se deriva(n) de una proteína de cáncer, tal como una telomerasa, o una parte funcional de la misma.
19. El ácido nucleico para el uso de la reivindicación 18, en el que dicha proteína de cáncer es hTERT.
20. El ácido nucleico para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en el que la(s) unidad(es) antigénica(s) se deriva(n) de una bacteria.
21. El ácido nucleico para el uso de la reivindicación 20, en el que la(s) unidad(es) antigénica(s) derivada(s) de la bacteria es/son un antígeno de tuberculosis.
22. El ácido nucleico para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-15 en el que la(s) unidad(es) antigénica(s) se deriva(n) de un virus.

23. El ácido nucleico para el uso de la reivindicación 22, en el que la(s) unidad(es) antigénica(s) derivada(s) del virus se deriva(n) del VIH.
24. El ácido nucleico para el uso de la reivindicación 23, en el que la(s) unidad(es) antigénica(s) derivada(s) del VIH se deriva(n) de gp120.
- 5 25. El ácido nucleico para el uso de la reivindicación 1, en el que la región bisagra comprende tanto el exón h1 como el h4 de hlgG3.
26. El ácido nucleico para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el uso es un procedimiento para tratar cáncer o una enfermedad infecciosa.
- 10 27. El ácido nucleico para el uso de acuerdo con la reivindicación 26, que es administrado por medio de una dispersión coloidal o inyección intramuscular seguida de electroporación.
28. El ácido nucleico para el uso de acuerdo con la reivindicación 27, en el que la dispersión coloidal es un liposoma o lipoplexo.
29. El ácido nucleico para el uso de acuerdo con la reivindicación 27, en el que el medicamento es administrado por medio de una inyección intramuscular seguida de electroporación.
- 15 30. El ácido nucleico para el uso de acuerdo con la reivindicación 26, en el que el cáncer es mieloma múltiple o linfoma en un mamífero.
31. El ácido nucleico para el uso de acuerdo con la reivindicación 26, en el que la enfermedad infecciosa es una infección por VIH o tuberculosis.
- 20 32. Uso del ácido nucleico definido en una cualquiera de las reivindicaciones de 1-25 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer o una enfermedad infecciosa.
33. Uso de la reivindicación 32, en el que el medicamento es administrado por medio de una dispersión coloidal o inyección intramuscular seguida de electroporación.
34. Uso de la reivindicación 33, en el que la dispersión coloidal es un liposoma o lipoplexo.
- 25 35. Uso de la reivindicación 33, en el que el medicamento es administrado por medio de una inyección intramuscular seguida de electroporación.
36. Uso de la reivindicación 32, en el que el cáncer es mieloma múltiple o linfoma en un mamífero.
37. Uso de la reivindicación 32, en el que la enfermedad infecciosa es una infección por VIH o tuberculosis.

