

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 570 973**

51 Int. Cl.:

A61K 39/385 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.05.2009 E 13189439 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.03.2016 EP 2711021**

54 Título: **Productos y métodos para la estimulación de una respuesta inmunitaria**

30 Prioridad:

02.05.2008 US 49814 P

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

23.05.2016

73 Titular/es:

**BLINK THERAPEUTICS LIMITED (100.0%)
Mercury House 19-21 Chapel Street
MarlowBuckinghamshire SL7 3HN, GB**

72 Inventor/es:

**BATISTA, FACUNDO;
ECKL-DORNA, JULIA;
BARRAL, PATRICIA y
CERUNDOLO, VINCENZO**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 570 973 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

Productos y métodos para la estimulación de una respuesta inmunitaria

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos para inducir una respuesta inmunitaria específica mediada por BCR. En particular, la presente invención proporciona métodos relacionados con productos que comprenden un antígeno de unión a BCR y un inmunoestimulante.

10

Antecedentes de la invención

Dado que los anticuerpos están diseñados para reconocer específicamente y eliminar antígenos invasores, estos son armas eficaces empleadas por el sistema inmunitario para combatir, por ejemplo, la infección o el cáncer. Con el fin de provocar la producción de anticuerpos, los linfocitos B deben ser activados en un proceso que se inicia por el reconocimiento específico del antígeno a través del receptor de linfocitos B (BCR) (1). La unión al antígeno específico inicia dos procesos mediados por BCR: en primer lugar, la transmisión de señales intracelulares que regulan la entrada en el ciclo celular (2,3) y en segundo lugar, la internalización del antígeno antes de su procesamiento y la presentación en asociación con el MHC a los linfocitos T específicos (4). Los linfocitos B estimulados por los linfocitos T pueden o bien diferenciarse en células plasmáticas (CP) extrafoliculares, o convertirse en linfocitos B del centro germinal. Las CP extrafoliculares de vida corta median la secreción de la primera oleada de anticuerpos predominantemente de baja afinidad, algunos de los cuales pueden haber experimentado un cambio de clase (5). O bien, en otra alternativa, los linfocitos B del centro germinal experimentan hipermutación somática y maduración de la afinidad que conduce a la selección de clones de linfocitos B de alta afinidad que se diferencian en células plasmáticas de larga vida o en linfocitos B de memoria (6).

25

Durante el desarrollo de las respuestas inmunitarias, la absorción del antígeno mediada por BCR permite su concentración y transporte a los endosomas finales especializados que contienen moléculas del MHC de clase II recién sintetizadas (7).

30

Durante muchos años, se supuso que los péptidos eran el único determinante antigénico iniciador de las respuestas de los linfocitos T. Sin embargo, ahora es evidente que los linfocitos T también son capaces de reconocer y responder a los lípidos y glicolípidos antigénicos, presentados por las moléculas CD1 (8). La familia de los genes CD1 humanos está compuesta por cinco genes no polimórficos (*CD1A*, *CD1B*, *CD1C*, *CD1D* y *CD1E*), situada en un pequeño grupo en el cromosoma 1 (9). Por el contrario, los ratones expresan sólo moléculas CD1d. Los genes CD1 tienen una estructura intrón-exón comparable a la de los genes del MHC de clase I y codifican proteínas integrales de membrana de tipo I que consisten en dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$, similares a las moléculas del MHC de clase I, unidas no covalentemente a la microglobulina $\beta 2$. De una manera similar a las moléculas del MHC de clase II, las proteínas CD1 median la presentación de los lípidos antigénicos en la superficie de las CPA después de que se cargan o procesan en compartimentos intracelulares (10). La CD1d se expresa en diversas células hematopoyéticas incluyendo células dendríticas, timocitos, linfocitos B, linfocitos T y monocitos.

35

40

La inmunogenicidad de un antígeno puede ser intensificada mediante el uso de un inmunoestimulante. La α -galactosilceramida (α GalCer), por ejemplo, un glicolípido derivado de una esponja marina, es un antígeno celular reconocido por iNKT (linfocito T citolítico natural invariante) bien caracterizado, con capacidad demostrada para estimular fuertemente tanto los linfocitos iNKT murinos como humanos (14,15). Además, también se ha sugerido que la α GalCer es útil como un inmunoestimulante cuando se administra junto con el antígeno (US2003/0157135) o cuando se une directamente a un antígeno (WO2007/051004).

45

50

Los agonistas de los TLR (receptor de tipo Toll) también han sido utilizados como inmunoestimulantes. La familia TLR consiste ahora en 13 miembros: aunque sólo TLR1 a TLR10 se han identificado en los seres humanos. Los TLR son miembros de la superfamilia que contiene el dominio toll/IL-IR (TIR) y existe una considerable homología entre los dominios citoplasmáticos de todos los miembros de la familia (Ulevitch, Nature reviews, July 2004, Vol 4, 512-520). Los TLR se pueden dividir en dos categorías de acuerdo con el sitio en la célula en el que reconocen sus ligandos particulares. Los TLR 1, 2, 4, 5 y 6 se expresan en la superficie de la célula en la que median el reconocimiento de productos bacterianos. Por otro lado un subconjunto de TLR, como los TLR 3, 7, 8 y 9 están localizados en compartimentos intracelulares donde pueden responder a los ácidos nucleicos.

55

60

En la actualidad, sigue habiendo una necesidad de composiciones y métodos para inducir una respuesta inmunitaria mediada por BCR específica eficiente.

Sumario de la invención

Para la producción de anticuerpos específicos se requiere la activación altamente regulada de linfocitos B. Este proceso es iniciado por el reconocimiento específico del antígeno a través del receptor de linfocitos B (BCR), lo que conduce a la señalización intracelular temprana seguida por el reclutamiento de linfocitos T cooperadores

65

específicos. Los inventores han ideado nuevos productos y métodos para inducir respuestas inmunitarias específicas del antígeno mediadas por BCR a un antígeno, productos y métodos que generalmente emplean el uso de un soporte con el antígeno fijado al mismo, es decir, un antígeno en partículas. También puede estar fijado al soporte un inmunoestimulante o puede proporcionarse en forma soluble junto con el antígeno en partículas.

La invención se basa en el descubrimiento de los inventores de que la unión específica del antígeno en partículas al BCR y la subsiguiente internalización depende de la avidéz global del antígeno presente en la superficie como la vista por el BCR en un linfocito B. Esta observación es más probable que se interprete como un requisito para un grado mínimo de agrupación del BCR necesario para desencadenar la internalización del antígeno en partículas.

El uso de un soporte permite una regulación fina de la densidad de antígeno y de este modo de la avidéz. La internalización mediada por BCR del antígeno en partículas puede producirse incluso en respuesta a un antígeno de baja afinidad, siempre que se exceda un umbral definido de avidéz. El antígeno en partículas es captado entonces de manera eficiente por un linfocito B a través de la unión al BCR, lo que conduce a una respuesta(s) inmunitaria mediada por BCR específica del antígeno. El ser capaz de regular la densidad y, por lo tanto, la avidéz en el soporte, representa un mecanismo exquisito que permite el control fino y la modulación de las respuestas inmunitarias específicas del antígeno. Mediante la variación de la densidad del antígeno sobre el soporte, se puede influir y regular la respuesta inmunitaria. El antígeno en partículas, es decir, el soporte con el antígeno fijado al mismo, se presenta a un linfocito B en combinación con un inmunoestimulante. Por "combinación" se entiende que o bien el inmunoestimulante está también fijado al soporte, o que el inmunoestimulante se administra conjuntamente con el antígeno en partículas.

La administración "conjunta" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a la administración de un inmunoestimulante y un antígeno soluble en partículas como se divulga en la presente memoria, ya sea simultáneamente en una composición o simultáneamente en diferentes composiciones, o secuencialmente. Con respecto a la administración secuencial, el inmunoestimulante y el antígeno en partículas se administran separados por un intervalo de tiempo que todavía permite que el inmunoestimulante aumente la respuesta inmunitaria específica del antígeno.

Una vez que el antígeno en partículas ha sido internalizado por un linfocito B específico, los efectos inmunoestimulantes provocan una intensificación de la respuesta inmunitaria específica. El mecanismo de intensificación puede, por ejemplo, implicar la presentación del antígeno y/o inmunoestimulante por los linfocitos B a los linfocitos T, tales como los linfocitos iNKT, la secreción de citocinas o quimiocinas, la participación de las células dendríticas, o cascadas de células implicadas en el sistema inmunitario. En cualquier caso, dará lugar a una retroalimentación estimuladora para el linfocito B, lo que se traduce en una intensificación de la respuesta inmunitaria específica al antígeno.

La combinación del antígeno en partículas de unión a BCR y el inmunoestimulante soluble conduce a una intensificación de la respuesta inmunitaria específica en comparación con el antígeno soluble. Aunque el uso del inmunoestimulante soluble, tal como la α -GalCer, puede conducir a la absorción no específica del inmunoestimulante (como se discute en más detalle a continuación), el uso de un antígeno en forma de partículas junto con un inmunoestimulante soluble aumenta la inmunogenicidad del antígeno y se traduce en una intensificación de las respuestas inmunitarias específicas del antígeno.

Una respuesta inmunitaria aún más intensificada se consigue fijando el antígeno y el inmunoestimulante al mismo soporte. De esta forma, el antígeno y el inmunoestimulante son así internalizados conjuntamente por un linfocito B diana de una manera dependiente de BCR. Tras la internalización del antígeno en partículas mediada por BCR, el linfocito B puede presentar el antígeno y dependiendo del inmunoestimulante, también el inmunoestimulante (tal como los antígenos lipídicos inmunoestimulantes) a uno o más tipos de linfocitos T. El linfocito T activado, a su vez (directa o indirectamente, es decir, a través de otras células) estimula la diferenciación del linfocito B. Inmunoestimulantes alternativos (tales como ligandos de TLR endosomales) pueden desencadenar cascadas intracelulares que dan como resultado, por ejemplo, la activación celular o la secreción de citocinas que pueden potenciar otras respuestas de células inmunitarias. Además, es posible que el inmunoestimulante pueda intensificar la maduración de las CD (por ejemplo, mediante el reclutamiento de ayuda en forma de desarrollo de iNKT) y, como consecuencia activar la presentación de antígeno en su superficie en combinación con moléculas del MHC a linfocitos T CD4+ cooperadores específicos. Tras la estimulación, estos linfocitos T CD4+ cooperadores específicos pueden entonces proporcionar la ayuda necesaria para el desarrollo de linfocitos B específicos de antígeno. Por lo tanto a través de cada uno de estos mecanismos o una combinación de estos mecanismos, intensifican las respuestas inmunitarias específicas del antígeno mediante la conjugación del antígeno y el inmunoestimulante sobre una superficie.

El documento WO2007/051004 sugiere unir directamente un antígeno con un inmunoestimulante para formar un conjugado, pero no sugiere los productos y métodos de la presente invención.

Aunque el grueso del antígeno en partículas será captado por los linfocitos B a través el BCR específico, determinando así la especificidad de la respuesta inmunitaria, las células dendríticas (CD) y los macrófagos pueden

captar el antígeno en partículas a través de micropinocitosis y fagocitosis, lo que puede contribuir a la respuesta inmunitaria global observada.