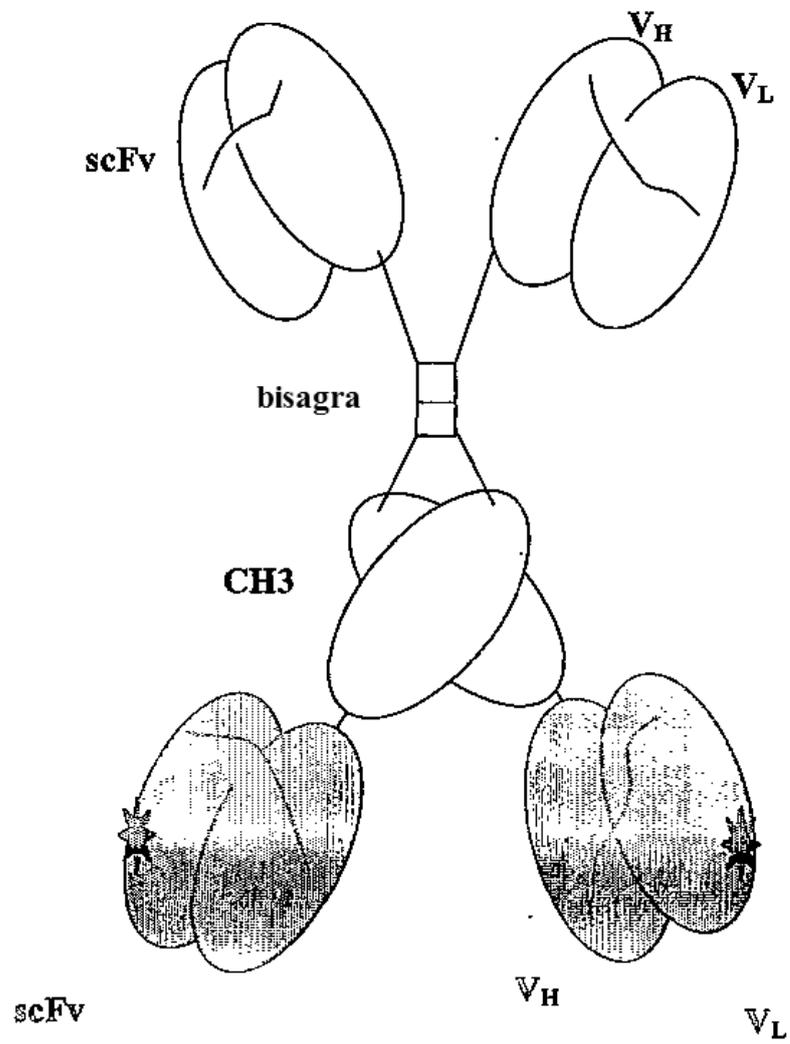


Fig 1 La estructura del Vaccicuerpo

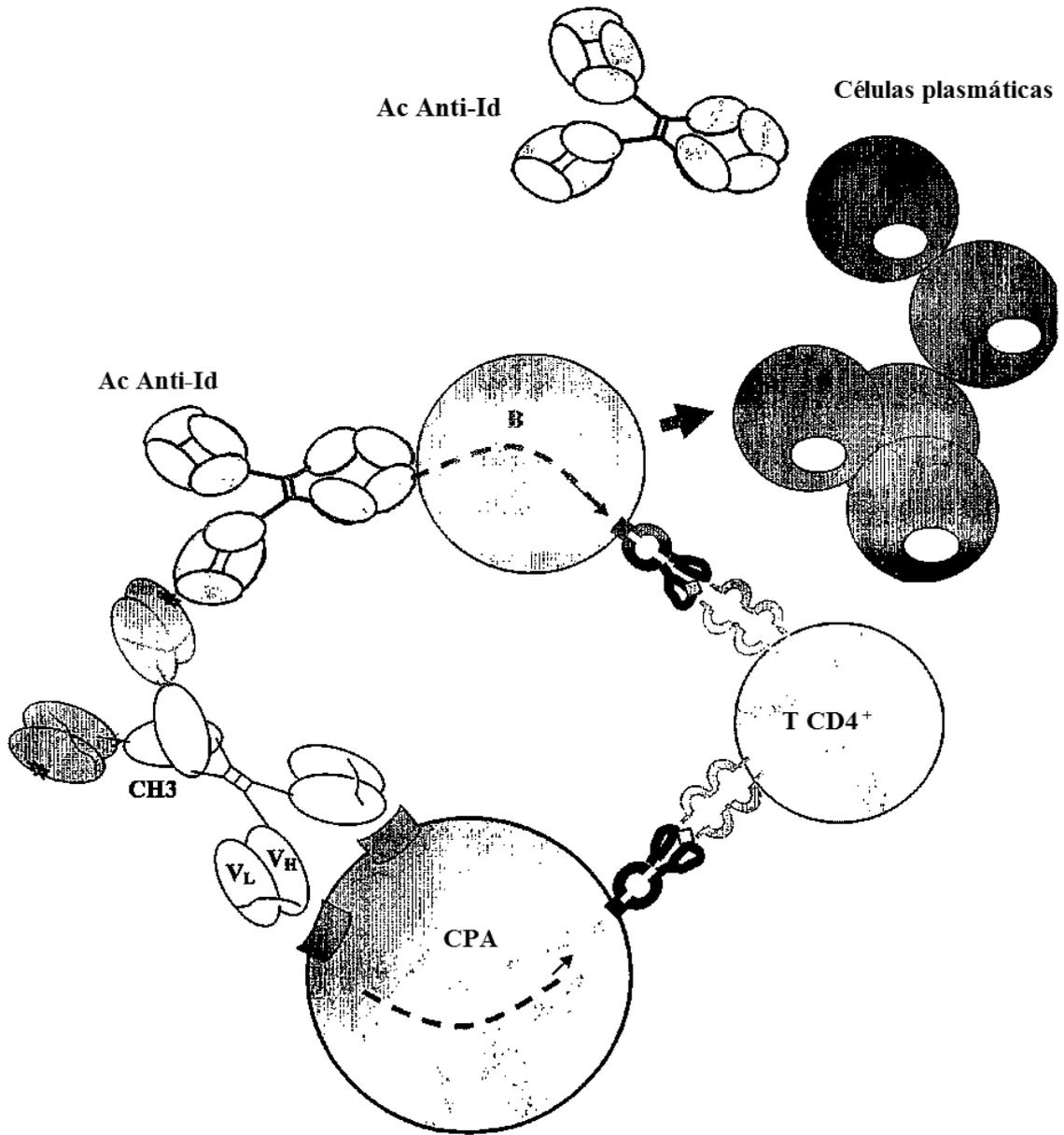


Fig 2 principio.

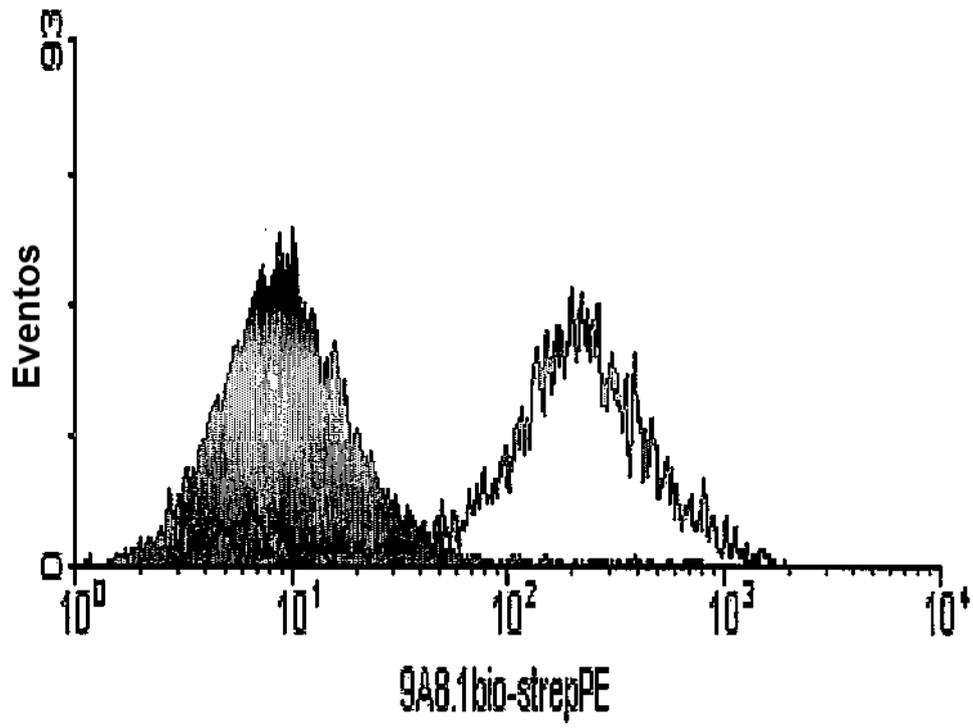


Fig 3 Citometría de flujo de los esplenocitos

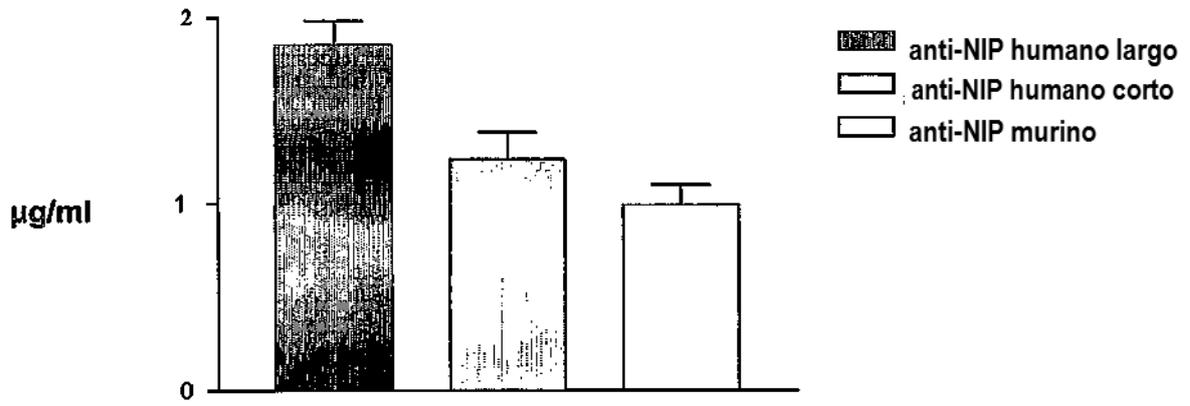


Fig 4 Los Vaccicuerpos control específicos de NIP muestran unión al hapteno NIP.

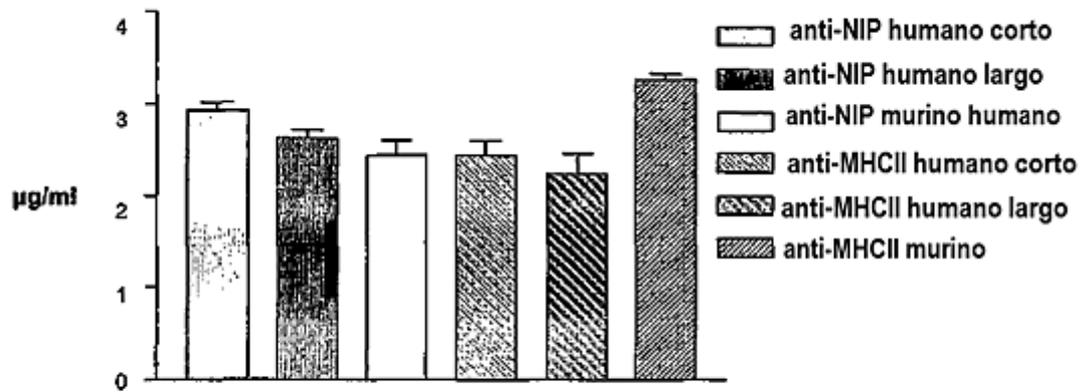


Fig 5 Los Vaccicueros muestran unión a DNP, por lo tanto el scFc antigénico está plegado correctamente

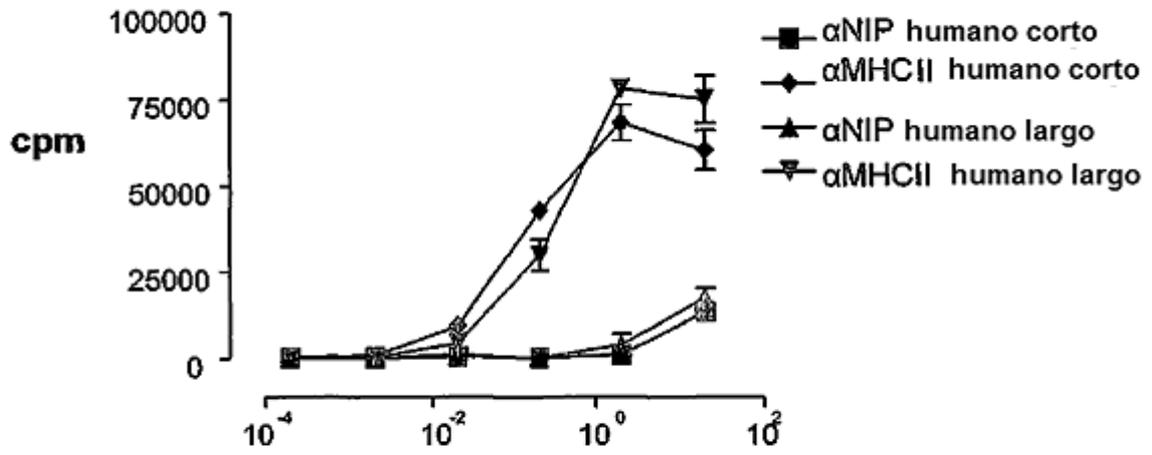


Fig 6 CPA pulsadas con cantidades tituladas de Vaccicuerpos específicos de MHC de clase II

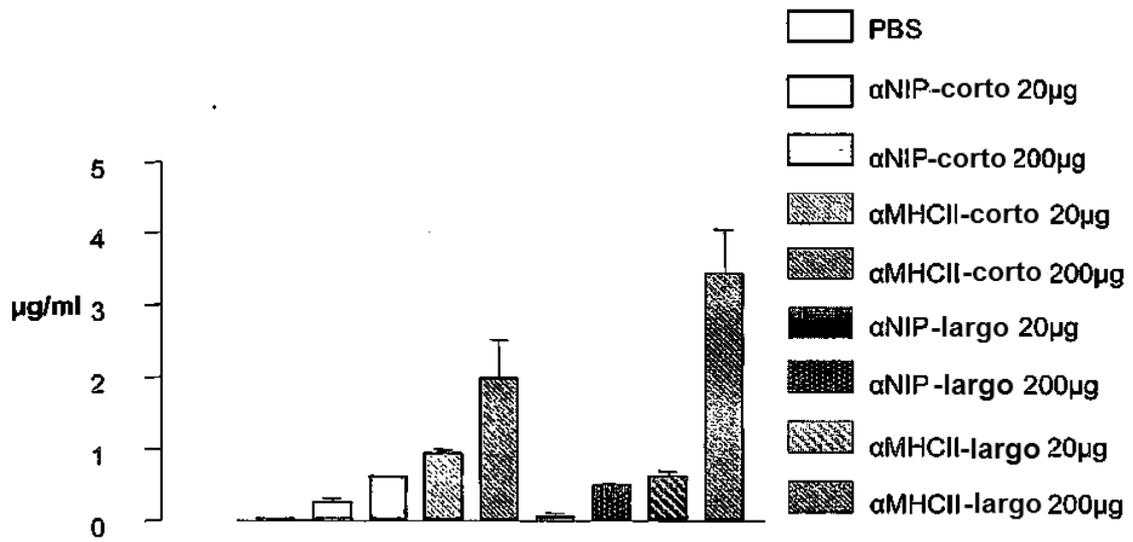
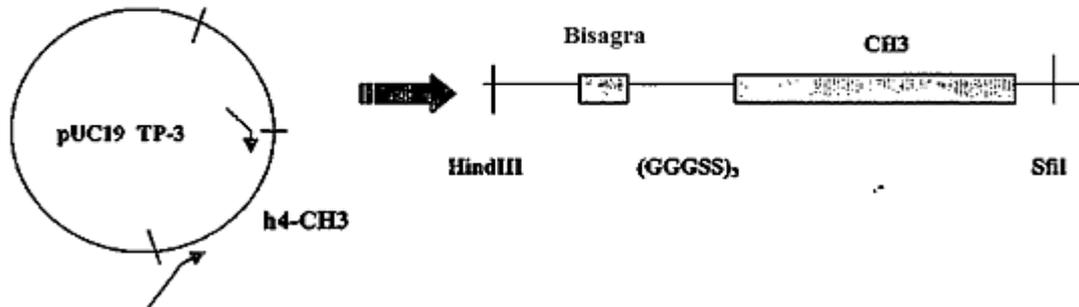


Fig 7 Los Vaccicuerpos específicos de MHC de clase II inducen una respuesta de Ac anti-Id fuerte en ausencia de adyuvantes

A Bisagra corta



A bisagra larga

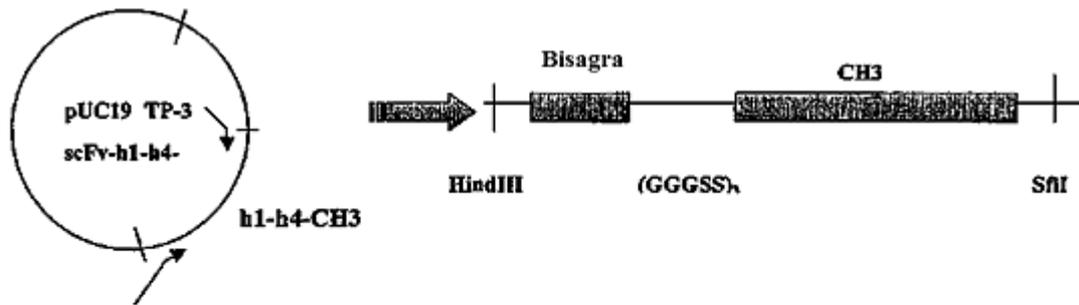


Fig 8 Construcción de las dos variantes de bisagra-C γ 3 de origen hIgG3 mediante PCR