Como se mencionó anteriormente, el inmunoestimulante soluble es captado generalmente por las células de una manera relativamente no específica, potencialmente mediada por receptores tales como el receptor de LDL en el caso de los lípidos inmunoestimulantes, tales como la α GalCer. Sin embargo, la conjugación de inmunoestimulantes en una forma de partículas inhibe el mecanismo empleado por inmunoestimulantes solubles para entrar en los linfocitos B. Los inventores han demostrado que cuando los inmunoestimulantes están presentes en forma de partículas, no pueden entrar en los linfocitos B a través de los mismos mecanismos no específicos empleados por los inmunoestimulantes solubles.

Por lo tanto, como un inmunoestimulante en partículas no puede entrar en los linfocitos B de una manera no específica, este no desencadena respuestas inmunitarias no específicas. Con el fin de acceder a la célula diana, los inmunoestimulantes en partículas requieren una absorción específica. Esto se consigue a través de la conjugación con el antígeno para permitir la internalización mediada por BCR. Este mecanismo de internalización es más eficiente en comparación con un inmunoestimulante soluble y, por lo tanto, se consiguen respuestas inmunitarias intensificadas y específicas.

Los inventores han demostrado que los inmunoestimulantes en partículas pueden entrar a las células específicas a través de la inclusión de un antígeno en la superficie a través de un mecanismo de internalización mediado por BCR. Los inventores han demostrado además que este mecanismo de internalización del antígeno en partículas representa un mecanismo más eficiente de internalización en comparación con el observado para inmunoestimulantes solubles, como se demuestra por la intensificación en las respuestas inmunitarias específicas de antígeno.

Por lo tanto, la presentación de un antígeno y un inmunoestimulante en el mismo soporte se traduce en (i) la administración específica del antígeno en partículas a una célula que expresa y la internalización mediada por BCR (ii) la intensificación de la respuesta inmunitaria específica.

Los inventores han demostrado además que si un agente (tal como un inmunoestimulante) está fijado a un soporte (en ausencia de un antígeno de unión a BCR sobre el soporte), el agente no es absorbido por un linfocito B, aunque es internalizado por las células dendríticas. Por lo tanto, los métodos y productos descritos en la presente memoria, se pueden utilizar para la administración dirigida de un agente, tal como un inmunoestimulante, a las células dendríticas, es decir, la administración preferencial a las células dendríticas frente a los linfocitos B.

Con respecto a los lípidos de inmunoestimulantes, los inventores han encontrado que la absorción mediada por BCR específica de lípidos en partículas inmunoestimulantes presentadas por CD1d, representa un medio eficaz de intensificación de las respuestas de linfocitos B dependientes de NKT invariantes (iNKT) in vivo. Este mecanismo es eficaz en un amplio intervalo de afinidades por el antígeno, pero depende de si se excede un umbral avidez estrechamente regulado necesario para la internalización mediada por BCR y la posterior presentación dependiente de CD1d del inmunoestimulante lipídico en partículas. Posteriormente, los linfocitos iNKT proporcionan la ayuda necesaria para estimular la proliferación y diferenciación de linfocitos B. Curiosamente los linfocitos B estimulados por iNKT se desarrollan en focos extrafoliculares y median la producción de títulos altos de IgM específica y anticuerpos que han experimentado un cambio de clase temprano específicos. Por lo tanto, los inventores han demostrado que en respuesta a lípidos en partículas inmunoestimulantes, los linfocitos iNKT son reclutados para facilitar la activación de linfocitos B, lo que se traduce en la intensificación de las respuestas de anticuerpos a antígenos específicos.

Además, los inventores han encontrado que los linfocitos B estimulados con un soporte que tiene un antígeno y un agonista de TLR unido al mismo conduce a la proliferación y diferenciación tanto in vitro como in vivo y se traduce en una intensificación de la producción de anticuerpos específicos de antígeno. De modo similar, la respuesta inmunitaria específica de antígeno intensificada observada depende de la superación de un umbral de avidez necesario para la internalización mediada por BCR.

Por lo tanto, los inventores han utilizado el BCR como un medio para lograr la internalización eficiente y selectiva del antígeno en partículas, así como la administración selectiva y la internalización de un inmunoestimulante unido al antígeno en partículas, lo que conduce a un aumento de la respuesta inmunitaria específica.

En la presente memoria se divulga un producto capaz de la internalización mediada por BCR que comprende:

- (i) un soporte, y
- (ii) un antígeno de unión a BCR fijado al soporte.

En la presente memoria se divulga una composición farmacéutica que comprende un producto tal como se divulga en la presente memoria y un vehículo adecuado.

En la presente memoria se divulga un producto o composición como se divulga en la presente memoria para su uso como una vacuna.

5 La invención proporciona un método para inducir una respuesta inmunitaria específica de antígeno de acuerdo con la reivindicación 1.

10 En la presente memoria se divulga un método para aumentar la inmunogenicidad de un antígeno de unión a BCR en un sujeto, que comprende administrar al sujeto un producto que comprende un soporte y dicho antígeno fijado al soporte y en el que un inmunoestimulante o bien se fija al soporte o se administra conjuntamente con dicho producto.

15 En la presente memoria se divulga un proceso para la fabricación de un producto como se divulga en la presente memoria, que comprende las etapas de

- (a) fijar un antígeno de unión a BCR a un soporte y opcionalmente
- (b) fijar un inmunoestimulante al soporte,

opcionalmente llevando a cabo las etapas (a) y (b) en orden inverso.

20 En la presente memoria se divulga un método para aumentar la respuesta inmunitaria específica de antígeno frente a un antígeno de unión a BCR en un sujeto, comprendiendo el método las etapas de

- (a) fijar el antígeno a un soporte y
- (b) fijar un inmunoestimulante al soporte,
- 25 opcionalmente llevando a cabo las etapas (a) y (b) en orden inverso, y
- (c) administrar el soporte a un sujeto,

para permitir la internalización mediada por BCR específica y la activación de linfocitos B.

30 En la presente memoria se divulga un soporte para su uso en la preparación de un producto o composición como se divulga en la presente memoria, en el que un inmunoestimulante está fijado al soporte.

35 En la presente memoria se divulga un método para intensificar una respuesta inmunitaria mediada por BCR en un sujeto, que comprende administrar a un sujeto un producto o composición como se divulga en la presente memoria.

40 En la presente memoria se divulga un método para inducir la absorción específica de un inmunoestimulante por una célula, que comprende las etapas de

- (i) fijar un antígeno de unión a BCR a un soporte,
- (ii) fijar el inmunoestimulante a dicho soporte,
- 45 opcionalmente llevando a cabo las etapas (i) y (ii) en orden inverso,
- y
- (iii) poner en contacto la célula con dicho soporte para permitir la internalización mediada por BCR específica y la activación de los linfocitos B.

50 En la presente memoria se divulga un método de administración de un antígeno de unión a BCR y un inmunoestimulante a una célula para provocar una respuesta inmunitaria específica de antígeno, que comprende

- (i) fijar un antígeno de unión a BCR a un soporte, con una primera densidad
- (ii) fijar el inmunoestimulante a dicho soporte, opcionalmente llevando a cabo las etapas (i) y (ii) en orden inverso,
- 55 y
- (iii) poner en contacto el soporte con una células
- (iv) ensayar la célula para determinar la activación mediada por antígeno, opcionalmente repitiendo las etapas (ii) a (iv) con una densidad variada del antígeno.

60 En la presente memoria se divulga un método de producción de un anti-suero contra un antígeno, comprendiendo dicho método introducir un producto o composición como se divulga en la presente memoria en un mamífero no humano y recuperar el suero inmunológico de dicho mamífero.

65 En la presente memoria se divulga un suero inmunológico que puede obtenerse por métodos descritos en la presente memoria. En un aspecto adicional, la invención proporciona un anticuerpo, que puede obtenerse a partir de dicho suero.

En la presente memoria se divulgan linfocitos B productores de anticuerpos específicos que se pueden obtener mediante los métodos descritos en la presente memoria.

En la presente memoria se divulgan linfocitos B inmortalizados que producen anticuerpos específicos (hibridoma) que se pueden obtenerse por los métodos descritos en la presente memoria.

5 En la presente memoria se divulga un método de inmunización pasiva contra una enfermedad, comprendiendo dicho método administrar a un sujeto un suero inmunológico que contiene anticuerpos como se describe en la presente memoria.

10 En la presente memoria se divulga un producto o composición como se describe en la presente memoria para su uso como un medicamento.

15 En la presente memoria se divulga un producto o composición como se describe en la presente memoria para su uso en un método para el tratamiento del cáncer, una enfermedad infecciosa, una alergia o una enfermedad autoinmunitaria.

20 En la presente memoria se divulga el uso del producto o composición como se describe en la presente memoria en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer, una enfermedad infecciosa, una alergia o una enfermedad autoinmunitaria.

25 En la presente memoria se divulga un método para generar una célula inmortalizada, comprendiendo dicho método las etapas de

- (i) poner en contacto un linfocito B con un producto o composición como se describe en la presente memoria y
- (ii) inmortalizar el linfocito B de la etapa (i).

30 La inmortalización de los linfocitos B puede lograrse por diversos medios, como por ejemplo (pero sin limitarse a) transformación con un virus adecuado, fusión con otra célula inmortalizada o unión con CD40.

35 En la presente memoria se divulga un método para generar linfocitos B inmortalizados, comprendiendo el método la etapa de (i) inmortalizar linfocitos B ex vivo en la presencia del producto o la composición descritos en la presente.

40 La inmortalización de los linfocitos B puede lograrse por diversos medios, como por ejemplo (pero sin limitarse a) transformación con un virus adecuado, fusión con otra célula inmortalizada, unión con CD40.

45 En la presente memoria se divulga un método para generar un clon de un linfocito B inmortalizado capaz de producir un anticuerpo monoclonal, comprendiendo el método:

- (i) poner en contacto un linfocito B ex vivo con un producto o composición como se describe en la presente memoria y
- (ii) inmortalizar el linfocito B de la etapa (i).

50 La inmortalización de los linfocitos B puede lograrse por diversos medios, como por ejemplo (pero sin limitarse a) transformación con un virus adecuado, fusión con otra célula inmortalizada o unión con CD40. El método puede comprender además la etapa de (iii) seleccionar los linfocitos B transformados para la especificidad del antígeno. El método puede comprender además el aislamiento del linfocito B inmortalizado.

55 En la presente memoria se divulga un método para generar un clon de un linfocito B inmortalizado capaz de producir un anticuerpo monoclonal, comprendiendo el método:

- (i) inmortalizar una población de células que comprende o consiste en linfocitos B en la presencia de un producto o composición como se describe en la presente memoria.

60 La inmortalización de los linfocitos B puede lograrse por diversos medios, como por ejemplo (pero sin limitarse a) transformación con un virus adecuado, fusión con otra célula inmortalizada o unión con CD40.