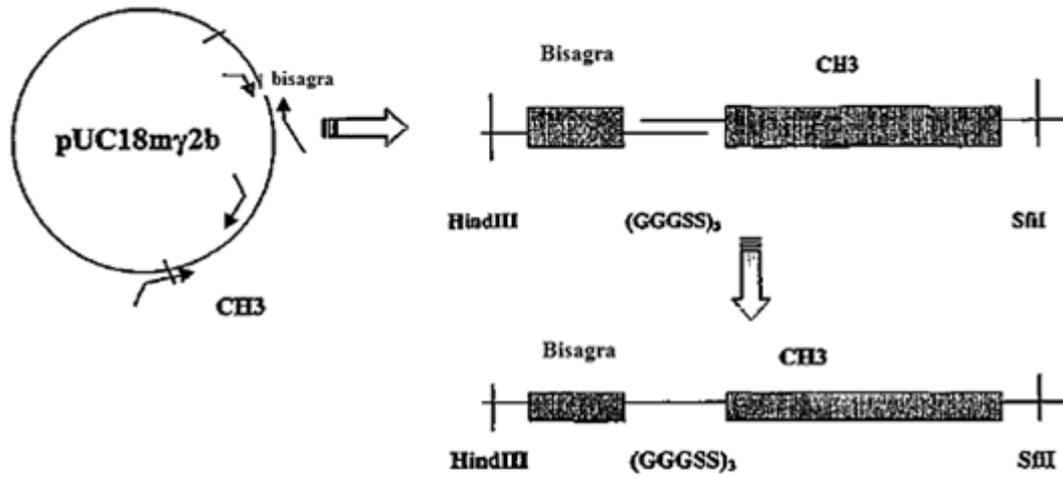


Fig 9 Construcción de los segmentos de bisagra-Cy3 derivados de hIgG3 PCR

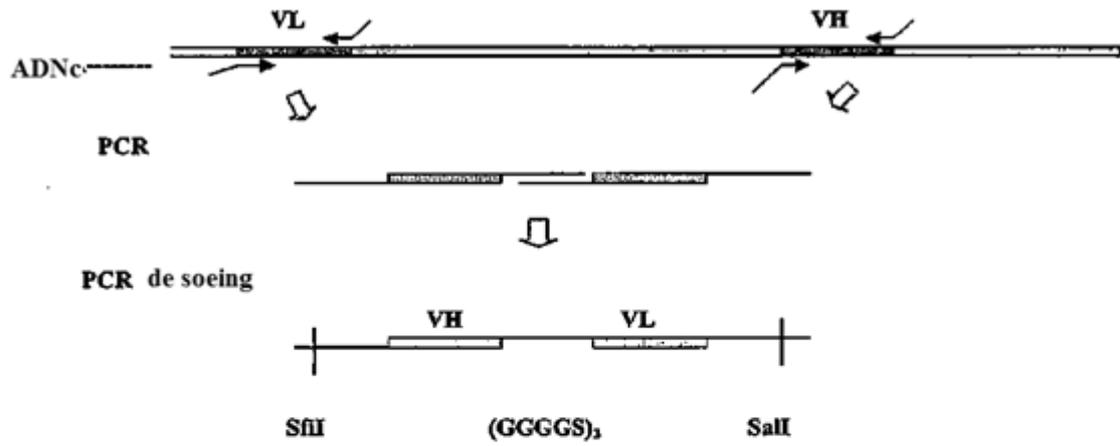


Fig 10 Construcción de los scFv derivados de la proteína de mieloma M315.

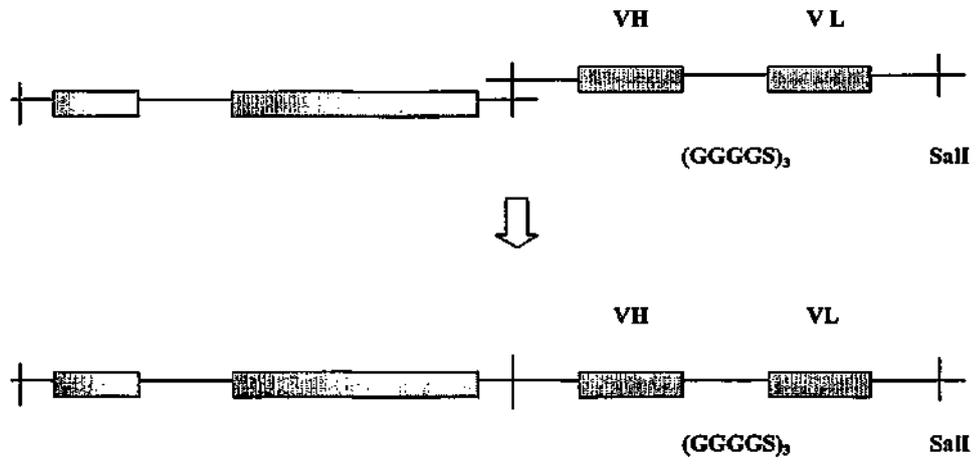


Fig 11 Unión de los segmentos de bisagra-C γ 3 y el scFv de M315 mediante PCR de soeing.

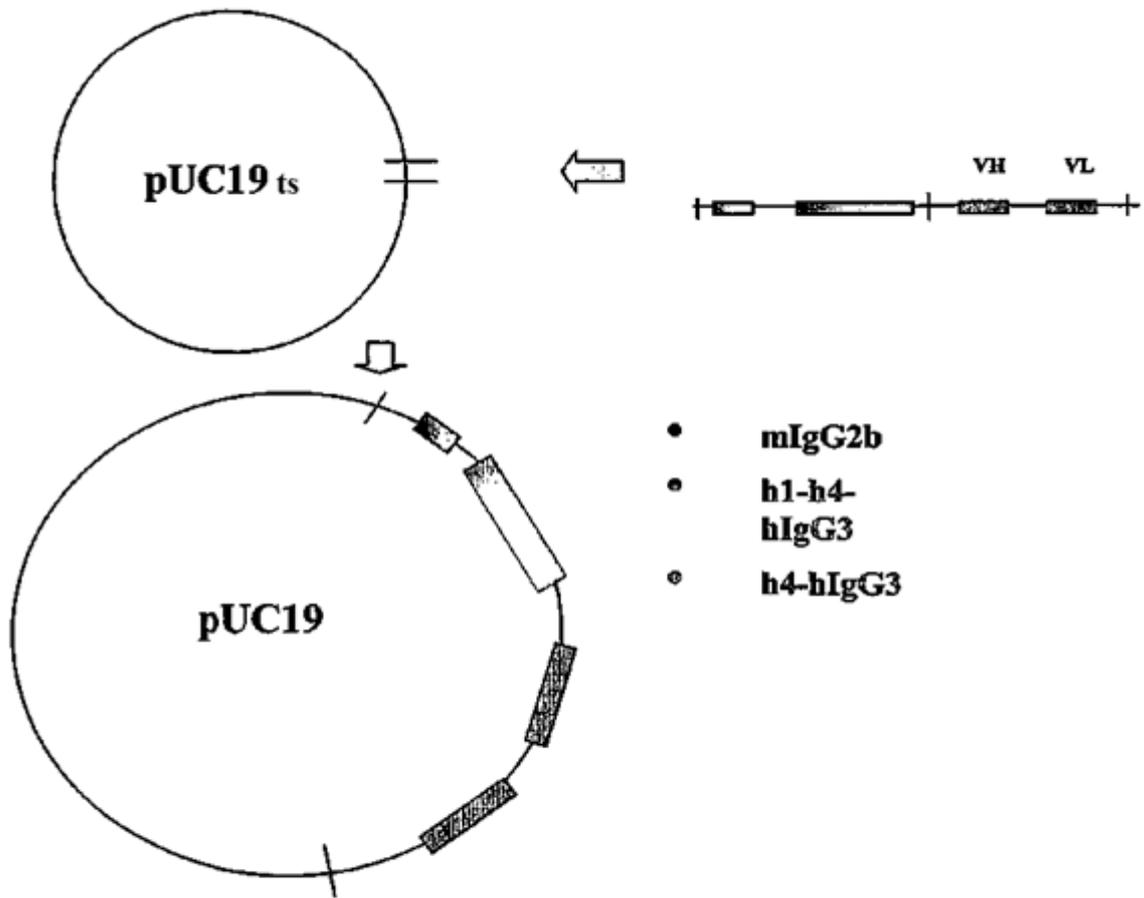


Fig 12 Subclonación de la bisagra-Cy3- scFv de M315 en pUC19.

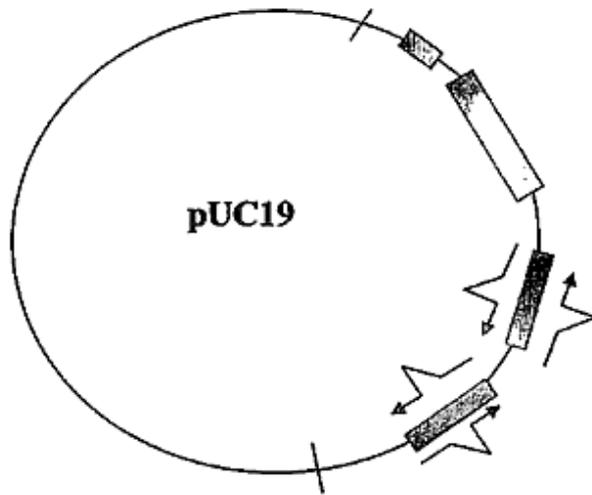


Fig 13 Eliminación de dos sitios de enzimas de restricción de BamHI mediante PCR QuickChange.

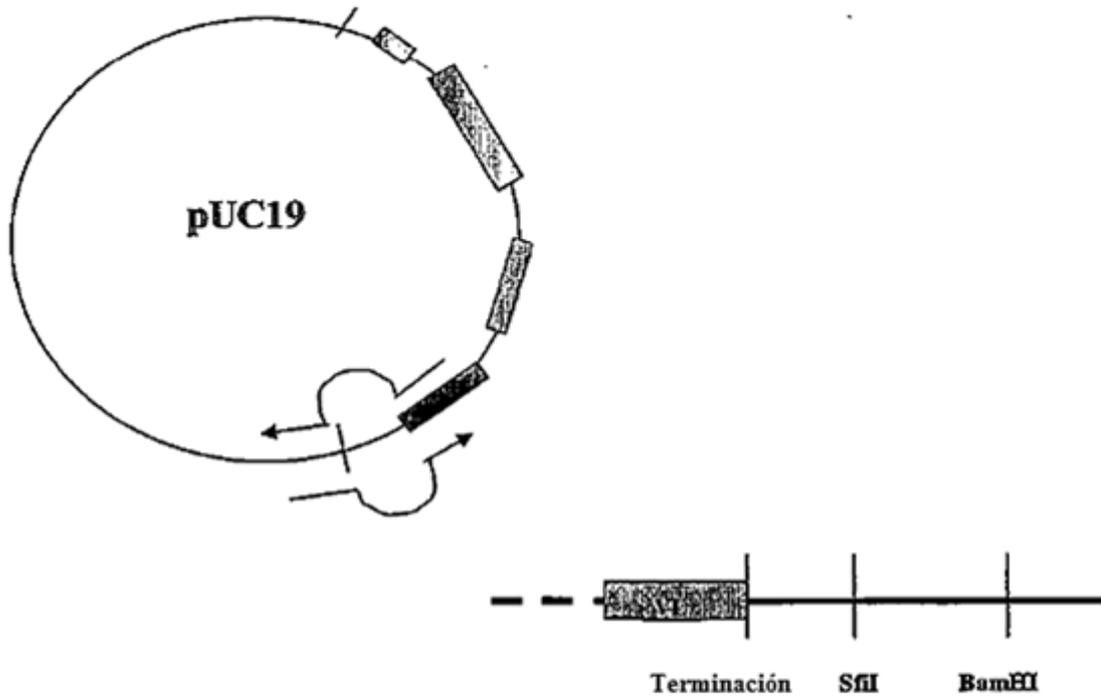


Fig 14 Introducción del codon de parada, un sitio de enzimas de restricción de *SfiI* y *BamHI* corriente abajo de la región codificante mediante PCR QuickChange.