65 El método puede comprender además (ii) seleccionar los linfocitos transformados para la especificidad del antígeno. El método puede comprender (iii) aislar el linfocito B inmortalizado.

El linfocito B puede ser un linfocito B humano. El linfocito B puede ser un linfocito B de memoria, preferiblemente un linfocito B humano.

Los métodos descritos anteriormente pueden comprender además la etapa de aislar anticuerpos monoclonales a partir de dicho linfocito B inmortalizado. En la presente memoria se divulgan anticuerpos que pueden obtenerse por los métodos descritos en la presente memoria.

En la presente memoria se divulga un método para acelerar la producción de anticuerpos específicos del antígeno, comprendiendo el método introducir un producto o composición como se describe en la presente memoria en un mamífero no humano y recuperar los anticuerpos de dicho mamífero.

En la presente memoria se divulga un método para inhibir la absorción no específica de un inmunostimulante por un linfocito B, comprendiendo el método la etapa de fijar dicho inmunostimulante a un soporte antes del contacto con dicho linfocito B.

5 En la presente memoria se divulga un método para inducir o aumentar una respuesta inmunitaria específica del antígeno a un antígeno de unión a BCR en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto un producto que comprende un soporte y dicho antígeno fijado al soporte y en el que el antígeno en forma soluble no es capaz de inducir una respuesta de un linfocito T_H cuando se administra a un sujeto. El antígeno puede comprender o puede ser un hidrato de carbono o un péptido. Además, los antígenos pueden comprender o pueden ser péptidos modificados
10 tales como péptidos fosforilados o péptidos glicosilados.

En la presente memoria se divulga un método de administración de un agente, tal como un inmunostimulante, preferentemente a las células dendríticas frente a los linfocitos B, comprendiendo el método

15 (i) fijar el agente a un soporte,
(ii) poner en contacto una población de células con el agente fijado al soporte, en el que la población de células comprende linfocitos B y células dendríticas.

20 El agente puede ser un inmunostimulante tal como se describe en la presente memoria. El soporte puede ser como se describe en la presente memoria.

Breve descripción de las figuras y las tablas

25 **Fig. 1. Los linfocitos B internalizan los conjugados en partículas a través del BCR y presentan α GalCer a los linfocitos NKT.**

(A) *Panel superior*, se recubrieron perlas de sílice con liposomas de DOPC/PE-biotina/ α GalCer, liposomas de DOPC/PE-biotina/ α GalCer y HEL biotinilada (α GalCer+HEL) o liposomas de DOPC/PE-biotina y HEL biotinilada (HEL). La unión del antígeno a las perlas recubiertas con liposomas se detectó por transferencia Western con anticuerpo anti-HEL. *Panel inferior*, las perlas recubiertas con liposomas marcados con Alexa-488 se detectaron por análisis FACS (línea de color negro) en comparación con las perlas recubiertas con liposomas no marcados (perfil relleno gris).
(B-H) Presentación de la α GalCer en partículas por los linfocitos B. (B) Los linfocitos B MD4 se incubaron con α GalCer soluble (15 ng/ml) o 0,1 μ l de partículas que contienen α GalCer. Las células se lavaron y se incubaron con células DN32.D3. La presentación de α GalCer a los linfocitos iNKT se midió por ELISA como la producción de IL2. (C) Los linfocitos B MD4 B se pulsaron como en (B) con las partículas que contienen α GalCer (O), HEL (\blacktriangle) o HEL- α GalCer (\blacksquare). Los linfocitos B WT (Δ) se pulsaron con partículas HEL- α GalCer y se utilizaron como control. (D) Los linfocitos B MD4 se cebaron con partículas HEL- α GalCer y se incubaron durante 2 h con un anticuerpo de bloqueo anti-CD1d (α CD1d) o un control de isotipo (control Ig) antes del cocultivo con linfocitos NKT. (E) Las partículas que contienen α GalCer y diferentes densidades de HEL se analizaron por FACS después de la tinción con un anticuerpo anti-HEL. Se muestran los valores medios de la intensidad de fluorescencia (mfi). (F) Se realizaron experimentos de cocultivo con linfocitos B MD4 pulsados con partículas que contienen α GalCer y diferentes densidades de HEL, HEL^{RDGN} o HEL^{RKD} (escala de grises). (G) Presentación de los conjugados HEL- α GalCer por los linfocitos B que expresan BCR D.13 IgM específico de HEL (\blacksquare) o una quimera D1.3 IgM/H2 (O). (H) Se realizaron experimentos de cocultivo con linfocitos B MD4 B pulsados con partículas que contienen HEL- α GalCer (\blacksquare), α GalCer (\blacktriangle), HEL-Gal (α 1 \rightarrow 2)GalCer (O) o Gal(α 1 \rightarrow 2)GalCer (Δ). (I) Se realizaron experimentos de cocultivo con linfocitos B MD4 pulsados con partículas que contienen HEL-IMM47 (\blacksquare) y partículas que contienen I-MM47 solo (\diamond).

50 **Fig. 2. Los linfocitos iNKT ayudan a la proliferación in vivo de linfocitos B dependiente del antígeno.**

Se transfirieron linfocitos B MD4 marcados con CFSE en ratones WT estimulados con partículas que contienen α GalCer y/o HEL. Los ratones que recibieron partículas HEL- α GalCer pero no células se utilizaron como control (simulacro). En el día 5, se extrajeron los bazo de los ratones receptores para el análisis FACS. (A) Se detectó la proliferación de células de unión a HEL del donante como dilución de CFSE. (B y D) Los experimentos de transferencia también se realizaron usando ratones $J\alpha$ 18^{-/-} como receptores. Se representa el porcentaje de células HEL⁺(B) y CD138⁺HEL⁺(D) recuperadas de los bazo de los receptores $J\alpha$ 18^{-/-} (\boxtimes) o WT (\blacksquare). (E) El número de células secretoras de IgM específica de HEL en el bazo de los ratones receptores WT se determinó mediante ELISPOT. (F) La IgMa anti-HEL específica se midió en el día 5 en los sueros de ratones receptores WT y $J\alpha$ 18^{-/-}. Anticuerpos específicos recién detectados en los ratones receptores WT estimulados con partículas HEL- α GalCer (\blacksquare). (C) Después de la transferencia de MD4, se extrajeron los bazo de los ratones receptores el día 5 para inmunofluorescencia, microscopía. Los linfocitos B del folículo (FO) se tiñeron con B220 (rojo), las células de unión a HEL se tiñeron para HEL intracelular (verde) y los centros germinales (GC) se tiñeron con PNA (azul). Los focos extrafoliculares (EF) de unión a HEL de las células plasmáticas solamente se detectaron en ratones estimulados con partículas HEL- α GalCer.

65

Fig 3. La densidad/afinidad del antígeno modula la proliferación de linfocitos B dependiente de iNKT y la producción de anticuerpos.

Los experimentos de transferencia de MD4 se realizaron como en la Fig. 2. Los ratones receptores WT fueron estimulados con partículas que contienen α GalCer y dos densidades diferentes de HEL o HEL^{RKD}. (A) La proliferación de MD4 se detectó como dilución de CFSE en la población de unión a HEL. (B) Porcentaje de células HEL⁺ recuperadas a partir de los bazos receptores (alta densidad: alta, baja densidad: baja). (C) La IgMa específica de anti-HEL se detectó el día 5 en los sueros de los ratones receptores estimulados con perlas que contienen α GalCer y: ■, HEL alta densidad; □, HEL baja densidad; ●, HEL^{RKD} alta densidad; ○, HEL^{RKD} baja densidad. (D-F) Los ratones WT recibieron células MD4 y partículas que contienen HEL- α GalCer o partículas HEL y α GalCer soluble. La proliferación de células de los donantes se detectó como dilución de CFSE (D). Se detectó una proliferación más extensa en las células de donante HEL⁺ en respuesta a los conjugados HEL- α GalCer (línea negra) en comparación con α GalCer soluble (línea gris de puntos). Los ratones que recibieron células MD4, pero no perlas se utilizaron como control (perfil sólido de color gris). (E) Porcentaje de células del donante HEL⁺ en los ratones que recibieron α GalCer-HEL soluble (⊗) o en partículas (■). (F) IgMa específica anti-HEL detectada en ratones receptores que recibieron perlas que contienen HEL- α GalCer (■) o perlas HEL más α GalCer soluble (○).

Fig 4. La inmunización con antígeno en partículas/ α GalCer induce IgM y anticuerpos específicos que han sufrido un cambio de clase temprano.

(A y C) Se inmunizaron ratones C57BL/6 (4 ratones/grupo) con 10 μ l de partículas que contienen α GalCer (□), antígeno (⊗) o antígeno/ α GalCer (■). CGG (A) o HEL (C) se utilizaron como antígenos. Los anticuerpos específicos se detectaron en los sueros de los ratones a los 7 y 14 días después de la inmunización. (B) Se inmunizaron ratones WT (■) y $J\alpha 18^{-/-}$ (⊗) (3 ratones/grupo) con partículas que contienen CGG o CGG/ α GalCer y sangrados el día 7.

Fig 5. La reticulación del antígeno y α GalCer intensifica las respuestas de anticuerpos específicos.

(A) Se inmunizaron ratones C57BL/6 (4 ratones/grupo) con 1 μ l de partículas recubiertas con CGG- α GalCer más 1 μ l de partículas recubiertas con OVA (⊗) o 1 μ l de partículas recubiertas con OVA- α GalCer más 1 μ l de partículas recubiertas con CGG (■). Los anticuerpos anti-CGG y anti-OVA específicos se midieron en el día 7. (B) Los anticuerpos anti-CGG específicos detectados en ratones C57BL/6 (3 ratones/grupo) inmunizados con 1 μ l de partículas que contienen CGG- α GalCer (■) o 1 μ l de partículas CGG más 150 ng de α GalCer soluble (⊗). Los ratones fueron sangrados el día 7 y los anticuerpos anti-CGG específicos se detectaron por ELISA.

Fig 6. Presentación de α GalCer-HEL en partículas por linfocitos B de la zona marginal (MZ) y folicular (Fo).

Se seleccionaron linfocitos B MD4 de la zona MZ y Fo por FACS y se pulsaron con α GalCer-HEL en partículas antes de la incubación con células DN32.D3. La presentación de α GalCer se midió como producción de IL-2.

Fig. 7. La afinidad por el antígeno y la densidad modula la respuesta de los linfocitos B a la estimulación con conjugados de antígeno en partículas-CpG in vitro.

(A) Se incubaron linfocitos B MD4 marcados con CFSE con microesferas recubiertas con HEL, CpG o HEL y CpG. Panel superior izquierdo, la proliferación fue detectada como dilución de CFSE. Panel inferior izquierdo, la diferenciación de células plasmáticas se detectó como regulación positiva de CD138 (Syndecan-1). Panel central y derecho, la secreción de IL-6 y la producción de IgMa específica de HEL se midió en el sobrenadante de los cultivos por ELISA. (B) Las células MD4 se estimularon con microesferas que contienen los mutantes de afinidad a HEL HELRD, HEL^{KD}, HEL^{RKD} en presencia o ausencia de CpG. La IL-6 y la secreción de IgMa específica de HEL se detectó por ELISA. (C) Los linfocitos B MD4 marcados con CFSE se estimularon con partículas que contienen CpG y diferentes densidades de HELRD, HEL^{KD}, HEL^{RKD}. Panel superior, IL-6 e IgMa se midieron como antes. Las barras negras representan alta densidad, las barras grises intermedia y las barras no rellenas baja densidad. Panel inferior, la proliferación se detectó como la dilución de CFSE

Fig. 8 Los conjugados de HEL-CpG en partículas conducen a una extensa proliferación y diferenciación de células plasmáticas in vivo.