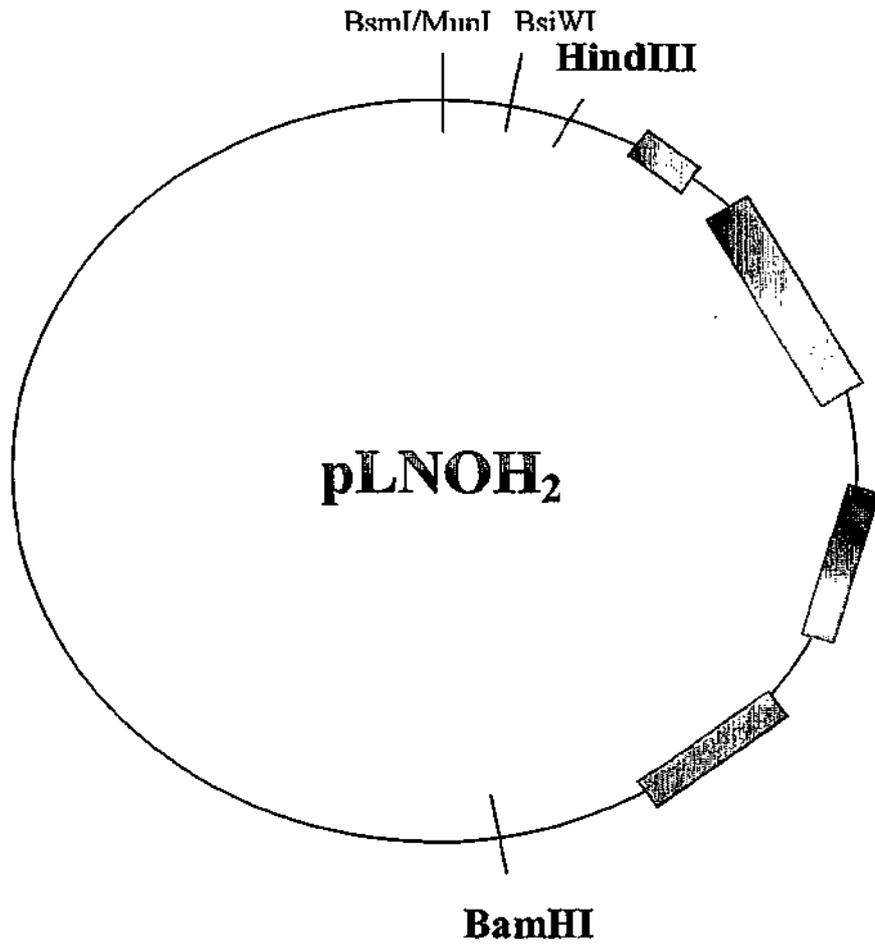


Fig 15 Subclonación en el casete C del vector de expresión pLNOH₂ en HindII-BamHI

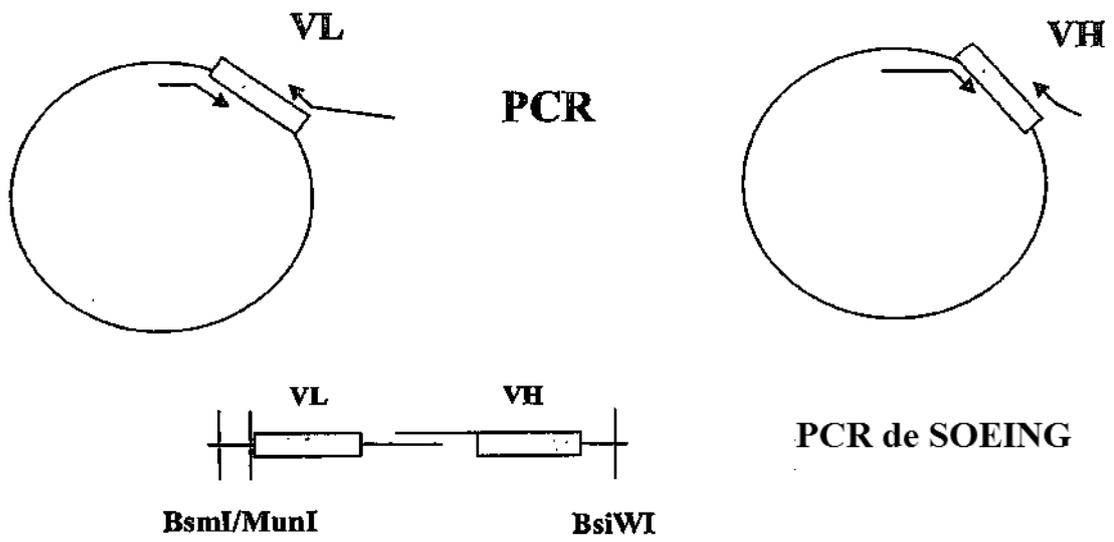


Fig 16 Clonación de las regiones V específicas para NIP y MHCII y ensamblaje en el formato scFv mediante PCR de soeing.

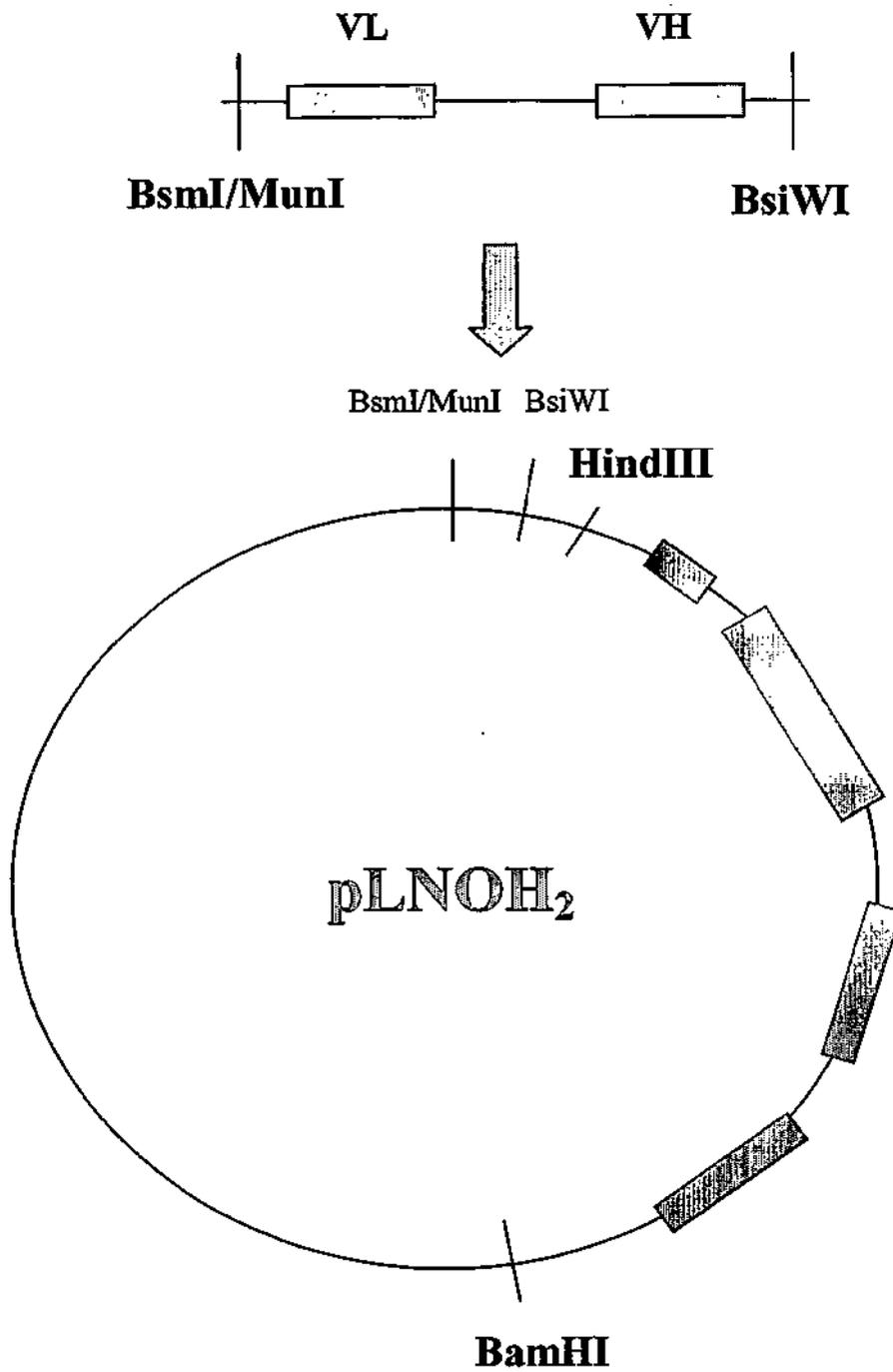


Fig 17 Subclonación en el vector de expresión pLNOH₂ en BsmI/MunI y BsiWI

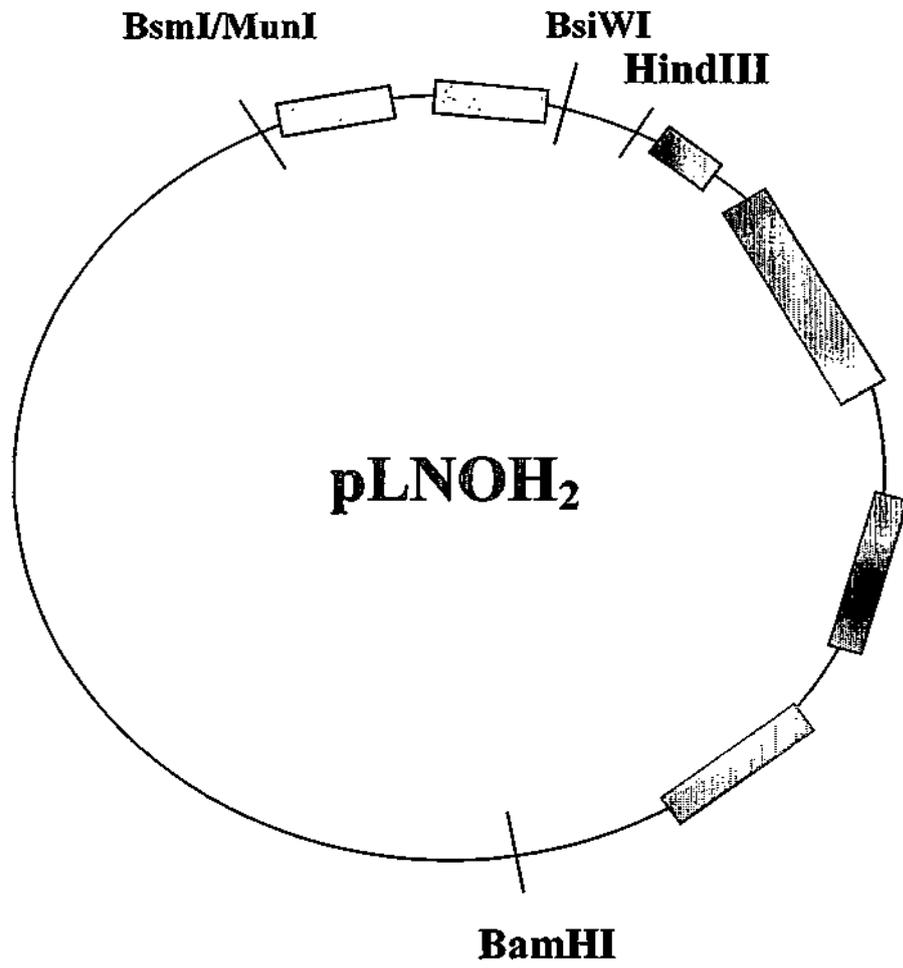


Fig 18 La construcción de Vaccicuerpos final.