(A) Se transfirieron linfocitos B MD4 marcados con CFSE a ratones WT estimulados con partículas que contienen HEL y/o CpG. El día 4 se extrajeron los bazos de los ratones receptores para el análisis FACS. Panel superior izquierdo, la proliferación fue detectada como dilución de CFSE. Panel inferior izquierdo, las células plasmáticas MD4 se identificaron mediante la unión a HEL intracelular y la regulación positiva del marcador de superficie CD138. El porcentaje de células CD138 positivas de la población MD4 se representa en el panel central. Panel derecho, Detección de IgMa específica de HEL en el suero por ELISA.

Fig. 9 La afinidad por el antígeno y la densidad modula la respuesta de los linfocitos B a la estimulación con conjugados de antígeno en partículas-CpG in vivo.

(A-B) Se transfirieron linfocitos B MD4 marcados con CFSE a ratones WT estimulados con partículas que contienen HELRD, HEL^{KD}, HEL^{RKD} en presencia o ausencia de CpG a alta densidad. (A) Panel superior, la proliferación se evaluó mediante la dilución de CFSE. Panel inferior, las células plasmáticas MD4 fueron

reveladas por su elevada unión a HEL intracelular y la regulación positiva de CD138. (B-D) Los linfocitos B MD4 se cotransfirieron con microesferas que contienen HELRD, HEL^{KD}, HEL^{RKD} en presencia o ausencia de CpG a alta (B), intermedia (C) o baja densidad (D). Los paneles superiores representan el porcentaje de células plasmáticas en la población MD4, los paneles inferiores muestran los niveles de IgMa en el suero, medido por ELISA.

Fig. 10 La reticulación del antígeno en partículas y CpG intensifica las respuestas de anticuerpos específicos in vivo.

(A) Se inmunizaron ratones C57BL/6 por vía intraperitoneal (3 ratones/grupo) con 10 µl de partículas recubiertas, ya sea con CGG o CpG o ambos. Las IgG específicas de CGG, IgG1, IgG2b e IgG2c se evaluaron el día 14. (B) Se inmunizaron ratones C57BL/6 por vía intraperitoneal (3 ratones/grupo) con, Panel izquierdo 1 µl de partículas recubiertas con CGG más 1 µl recubiertas con OVA-CpG o 1 µl de partículas recubiertas con CGG-CpG más 1 µl recubiertas con OVA. Panel derecho, se administraron a ratones WT 10 µl de partículas recubiertas con OVA más 10 µl recubiertas con CGG-CpG o 10 µl de partículas recubiertas con OVA-CpG más 10 µl recubiertas con CGG. Las IgG específicas de CGG y OVA se evaluaron por ELISA el día 14.

Fig. 11 Caracterización de HEL y/o partículas que contienen CpG

(A) Panel izquierdo, se recubrieron perlas de estreptavidina con HEL biotinilada solo (línea de color negro) o en combinación con CpG biotinilado (perfil relleno gris). Panel derecho, la unión del antígeno a las perlas se detectó mediante transferencia Western con anticuerpo policlonal anti-HEL. (B) Las perlas de estreptavidina se recubrieron con el anticuerpo monoclonal biotinilado anti-HEL F10 y CpG (gris oscuro relleno). Se logró una densidad intermedia (gris ceniza relleno) y baja (color gris claro) de F10 por la competencia del F10 con CGG biotinilado.

Fig 12. La inmunización con fosfo-péptido-DGalCer en partículas induce los anticuerpos específicos de péptidos IgM e IgG.

Se inmunizaron ratones C57BL/6 (3 ratones/grupo) con 10 µl de partículas que contienen fosfo-péptido (■) o fosfo-péptido-αGalCer (■). Se detectaron anticuerpos específicos del péptido en los sueros de ratones a los 0 y 7 días después de la inmunización (dilución de suero 1: 1.000).

Fig 13.

Se inmunizaron ratones C57BL/6 (tres ratones por grupo) una vez con 1 µl de partículas recubiertas con OVA-CpC con 1 µl de partículas recubiertas con CyG o 1 µl de partículas CyG-CpG con 1 µl de partículas recubiertas con OVA. Se utilizó el ELISPOT para cuantificar el número de CSA secretoras de IgG específica de CyG de médula ósea CyG catorce días y 3 meses después de la inmunización.

Fig. 14 La absorción mediada por BCR de conjugados de Ag-CpG está regulada por la avidéz de la interacción Ag-BCR in vitro

Se estimularon linfocitos MD4 con 1 µl de partículas fluorescentes o bien sin recubrir (gris relleno) o recubiertas de HEL, HEL^K o HEL^{RKD} en ausencia (paneles superiores) o presencia (paneles inferiores) de CpG. La citometría de flujo se utilizó para evaluar la unión de las partículas: las puertas mostradas indican el porcentaje de niveles intermedios de unión a células vivas (puerta izquierda) y niveles altos de partículas (puerta derecha).

Fig. 15 La cantidad de CpG presente en las partículas que contienen Ag modula la magnitud de la proliferación y diferenciación de linfocitos B y para formar CP in vitro.

(A, B) Se estimularon linfocitos B marcados con CFSE con 1 µl de HEL en partículas conjugada con diferentes densidades de CpG. La densidad de CpG se representa de la más alta a la más baja en dirección de izquierda a derecha. La proliferación y diferenciación de linfocitos B MD4 se midieron 72 horas después de la estimulación. (A) La citometría de flujo se utilizó para medir la dilución de CFSE en células MD4 estimuladas (línea de color negro) y sin estimular (gris relleno). (B) La secreción de IL-6 (panel izquierdo) y de IgMa (panel derecho) fueron evaluados por ELISA.

Fig. 16 Ag-CpG en partículas promueve la proliferación y diferenciación de linfocitos B para formar CP EF de vida corta in vivo.

(A-D) Se transfirieron adoptivamente células MD4 B marcadas con CFSE en ratones C57BL/6 y se estimularon con 10 µl de partículas que contienen HELRD solo, CpG solo o HELRD-CpG. (A) Cuatro días después de la transferencia, se usó la citometría de flujo para medir la dilución de CFSE (paneles superiores de la izquierda) y la regulación positiva de CD138 (paneles inferiores de la izquierda) CD138 en células de unión a HEL en el bazo de ratones receptores de unión; se muestra (panel superior derecho) el porcentaje de CP MD4 (HEL intracelular, CD138⁺) presente como una proporción del total de esplenocitos totales; (panel inferior derecho) IgMa específico de HEL en suero por ELISA (B) Se utilizó la citometría de flujo se utilizó para medir la dilución de CFSE en las células de unión a HEL en los bazos de los ratones receptores en células MD4 estimuladas (línea de color negro) y sin estimular (gris relleno) en los tiempos indicados después de la estimulación. (C) (Panel izquierdo) Se usaron ELISPOT para detectar las CSA específicas de HEL del bazo y (panel derecho) Se usaron ELISA para medir la IgMa específica de HEL en suero. (D) Después de cinco días, se usó la microscopía de inmunofluorescencia (Zeiss LSM 510 metros) para detectar las células de unión a HEL (HEL intracelular, verde Alexa488) y linfocitos B foliculares esplénicos (anti-B220, rojo Alexa543). Aumento 10x, NA 0,3.

Fig 17 La avidéz de la interacción Ag-BCR y la fuerza de señalización de TLR9 modulan el grado de formación de CP in vivo.

Se transfirieron adoptivamente células MD4 B marcadas con CFSE en ratones C57BL/6 y se estimularon con 10 µl de partículas que contienen HEL y diferentes densidades de CpG. La densidad de CpG se representa de mayor a menor en dirección de izquierda a derecha. La citometría de flujo se utilizó para cuantificar (panel superior) el porcentaje de linfocitos B de unión a HEL vivos que se han sometido a la proliferación y (panel inferior) el porcentaje CP MD4 (HEL intracelular HEL, CD138+) como una proporción del total de esplenocitos.

Fig 18

(E) Se transfirieron adoptivamente células HyHEL10 B en ratones C57BL/6 y se estimularon con 10 µl de partículas recubiertas con HEL sola, CpG solo o HEL-CpG. Después de siete días se utilizaron ELISA para medir los niveles de Ig específica de HEL en el suero de los ratones receptores. (Panel izquierdo) IgM (barras sin rellenar) e IgG (barras sin rellenas) y (panel derecho) subtipos de IgG IgG1 (barra gris claro), IgG2b (barra gris medio) e IgG2c (barras de color gris oscuro). (F) Las células HyHEL10 B se estimularon con 1 µl de HEL en partículas solo, CpG en partículas solo o HEL-CpG en partículas durante siete días. Se usaron ELISA para medir los niveles de Ig específica de HEL secretada al medio de cultivo como se describe en (E).

Fig. 19 La estimulación con partículas HEL-CpG aumenta la fosforilación de p38 sostenida y es dependiente de un TLR9 funcional in vitro.

(A) Se inmovilizaron Ags biotinilados (panel izquierdo) OVA y (panel derecho) CyG sobre las partículas recubiertas con estreptavidina y se visualizaron por citometría de flujo después de la unión de anti-OVA seguido de IgG anti-AlexaFluor-488 o anti-CyG FITC de ratón en presencia (gris relleno) o ausencia (línea de color negro) de CpG. (B) La unión de HEL biotinilado a microesferas recubiertas de estreptavidina en la presencia (gris relleno) o ausencia (línea de color negro) de CpG se detectó por: (panel superior) transferencia Western utilizando un anti-HEL policlonal y (panel inferior) citometría de flujo mediante la unión de anti-HEL F10 AlexaFluor-488. (C) Linfocitos B MD4 B (panel superior) y CD derivadas de médula ósea (panel inferior) no estimuladas (gris lleno) o estimuladas con 0,2 µl de partículas que se recubrieron con HEL solo, CpG solo o HEL-CpG (línea continua). La citometría de flujo se utilizó para evaluar la unión de las partículas. Las puertas indican el porcentaje de células vivas que se unen a las partículas.

Fig. 20

Linfocitos B MD4 se estimularon con 1 µl HEL en partículas solo (barras sin rellenar), CpG en partículas solo (barras grises) o HEL-CpG en partículas (barras rellenas). Se tomaron muestras a los tiempos indicados después de la estimulación y cantidades iguales de lisados celulares enteros se sometieron a SDS-PAGE. (Panel superior) Posteriormente se realizó la transferencia Western usando anticuerpos específicos de p38 fosforilada (pp38), p38 total y actina (control de carga) para la detección. (Panel inferior) La densidad de las bandas se cuantificó por densitometría, se corrigió para el fondo, se normalizó para la densidad de la banda de actina en la misma muestra y, a continuación, en relación al punto de tiempo cero sin estimular para cada condición.

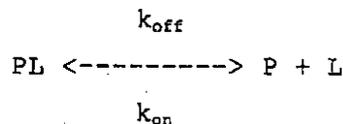
Fig. 21 La estimulación de la proliferación y diferenciación de los linfocitos B por Ag-CpG en partículas es dependiente de la avidéz por Ag in vitro.

Se estimularon linfocitos B MD4 con 1 µl de CpG en partículas recubiertas con HEL (paneles de la izquierda) o HEL^K con densidad (paneles de la derecha) alta o (paneles superiores y barras rellenas) baja (paneles inferiores y barras sin rellenar) durante 72 h. (A) La dilución de CFSE de linfocitos B estimulados (línea de color negro) y no estimulados (gris lleno de linfocitos B) se evaluó mediante citometría de flujo. (B) La secreción de IL-6 (panel izquierdo) e IgMa (panel derecho) se evaluó por ELISA.

Descripción detallada de la invención

La unión del antígeno a BCR conduce a la internalización del antígeno y su presentación a los linfocitos T, una etapa crítica en la iniciación de la respuesta inmunitaria humoral. La capacidad de los linfocitos B para internalizar y procesar el antígeno en partículas ha sido descrita por varios grupos (22-24). Esto es particularmente relevante, ya que el antígeno in vivo se encuentra a menudo en forma insoluble o anclado a una superficie de la célula (23).

La interacción de una proteína (P, tal como un BCR) con su ligando (L, tal como un antígeno) para formar un complejo (PL) puede ser descrita mediante diferentes parámetros. Como tal en bioquímica, la constante del equilibrio de disociación se puede utilizar para dar una medida de la afinidad de la interacción entre la proteína y el ligando.



La constante del equilibrio de disociación (K_D) Se define cuando la velocidad de las reacciones directa e inversa es igual de tal manera que

$$k_{\text{off}} [\text{PL}] = k_{\text{on}} [\text{P}] [\text{L}],$$

5

definiendo así la constante del equilibrio de disociación como:

$$K_D = k_{\text{off}} / k_{\text{on}} = [\text{P}] [\text{L}] / [\text{PL}].$$

10 La constante de disociación se mide en unidades molares (M), que corresponden a la concentración de ligando [L] a la que el sitio de unión en una proteína en particular está ocupado a la mitad, es decir, la concentración de ligando a la que la concentración de proteína con ligando unido [PL] es igual a la concentración de proteína sin ligando unido [P]. Cuanto menor sea la constante de disociación, más fuertemente unido está el ligando, o cuanto mayor es la afinidad entre el ligando y la proteína. Por ejemplo, un ligando con una constante de disociación nanomolar (nM) se une más estrechamente a una proteína particular de un ligando con una constante de disociación micromolar (μM). Como alternativa, la afinidad se describe comúnmente por la constante de asociación (K_A , dada en M^{-1}) que viene dada por la inversa de la K_D .

15

Además, el período de vida del complejo PL se describe en términos de la semivida del complejo y, como tal:

20

$$t_{1/2} = \ln 2 / k_{\text{off}}$$

Una $t_{1/2}$ más larga representa una interacción más estable y es consecuencia de una constante de velocidad más lenta k_{off} . El período de vida particular del complejo determinará la estimulación/activación de la proteína en cuestión si el ligando es un agonista. Esta es una cantidad importante en bioquímica, ya que las reacciones no dependen simplemente de la "afinidad" de la interacción (K_A o K_D) sino más bien de la avidéz del ligando por la proteína.

25

Aunque el término afinidad describe la fuerza de un enlace sencillo, la avidéz es el término utilizado para describir la fuerza combinada de interacciones de múltiples enlaces.

30

Como el ligando puede estar presente en diferentes densidades en una superficie, esto puede afectar a la probabilidad de re-unión tras el colapso de un complejo PL con un período de vida corto. Por lo tanto, a mayores densidades, los ligandos con k_{off} rápida pueden ser capaces de inducir respuestas similares a ligandos con alta afinidad.

35

La avidéz global del antígeno en partículas por la célula diana, generalmente, un linfocito B, depende por consiguiente tanto de la afinidad del antígeno específico como de la densidad del antígeno en la superficie del soporte.

40

Los inventores han encontrado que la unión específica del antígeno en partículas a BCR y la subsiguiente internalización depende de la avidéz global del antígeno. El uso de un soporte, tal como una perla, permite la regulación fina de la densidad del antígeno (y de este modo la avidéz). Esto, por tanto, también garantiza que incluso los antígenos de baja "afinidad" en términos de la K_A pueden ser capaces de estimular respuestas inmunitarias específicas si se presentan en una superficie a una densidad suficiente. Un inmunoestimulante, también fijado al soporte, es internalizado por la célula junto con el antígeno, lo que lleva a una intensificación de la respuesta inmunitaria específica. La intensificación observada puede resultar de la estimulación intracelular de activación o del reclutamiento de otros factores celulares que pueden conducir a la estimulación de la activación.

45

Como se describió anteriormente, la densidad del antígeno sobre el soporte también influye en la avidéz.

50

El documento US2007/0104776 (Ishii et al) describe el uso de liposomas que contienen ovoalbúmina y α -galactosil ceramida, donde la ovoalbúmina está encapsulada en el liposoma. Los liposomas muestran un efecto inhibitorio sobre la producción de anticuerpos.

55

En la presente memoria se divulga un producto capaz de la internalización mediada por BCR que comprende

- (i) un soporte y
- (ii) un antígeno de unión a BCR fijado al soporte.

60

En otras palabras, el producto es adecuado para ser internalizado por una célula diana, generalmente un linfocito B, a través de la unión a BCR. El producto puede comprender además un inmunoestimulante fijado al soporte. Tras la internalización mediada por BCR el producto provoca una respuesta inmunitaria específica de antígeno.

Cualquier soporte adecuado puede ser utilizado. El soporte debe ser adecuado para fijar un antígeno y/o un inmunoestimulante al mismo y debe ser de un tamaño adecuado para ser internalizado y procesado por una célula que expresa BCR. El soporte puede ser una partícula, por ejemplo, una perla. El soporte puede ser una microesfera. El término "microesfera" se refiere a una cáscara esférica hecha de cualquier material que tenga un diámetro muy pequeño, por lo general en el intervalo de micras o nanómetros.

El soporte puede ser de cualquier material adecuado, se pueden usar, por ejemplo, soportes de polímero o de sílice, tales como perlas de polímero o de sílice o microesferas. Las perlas adecuadas son conocidas en la técnica.

La partícula puede ser un liposoma. Los liposomas son, generalmente, estructuras de vesículas compuestas de una o más bicapas de lípidos que rodean un núcleo acuoso. Cada bicapa lipídica está compuesta de dos monocapas lipídicas, cada una de las cuales tiene una región de "cola" hidrófoba y una región de "cabeza" hidrófila. En la bicapa, las "colas" hidrófobas de las monocapas lipídicas se orientan hacia el interior de la bicapa, mientras que las "cabezas" hidrófilas se orientan hacia el exterior de la bicapa. Los métodos para fabricar preparaciones de liposomas son descritos por Bangham (Bangham et al, 1965, J Mol Biol, 13: 238) y las composiciones y métodos para estabilizar suspensiones de liposomas se describen en el documento WO2006/002642.

Se pueden usar perlas recubiertas con liposomas de acuerdo con la invención.

El soporte/partícula puede estar en el tamaño de entre 1 nm y 10 μm , preferiblemente en el intervalo de 10 nm a 10 μm , preferiblemente en el intervalo de 10 nm a 1 μm , preferiblemente en el intervalo de 50 nm a 1 μm , preferiblemente en el intervalo de 100 nm a 1 μm , más preferiblemente en el intervalo de 100 nm a 500 nm. Más preferiblemente, el tamaño del soporte está en el intervalo de 100 nm a 150 nm, más preferiblemente en el intervalo de 100 nm a 130 nm. Sin embargo, el soporte/partícula puede ser menor o mayor.

La partícula puede tener un tamaño de 100 nm o 130 nm.

En algunas realizaciones, puede ser preferible que el tamaño de la partícula se parezca a las dimensiones de un vehículo de antígeno natural, tal como un patógeno.

Se puede emplear cualquier método de fijación del inmunoestimulante y/o el antígeno al soporte siempre que el inmunoestimulante y el antígeno sean todavía capaces de provocar la intensificación de la respuesta inmunitaria deseada y específica. Por ejemplo, se puede usar un sistema de enlazador de biotina-estreptavidina. Además, pueden utilizarse liposomas con el fin de recubrir microesferas de sílice con lípidos inmunoestimulantes particulares.

Los productos y métodos de la presente invención permiten la regulación fina de la cantidad de antígeno y de la densidad del antígeno sobre el soporte. Dependiendo del antígeno particular usado, puede estar fijado a la superficie del soporte más o menos antígeno, aumentando o disminuyendo así la densidad del antígeno (y por tanto la avidéz). Diferentes antígenos pueden requerir diferentes densidades, dependiendo de su diferente K_A y K_{off} con el fin de superar el umbral de la avidéz necesaria para la internalización mediada por BCR. Por ejemplo, un antígeno de baja afinidad puede requerir una mayor densidad en la superficie de apoyo en comparación con un antígeno de alta afinidad.

Por ejemplo, los presentes inventores han utilizado el antígeno con un intervalo de afinidades que cubren aquellas que se encuentran dentro del repertorio fisiológico antes de la inmunización con el antígeno (K_A en el intervalo de $8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ a $2,1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$). Con respecto a los antígenos ensayados, se requirió una K_A mínima de $8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ (con la correspondiente k_{off} de $2,5 \text{ seg}^{-1}$) para estimular la producción de anticuerpos específicos a partir de linfocitos B específicos del antígeno transferidos in vivo.

Se hace hincapié en que los valores de afinidad descritos en la presente memoria son meramente a nivel ilustrativo y no son en modo alguno limitativos del alcance de la presente invención. Cualquier antígeno adecuado para inducir una internalización mediada por BCR se puede usar de acuerdo con la invención. La invención no se limita a los antígenos con una afinidad baja o alta particular.

Los métodos para medir la cantidad de antígeno en la superficie de soporte y el ajuste, por tanto, de su densidad se conocen en la técnica. Por ejemplo, la cantidad precisa de antígeno asociado a las perlas y, por lo tanto, su densidad, se pueden cuantificar usando transferencia Western cuantitativa o mediante la incorporación de un marcador fluorescente en el antígeno para determinar la cantidad de antígeno presente por FACS.

En la presente memoria se divulga un producto que comprende (i) un soporte, (ii) al menos un antígeno de unión a BCR fijado al soporte y, opcionalmente, (iii) al menos un inmunoestimulante fijado al soporte.

Se entiende que los productos de la presente invención comprenden un soporte con antígeno presente a una densidad (y por tanto avidéz) suficiente para permitir la internalización mediada por BCR por una célula diana, generalmente un linfocito B. Estos son, por lo tanto, adecuados para la internalización mediada por BCR.