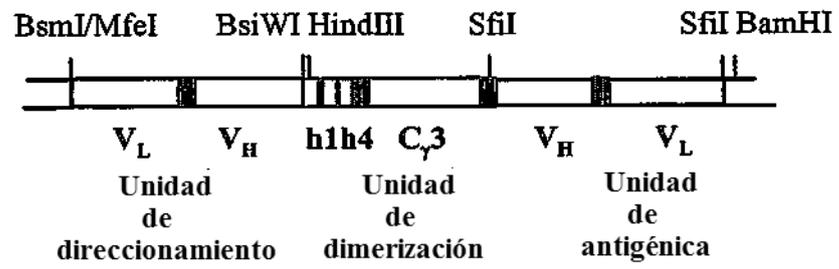


Fig 19 La construcción génica del Vaccicuerpo

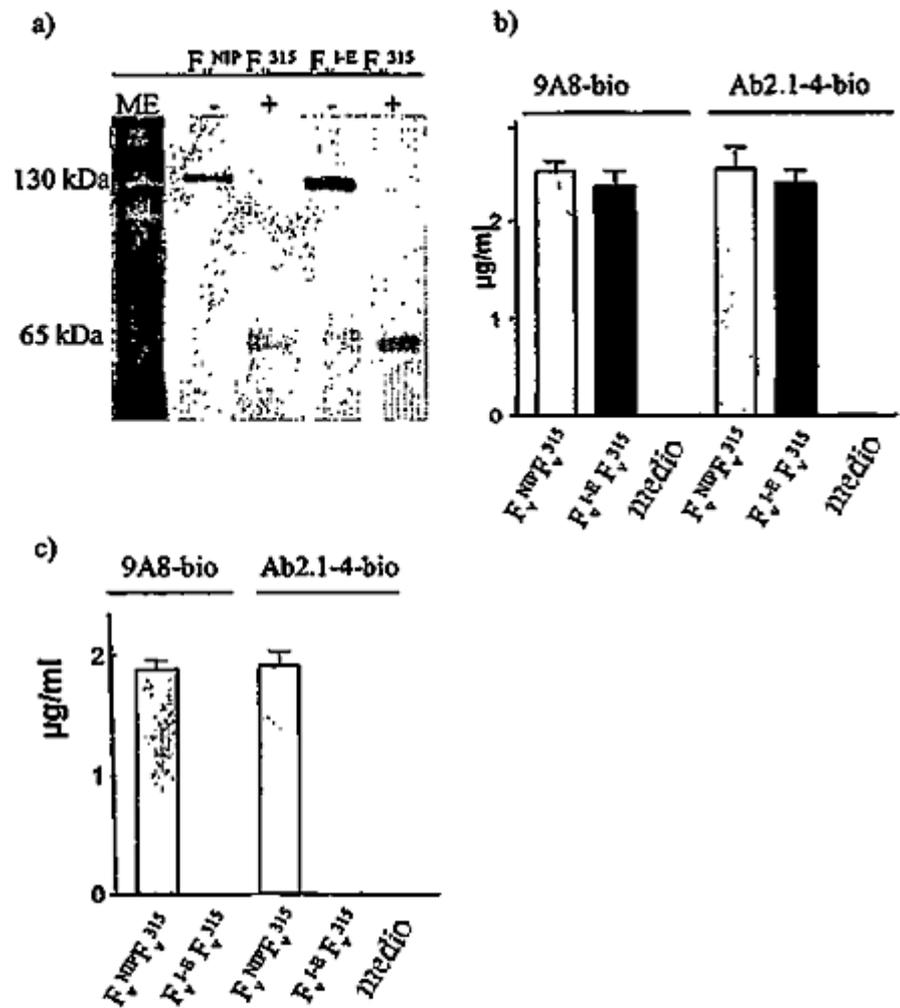


Fig 20 Los vacciuerpos se secretan como moléculas funcionales

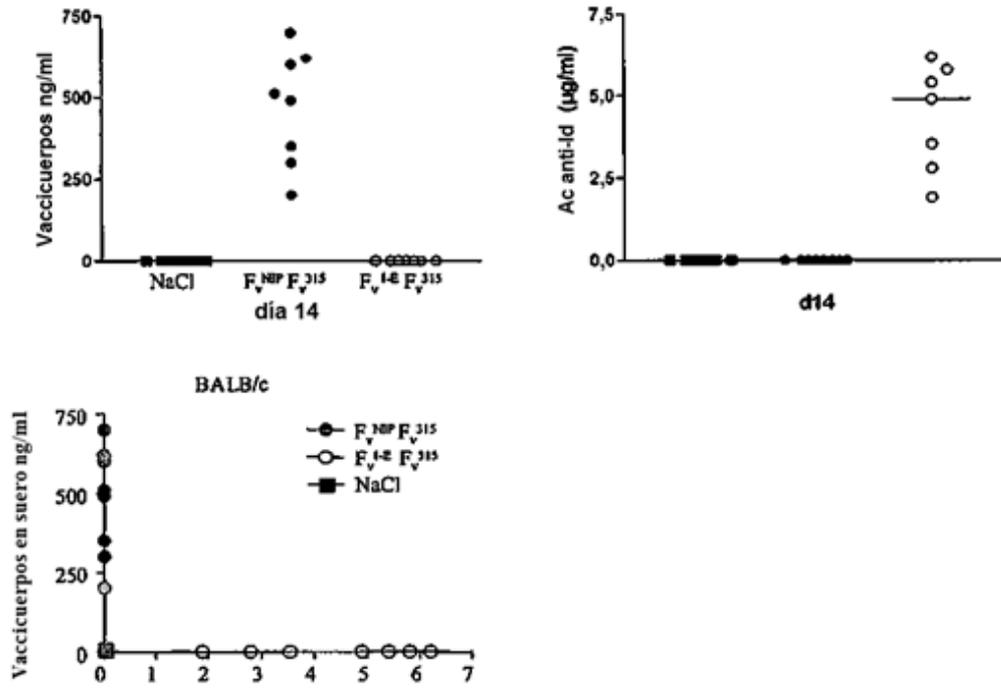


Fig 21 Producción de Vaccicuerpos mediante inyección intramuscular de plásmidos de ADN desnudo seguida de electroporación *in vivo*

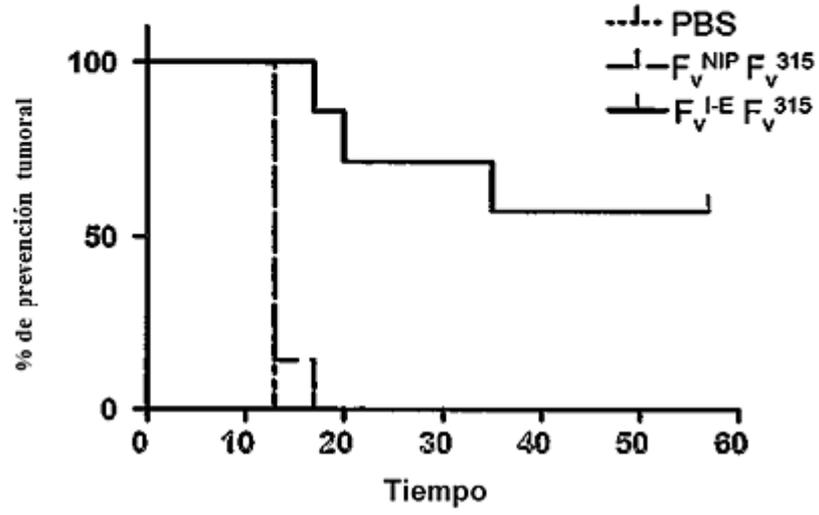


Fig 22 Prevención tumoral

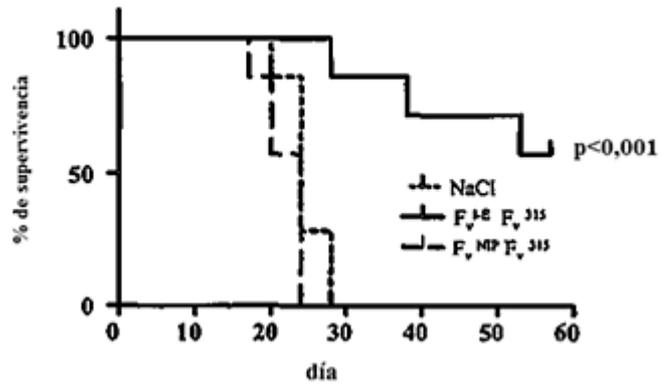


Fig 23 Inducción de inmunidad protectora contra el plasmocitoma MOPC 315.4

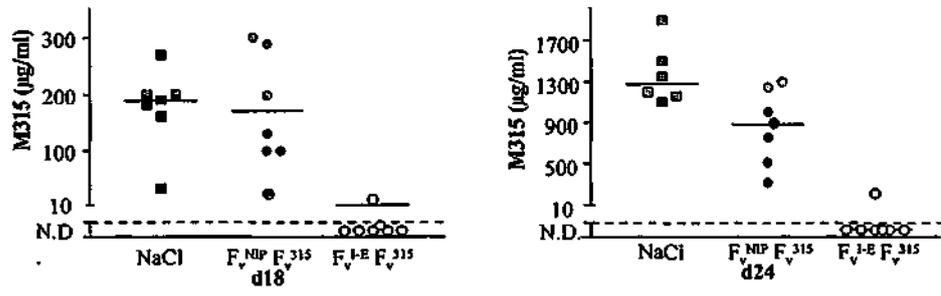


Fig 24 Nivel de proteína de mieloma M315 en suero de ratones en el a) día 18 y b) día 24 después de la estimulación de las MOPC315.4

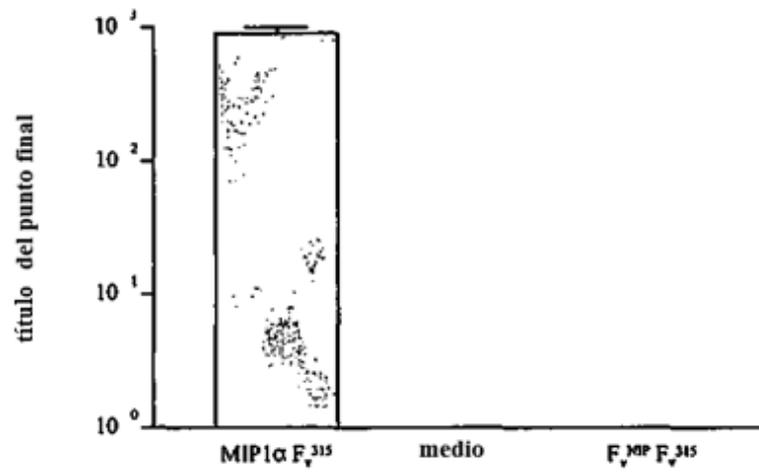


Fig 25 Los Vaccicuerpos de quimiocinas se secretan como moléculas funcionales.