La densidad necesaria de un antígeno particular necesaria para obtener una avidéz global suficiente para la internalización mediada por BCR puede, por ejemplo, determinarse mediante (i) la generación de soportes con diferentes cantidades de antígeno fijado a los mismos, (ii) poniendo en contacto dichos soportes con una célula diana, tal como un linfocito B, (iii) ensayando la activación de la célula diana. La activación de la célula diana indica la absorción específica del antígeno en partículas, lo que indica que el antígeno sobre ese soporte en particular tiene una densidad y avidéz suficientes para desencadenar la internalización de acuerdo con la invención.

Con el fin de generar diferentes niveles de densidad en el soporte, se puede, por ejemplo, generar primero soportes con la densidad más alta posible saturando el soporte con el antígeno. A continuación, se puede ensayar si el soporte obtenido es capaz de inducir la internalización mediada por BCR. La densidad se puede reducir a continuación poniendo en contacto el soporte recubierto con el antígeno con diferentes cantidades de un agente que compite por la antígeno unido sobre la superficie del soporte. Por ejemplo, si el antígeno se fija al soporte a través de un mecanismo de fijación a base de biotina, el agente competidor puede ser un agente biotinilado, por ejemplo, una proteína no inmunogénica biotinilada. Los soportes generados pueden a continuación ponerse en contacto con un linfocito B para determinar si la densidad obtenida del antígeno particular es adecuada para la activación de linfocitos B mediada por BCR. Si la avidéz cae por debajo del umbral requerido para un antígeno particular, no hay activación suficiente de la célula y, por lo tanto, no se observa una respuesta inmunitaria suficiente. Reduciendo gradualmente la densidad de los soportes, se puede determinar la densidad mínima (y, por tanto, la avidéz) requerida para cada antígeno.

Si hay varios antígenos presentes sobre el soporte, la densidad de cada antígeno puede ser optimizada.

La activación del linfocito B se puede medir por cualquier método adecuado. Por ejemplo, la activación del linfocito B se puede ensayar mediante la medición de la secreción de anticuerpos, citocinas o quimiocinas específicos en respuesta a la absorción de antígeno en partículas. También se puede medir la activación de la presentación inmunoestimulante de lípidos mediada por CD1d de los linfocitos B de superficie mediante la medición de la secreción de IL-2 en el medio de cultivo después de la incubación in vitro con células iNKT.

En particular, se pueden emplear los siguientes ensayos para comprobar que el antígeno está presente con avidéz suficiente sobre el apoyo para provocar una respuesta inmunitaria específica de antígeno. Se pueden emplear los siguientes ensayos in vitro en linfocitos B específicos de antígeno de ratón transgénico. (Las células son transgénicas en el sentido de que están enriquecidas en linfocitos B que expresan BCR específico para el antígeno en cuestión.)

Por ejemplo, si se utilizan soportes con antígeno y CpG, la secreción de IL-6 en el sobrenadante de los cultivos se puede medir por ELISA tan pronto como a las 24 o 48 horas después de la estimulación con las partículas. La producción de IgM se puede evaluar después del 72 h por ELISA. IL-6 e IgM solamente se pueden detectar si ha tenido lugar una estimulación suficiente.

Además, si los linfocitos B se marcan con CFSE antes de la estimulación, se puede evaluar la proliferación (dilución de CFSE) como una lectura de la activación de linfocitos B 72 horas después de la estimulación por FACS.

Si, por ejemplo, se utiliza un soporte con antígeno y α Gal-cer, es posible ensayar la cantidad de α GalCer-CD1d presentada en la superficie de los linfocitos B, examinando la capacidad de estas células para activar los linfocitos iNKT. Como se detalla en los métodos y materiales de los Ejemplos de la presente memoria, se pueden usar linfocitos iNKT derivados del hibridoma DN32.D3 para estos ensayos. Con el fin de presentar α GalCer-CD1d sobre su superficie, el antígeno del soporte debe haber superado el umbral avidéz para la internalización mediada por BCR. Linfocitos B transgénicos específicos del antígeno se incuban con las partículas durante la noche y a continuación se lavan a fondo en PBS. Los linfocitos B se incuban a continuación con los linfocitos iNKT y después de 20 h, la secreción de IL-2 por los linfocitos iNKT, medida por ELISA da una medida de la presentación de α GalCer-CD1d sobre la superficie de los linfocitos B.

Cada linfocito B puede soportar múltiples soportes. El número de soportes que están en contacto con el linfocito B pueden así influir en la respuesta inmunitaria resultante. Se puede optimizar el número de soportes para lograr una respuesta deseada mediante la variación del número de soportes utilizados.

También se puede emplear una estrategia de inmunización para identificar el umbral de avidéz de un antígeno requerido para la estimulación de respuestas inmunitarias específicas in vivo. Por ejemplo, la producción de anticuerpos específicos se puede medir mediante la realización de ensayos ELISA u otros ensayos inmunológicos adecuados en el suero de individuos inmunizados con el antígeno en partículas descrito en la presente memoria.

El uso del soporte no sólo permite modular la densidad del antígeno y/o del inmunoestimulante sobre el soporte, sino también la relación entre el antígeno y el inmunoestimulante. Esto representa una forma más de optimizar la respuesta inmunitaria específica a un antígeno particular. Dado que los antígenos más débiles, tales como los usados en muchas vacunas antibacterianas, carecen de epítopos de linfocitos T asociados, tales antígenos pueden requerir una mayor cantidad de inmunoestimulante. El soporte brinda la oportunidad de aumentar la cantidad de

5 inmuoestimulante conjugado en comparación con lo que sería necesario para los antígenos más fuertes. De hecho, los inventores han demostrado que pueden producirse respuestas inmunitarias intensificadas y específicas incluso en ausencia de linfocitos T cooperadores específicos, utilizando por ejemplo la inmunización con el antígeno modelo de lisozima de huevo de gallina con un fondo de C57/BL6. Al estar el antígeno y el inmuoestimulante sobre el mismo soporte, se garantiza asegura la absorción simultánea por la célula, lo que lleva a una respuesta específica aún más intensificada en comparación con la absorción del antígeno solo o la absorción del antígeno con inmuoestimulante soluble.

10 En alguna realización, pueden estar unidas al soporte múltiples moléculas de antígeno.

15 En algunas realizaciones diferentes tipos de antígenos pueden estar fijados al soporte; por ejemplo 2, 3, 4 o más antígenos diferentes pueden estar fijados al soporte. Generalmente, cada antígeno está presente en una densidad/avidez suficiente para activar los linfocitos que expresan BCR, es decir, cada antígeno desencadenará una respuesta inmunitaria específica del antígeno. Un soporte con múltiples antígenos estimulará de este modo respuestas inmunitarias a cada antígeno, y permitiría, por tanto, la producción de respuestas inmunitarias a la medida de la composición antigénica del patógeno. Esta estrategia podría asegurar una protección óptima frente a un patógeno invasor, evitando la selección de mutaciones de 'escape' únicas. (A menudo, los virus mutan algunas de sus proteínas (antígenos) para escapar a la detección por el sistema inmunitario, de modo que ya no pueden ser unidas por las células inmunitarias ni ser reconocidas por un receptor específico). Por lo tanto, la fijación de diferentes antígenos al soporte y la producción de anticuerpos a varios antígenos al mismo tiempo, aumenta la posibilidad de que un único mutante de escape fuese combatido por el sistema inmunitario.

20 En algunas formas de realización, múltiples moléculas inmuoestimulantes pueden fijarse al soporte.

25 En algunas realizaciones, diferentes tipos de inmuoestimulantes pueden fijarse al soporte. Por ejemplo, 2, 3, 4 o más tipos diferentes de inmuoestimulantes pueden estar fijados al soporte. Dado que los diferentes tipos de inmuoestimulantes pueden utilizar diferentes mecanismos de potenciación de la respuesta inmunitaria, la combinación de diferentes inmuoestimulantes puede conducir a la cooperación produciendo una intensificación aún mayor de la respuesta inmunitaria.

30 En algunas realizaciones, una combinación de diferentes tipos de antígenos y diferentes tipos de inmuoestimulantes puede estar presentes en la superficie de apoyo.

35 Además, en algunas realizaciones, un soporte con uno o más antígenos y uno o más inmuoestimulantes fijados al mismo, se puede combinar con uno o más inmuoestimulantes solubles para potenciar aún más la respuesta inmunitaria específica. El inmuoestimulante(s) soluble puede ser el mismo inmuoestimulante utilizado sobre el soporte, o puede ser uno(s) diferente.

40 En algunas realizaciones, el soporte con uno o más tipos de antígenos fijados al mismo y opcionalmente uno o más tipos de inmuoestimulantes fijados al mismo, se pueden administrar conjuntamente con uno o más inmuoestimulantes solubles.

Inmuoestimulantes

45 El término "inmuoestimulante" se utiliza en la presente memoria para describir una sustancia que evoca, aumenta y/o prolonga una respuesta inmunitaria a un antígeno. Aunque la presente solicitud distingue entre un "antígeno" y un "inmuoestimulante" debe tenerse en cuenta que esto es simplemente por razones de claridad y facilidad de descripción. Debe entenderse que el inmuoestimulante podría tener, y en muchos casos tiene preferiblemente potencial antigénico sí mismo. Por lo tanto, en los ejemplos, se hace referencia también, por ejemplo, al "lípidos inmuoestimulador", como el "lípidos antigénico". La distinción entre "antígeno" e "inmuoestimulante" en la presente memoria se refiere más bien al hecho de que la respuesta inmunitaria mediada por BCR específica inducida será dirigida hacia el antígeno, ya que el "antígeno" determina la unión específica al BCR.

50 Los compuestos con actividad inmuoestimulante son conocidos en la técnica. Cualquier inmuoestimulante adecuado puede ser utilizado de acuerdo con la invención, tal como por ejemplo una proteína, polipéptido, péptido, polisacárido, tal como un glicano, conjugados de polisacáridos, péptidos y no péptidos que imitan los polisacáridos y otras moléculas, moléculas pequeñas, lípidos, glicolípidos y carbohidratos.

55 En algunas realizaciones, el inmuoestimulante es un agonista de iNKT o un agonista de TLR, como se describe en más detalle a continuación.

Agonistas de iNKT

60 Durante muchos años, se asumió que los péptidos eran el único determinante antigénico que iniciaban las respuestas de linfocitos T. Sin embargo, ahora se sabe que los linfocitos T también son capaces de reconocer y responder a los lípidos y glicolípidos antigénicos, presentados por las moléculas CD1 (8). Los linfocitos T reconocen

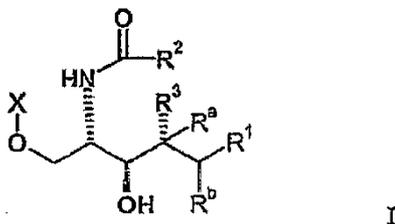
una diversa gama de antígenos potenciales a través de su receptor de linfocitos T (TCR) altamente polimórfico. Un subconjunto de linfocitos T conocido como linfocitos iNKT (linfocito T citolítico natural invariante) se definen por su expresión de un repertorio de TCR restringido, que consiste en una cadena α canónica Va14-Ja18 o Va24-Ja18 en ratones y seres humanos, respectivamente. Los linfocitos iNKT reconocen y se activan en respuesta a lípidos antigénicos propios o extraños presentados por las moléculas CD1d no polimórficas expresadas en la superficie de las CPA (8,11). Los linfocitos iNKT se activan en respuesta a varias infecciones y durante las enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias (12,13). Los linfocitos iNKT proporcionan un medio de unión y coordinación de la respuesta inmunitaria innata y adaptativa, ya que su estimulación puede inducir la activación posterior de los linfocitos citolíticos NK, linfocitos B y T (11). Se ha demostrado in vitro que los linfocitos iNKT estimulan la proliferación de linfocitos B y la producción de anticuerpos (16), aunque esto parece independiente de la presentación de ligandos de los linfocitos iNKT exógenos y de la especificidad por el BCR. Dado que el funcionamiento eficaz del sistema inmunitario requiere el control estrechamente regulado de la activación de los linfocitos B in vivo, se esperaría que la activación mediada por iNKT estuviera sujeta a una regulación estricta y, sin embargo, el mecanismo por el cual esto ocurre permanece sin caracterizar. En la presente solicitud los inventores demuestran que la internalización por el BCR específico aumenta la presentación de linfocitos B de antígenos lipídicos en partículas a linfocitos iNKT in vivo. Posteriormente los linfocitos iNKT activados ayudan a la proliferación de linfocitos B específicos, diferenciación de las CP extrafoliculares y la secreción de altos títulos IgM específicas y anticuerpos de cambio temprano de clase.

Se había demostrado previamente que los linfocitos NKT pueden activarse por la α -galactosil-ceramida (α -GalCer) o su análogo sintético KRN 7000 (US 2003/0157135). Además, se ha demostrado que la α -GalCer puede estimular la actividad NK y la producción de citocinas por las células NKT y que exhibe una potente actividad antitumoral in vivo. Dada la ausencia de las funciones inmunorreguladoras de la α -GalCer en ratones deficientes en CD1d^{-/-} y en NKT, esto indica que la α -GalCer tiene que ser presentada por la molécula similar al MHC de clase I CD1d (US 2003/0157135).

El documento US2003/0157135 señala además, que la α -GalCer y las glicosilceramidas relacionadas no sólo funcionan como antígenos, sino que también se pueden emplear como adyuvantes solubles capaces de intensificar y/o prolongar la duración de las respuestas inmunitarias protectoras inducidas por otros antígenos.

Por lo tanto, en algunas realizaciones de la presente invención, el inmunoestimulante puede ser un agonista de linfocitos iNKT. El agonista puede ser un agonista exógeno o endógeno. Puede ser un agonista glicosídico (tal como alfa-galactosilceramida) o un agonista no glicosídico (tal como treitolceramida).

En algunas realizaciones, el inmunoestimulante puede ser un lípido o un glicolípido. Los glicolípidos presentados por CD1 se pueden agrupar en diferentes clases incluyendo, por ejemplo, diacilglicerolípidos, esfingolípidos, micolatos y fosfomicocétidos (Zajonc y Krenenberg, Current Opinion in Structural Biology, 2007, 17:521-529). Se sabe que los antígenos microbianos de micobacterias patógenas, tales como los monomicolatos de glucosa (GMM), los manosil osfomicocétidos y los fosfatidilinositol manósidos son ligandos potentes para los linfocitos T humanos cuando son presentados por moléculas CD1 del Grupo I (Zajonc and Kronenberg, supra). El inmunoestimulante de la presente invención puede ser un glucosilceramida, por ejemplo, la alfa-galactosilceramida (KRN 7000, US2003/0157135) o un análogo del mismo, tal como por ejemplo treitolceramida (IMM47) u otros agonistas de linfocitos iNKT no glicosídicos (como se describe en Silk et al. Cutting Edge J. Immunol 2008). Otros análogos que se pueden usar de acuerdo con la invención y métodos de producción de tales análogos se describen en el documento WO2007/050668. Por ejemplo, los análogos útiles de acuerdo con la invención incluyen compuestos que tienen la fórmula I



en la cual

R¹ representa un resto hidrófobo adaptado para ocupar el canal C' de la CD1d humana, R² representa un resto hidrófobo adaptado para ocupar el canal A' de la CD1d humana, de forma que R¹ llena al menos 30 % del volumen ocupado del canal C' en comparación con el volumen ocupado por el nC₁₄H₂₉ terminal de la cadena de esfingosina de la alfa-galactosilceramida cuando se une a la CD1d humana y R² llena al menos 30 % del volumen ocupado del canal A' en comparación con el volumen ocupado por la nC₂₅H₅₁ terminal de la cadena de acilo de la alfa-galactosilceramida cuando se une a la CD1d humana, R³ representa hidrógeno u OH, R^a y R^b representan cada uno hidrógeno y además, cuando R³ representa hidrógeno, Ra y Rb pueden formar juntos un enlace sencillo,

X representa o -CHA(CHOH)nY o -P(=O)(O-)OCH₂(CHOH)mY, en la que Y representa CHB1B2, n representa un número entero de 1 a 4, m representa 0 o 1, A representa hidrógeno, uno de B1 y B2 representa H, OH o fenilo y el otro representa hidrógeno o uno de B1 y B2 representa hidroxilo y el otro representa fenilo.

Además, cuando n representa 4, entonces A junto con uno de B1 y B2 juntos forma un enlace sencillo y el otro de B1 y B2 representa H, OH, o OSO₃H y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

El inmunoestimulante puede ser arabinitol-ceramida, glicerol-ceramida, 6-desoxi y 6-sulfono-mio-inositolceramida.

Los inventores demuestran que la absorción mediada por BCR permite la presentación eficiente de lípidos inmunoestimulantes en partículas a los linfocitos iNKT. Este mecanismo permite la presentación de lípidos mediada por CD1 tras el reconocimiento por el BCR de incluso un antígeno débil, siempre y cuando se supere un umbral definido de avidéz. Como resultado, los iNKT activados proporcionan ayuda para la proliferación de linfocitos B específicos, la diferenciación de linfocitos B en células plasmáticas extrafoliculares y la producción de altos títulos de IgM específica y anticuerpos de cambio temprano de clase.

Los inventores han utilizado el BCR tanto como un medio para lograr la selectividad en la administración como la internalización eficiente de los lípidos antigénicos en partículas por linfocitos B específicos.

La capacidad de los linfocitos iNKT para inducir la proliferación de linfocitos B se ha caracterizado predominantemente in vitro (16). Los inventores muestran que, incluso en ausencia de linfocitos T CD4 específicos, los linfocitos iNKT pueden ayudar a la proliferación de linfocitos B y a la producción de anticuerpos in vivo. Estas observaciones coinciden con investigaciones anteriores, donde la inmunización de ratones con deficiencia de MHC II con antígeno y α GalCer inducía niveles detectables de IgG, lo que indica que los linfocitos iNKT pueden reemplazar las funciones de los linfocitos T CD4 colaboradores (27). Por lo tanto esto tiene implicaciones para la estimulación de las respuestas inmunitarias de antígenos más débiles, como los que a menudo se utilizan para las vacunas antibacterianas que carecen de epítomos de linfocitos T asociados. Los linfocitos iNKT tienen un fenotipo experimentado frente al antígeno y pueden responder muy rápidamente a antígenos presentados por CD1d sin la necesidad de la expansión clonal. Los inventores han demostrado que la ayuda directa de los linfocitos iNKT después del acoplamiento BCR conduce a la diferenciación de CP extrafoliculares y a la producción de anticuerpos temprana. Las CP extrafoliculares son responsables de la generación de la oleada inicial de anticuerpos en una respuesta dependiente de T (5). Estos anticuerpos pueden tener efectos neutralizantes para la protección contra virus y bacterias. Esto sugiere un papel principal para la ayuda directa de los linfocitos iNKT a los linfocitos B en la inducción de respuestas inmunitarias tempranas contra diferentes patógenos. En línea con esto, los ratones deficientes en iNKT presentan defectos graves en la eliminación de varios microorganismos incluyendo *Streptococcus pneumoniae*, *Sphingomonas* ssp. y *Plasmodium berghei* (28). Los linfocitos iNKT se han propuesto como actores en el desarrollo de respuestas tempranas de anticuerpos después de la infección con *Plasmodium berghei* en el modelo para la malaria cerebral (29). En este caso, la producción de anticuerpos específicos en ratones CD1^{-/-} se reduce especialmente a los puntos temporales tempranos tras la exposición parasitaria. Por lo tanto, los iNKTs pueden desempeñar un papel fundamental en la conformación de las respuestas tempranas de anticuerpos in vivo y, por lo tanto, ofrecer una mejor protección frente a la invasión de patógenos.

Por lo tanto, ¿cuál es el significado funcional de las observaciones descritas en la presente memoria en el contexto de una respuesta inmunitaria? Los linfocitos iNKT son activados por glicolípidos de bacterias LPS negativo como *Sphingomonas*, *Erlchia* y *Borrelia* (25) (26) (30). Como alternativa, los linfocitos iNKT pueden reconocer un ligando lipídico endógeno todavía sin definir, a través de la presentación por CD1d, regulado positivamente por las CD en respuesta a la señalización de TLR (25) (31) (32) (33). Aunque se sabe que todos los linfocitos B expresan CD1d, esta expresión es mayor en los linfocitos B de la zona marginal, de manera que presentan un fenotipo CD21^{alto} CD23^{bajo} CD1d^{alto}. Este fenotipo sugiere que los linfocitos B de la zona marginal pueden desempeñar un papel importante en la activación de iNKT dependiente de CD1d después de la infección. De hecho estos linfocitos se localizan en el seno marginal del bazo, donde pueden proporcionar respuestas inmunitarias tempranas contra el antígeno en partículas de transmisión sanguínea (34) (35). Postulamos que los linfocitos B de la zona marginal que expresan BCR específico de los glicolípidos bacterianos permiten el reclutamiento más eficaz de la ayuda de los linfocitos iNKT y la generación asociada de respuestas de anticuerpos específicos. Como alternativa, los linfocitos B capaces de internalizar microbios en partículas pueden recibir señales de TLR y la posterior ayuda de linfocitos iNKT puede ayudar a la regulación positiva de un ligando endógeno restringido a CD1d.

Los resultados presentados en la presente memoria identifican la internalización por el BCR del antígeno en partículas y los lípidos inmunoestimulantes como un medio de la modulación de las respuestas de linfocitos B mediadas por iNKT in vivo. La colaboración entre los linfocitos B y iNKT conduce al desarrollo de respuestas de anticuerpos específicos tempranos, lo que pone de manifiesto la importancia de los linfocitos iNKT en la coordinación de las respuestas inmunitarias innata y adaptativa.

Agonistas de TLR

5 Los TLR intracelulares, tales como TLR 3, 7, 8 y 9 reconocen ácidos nucleicos. Como tales oligodesoxinucleótidos sintéticos (ODN), como el agonista de TLR9 CpG, habían sido previamente utilizados como inmunoestimulantes (Klinman, 2004, Nature Reviews, 4:249). Estos inmunoestimulantes del TLR operan mediante un mecanismo diferente que el empleado por los lípidos tales como α GalCer. Estos inmunoestimulantes activan directamente la célula que van a capta, culminando, por ejemplo, en la secreción de citocinas y quimiocinas, lo que se traduce en una estimulación adicional de la respuesta inmunitaria.

10 El patrón de expresión de TLR es específico de cada tipo de célula (Chiron et al, 2009). La expresión de TLR en linfocitos B humanos se caracteriza por una alta expresión de TLR 1, 6, 7, 9 y 10, variando el patrón de expresión durante la diferenciación de los linfocitos B.

15 Los ODNs CpG solubles se internalizan rápidamente por las células inmunitarias e interactúan con TLR9 que está presente en las vesículas de endocitosis. La activación celular por la mayoría de los miembros de la familia TLR (incluyendo TLR9) implica una cascada de señalización que procede a través del gen de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 (MYD88), la interleucina-1 (IL-1), la quinasa activada por receptor (IRAK) y el factor 6 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) (TRAF6) y culmina en la activación de varios factores de transcripción, incluyendo el factor nuclear Kb (NF-kB), la proteína activadora 1 (AP1), la proteína de unión al potenciador CCAAT (CEBP) y la proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (CREB). Estos factores de transcripción regulan positivamente y de forma directa la expresión de genes de citocinas/quimiocinas. Los linfocitos B y las células dendríticas plasmacitoides (CDp) son los principales tipos de células humanas que expresan TLR9 y responden directamente a la estimulación por CpG. La activación de estas células por el ADN de CpG inicia una cascada inmunoestimulante que culmina en la maduración indirecta, la diferenciación y la proliferación de linfocitos citolíticos naturales (NK), linfocitos T y monocitos/macrófagos. En conjunto, estas células secretan citocinas y quimiocinas que crean un entorno inmunitario pro-inflamatorio (IL-1, IL-6, IL-18 y TNF) y proclive a T_H1 (interferón- γ , IFN- γ e IL-12) entorno inmunológico (Klinman, 2004, Nature Reviews, 4: 249).

30 Por lo tanto, en algunas realizaciones, el inmunoestimulante es un agonista de TLR. Por ejemplo, es un agonista de TLR endosomal, en particular, un ácido nucleico, tal como por ejemplo ADN, ARN (ya sea de cadena doble o de cadena sencilla). El inmunoestimulante puede, por ejemplo comprender un oligodesoxinucleótido CpG o un ácido nucleico poli-U.

35 Generación de células inmortalizadas

El método para la administración de inmunoestimulantes específica del antígeno, como se describe en la presente memoria, se puede emplear en la generación de linfocitos B inmortalizados y líneas de linfocitos B para la producción de anticuerpos monoclonales específicos del antígeno.

40 En la presente memoria se divulga un método para generar una célula inmortalizada, comprendiendo dicho método las etapas de

- (i) poner en contacto un linfocito B con un producto o composición como se describe en la presente memoria e
- (ii) inmortalizar el linfocito B de la etapa (i).

45 La etapa (ii) anterior puede ser realizada después de la etapa (i), o las dos etapas se pueden realizar al mismo tiempo.

50 La etapa (i) puede llevarse a cabo ex vivo, es decir, fuera del organismo del que proceden los linfocitos B.

La inmortalización de los linfocitos B puede lograrse por cualquier método adecuado, tal como por ejemplo (pero sin limitarse a) la transformación con un virus adecuado y/o la fusión con otra célula inmortalizada y/o unión con CD40.

55 Los métodos para inmortalizar los linfocitos B con un virus transformante, así como los virus adecuados son conocidos en la técnica. (Lanzavecchia et al., Curr Opin Biotechnol 2007 Dec; 18(6): 523-8, Epub 2007 Dic 11). Puede ser utilizado cualquier virus transformante adecuado. El virus puede ser, por ejemplo, el virus de Epstein-Barr (EBV). El EBV es adecuado para la transformación de los linfocitos B de la mayoría de los primates, aunque para otros organismos se pueden seleccionar si es necesario virus adecuados. Por ejemplo, después de la administración de un soporte recubierto con antígeno y, por ejemplo, un agonista de TLR, la infección por transformación con el virus de Epstein Barr sólo sería mucho mayor en los linfocitos B específicos del antígeno que habían recibido la estimulación de TLR (utilizando el método descrito en Traggiai E et al (Traggiai E, Becker S, Subbarao K, Kolesnikova L, Uematsu Y, Gismondo MR, Murphy BR, Rappuoli R, Lanzavecchia A. Nature Medicine 2004 vol. 10 pp. 871-5). La eficiencia de la transformación se incrementa drásticamente en los linfocitos TLR activados en comparación con los linfocitos B no activados. Así, aumenta significativamente la proporción total de células específicas del antígeno entre aquellas que se transforman en líneas de células inmortalizadas, es decir, la población transformada se enriquece específicamente con linfocitos B específicos del antígeno. Por lo tanto, en la

presente memoria se divulga un método para la producción rápida de líneas de linfocitos B inmortalizadas específicas del antígeno particular requerido, sin procedimientos de cribado laboriosos tras la transformación con el EBV.

5 La inmortalización puede por ejemplo lograrse mediante la fusión con otra célula inmortalizada. Métodos y materiales adecuados son conocidos por el experto. Por ejemplo, Shirahata et al, *Methods Cell Biol*, 1998; 57:111-45, describen tales métodos. (En Shirahata et al se establecieron líneas celulares parentales humanas, NAT-30 y HO-323, con altas eficiencias de fusión, para preparar muchas líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos monoclonales humanos específicos de cáncer. Debido a que las líneas celulares NAT-30 y HO-323 son productoras de IgM, es difícil obtener hibridomas productores de IgG debido a que los tipos de inmunoglobulina producidos por los hibridomas se ven fuertemente afectados por las características de las células parentales. Por lo tanto, se estableció una línea celular parental humana no productora de inmunoglobulina, A4H12, derivada de linfoma de linfocitos T humano que puede obtener de manera eficiente hibridomas humanos que producen IgG. Otro problema con la preparación de hibridomas humanos es que es difícil obtener linfocitos B inmunizados con antígenos opcionales por razones éticas. Para superar este problema, los autores describen métodos de inmunización in vitro que han sido desarrollados para permitir la exposición de un gran número de linfocitos B a células de cáncer cultivadas o a antígenos solubles. Los autores discuten los socios de fusión humanos, los métodos de inmunización in vitro y la preparación de hibridomas humano-humano utilizando un método de electrofusión.)

20 La inmortalización puede, por ejemplo, lograrse mediante la estimulación de CD40, (unión con CD40) como, por ejemplo, la descrita por Wiesner et al, *PLoS ONE*, ene 2008, número 1:1-13. (Los autores muestran que los linfocitos B humanos se pueden activar e inducir para proliferar in vitro mediante la activación de su receptor de superficie CD40 en presencia de interleucina-4, una combinación de señales que imitan la activación de linfocitos B por los linfocitos T cooperadores. Para establecer cultivos de linfocitos B estimulados por CD40 libres de EBV, se sembraron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) sin separar de donantes EBV positivo en diferentes números por microcultivo en células estimuladoras que expresan CD40L en presencia de interleucina-4 y ciclosporina A. Las células se volvieron a estimular cada 5 a 7 días con células estimuladoras frescas y se expandieron cuando la proliferación llegó a ser prominente. Los autores observaron que la rápida proliferación de los linfocitos B se veía favorecida si se utiliza un pequeño número de células iniciales por cultivo (2×10^4 a 5×10^5 PBMC). Después de 27 días, los cultivos de cinco donantes establecidos con 10^5 PBMC había proliferado en promedio 282 veces con respecto a los linfocitos B y estaban dominados por linfocitos B (87 ± 5 % de linfocitos CD19+).

35 La célula inmortalizada puede a continuación mantenerse en cultivo para establecer una línea celular inmortalizada, utilizando métodos conocidos en la técnica.

Aunque los métodos descritos anteriormente son adecuados para ser utilizados en cualquier especie, estos son particularmente útiles para la generación de anticuerpos humanos monoclonales. Los métodos comunes para la generación de anticuerpos monoclonales humanos o similares a los humanos incluyen, por ejemplo, la humanización de anticuerpos murinos, el aislamiento de anticuerpos a partir de bibliotecas de diferente complejidad y la producción de hibridomas utilizando el método clásico en ratones transgénicos para los loci Ig humanos (el "xeno-ratón"). Sin embargo, la humanización de anticuerpos monoclonales murinos es un procedimiento laborioso e incompleto. Las bibliotecas de anticuerpos aleatorias representan un repertorio imparcial y, por lo tanto, se pueden utilizar para seleccionar especificidades de anticuerpos contra antígenos altamente conservados, pero dan lugar a anticuerpos de baja afinidad. Las bibliotecas seleccionadas a partir de linfocitos B cebados con antígeno se enriquecen para una especificidad particular, pero no conservan el emparejamiento original VH-VL y, en general, dan lugar a anticuerpos que tienen una afinidad más baja para el antígeno que los presentes en el repertorio del anticuerpo original. El xeno-ratón se puede inmunizar contra un antígeno de elección, pero este sistema comparte con la tecnología clásica del hibridoma murino la limitación de que los anticuerpos se seleccionan en una especie distinta a la humana.

55 El linfocito B en la etapa (i) puede ser un linfocito B indiferenciado, es decir, el linfocito B no ha sido puesto en contacto con el antígeno de interés antes. Por lo tanto, en la presente memoria se divulgan métodos mejorados para la generación *de novo* de anticuerpos específicos de antígeno.

El linfocito B puede ser un linfocito B humano.

60 En la presente memoria se divulga un método para producir linfocitos B inmortalizados, comprendiendo el método la etapa de (i) inmortalizar linfocitos B *ex vivo* en la presencia de un producto o composición como se describe en la presente memoria, es decir, un producto capaz de la internalización mediada por BCR que comprende un soporte y un antígeno de unión a BCR fijado al soporte; o una composición que comprende el producto y un vehículo adecuado.

65 La inmortalización se puede conseguir mediante cualquier método adecuado, como se discutió anteriormente.

En la presente memoria se proporciona un método para producir un clon de un linfocito B inmortalizado capaz de producir un anticuerpo monoclonal con una especificidad de antígeno deseada, comprendiendo el método:

- 5 (i) poner en contacto un linfocito B ex vivo con un producto o composición como se describe en la presente memoria e
 (ii) inmortalizar el linfocito B de la etapa (i).

La inmortalización se puede conseguir mediante cualquier método adecuado, por ejemplo, los métodos discutidos anteriormente.

10 El método puede comprender además la detección de los linfocitos transformados para la especificidad de antígeno. El método puede comprender además el aislamiento de un linfocito B inmortalizado

15 Las etapas (i) y (ii) pueden llevarse a cabo una tras otra, o simultáneamente.

En la presente memoria se divulga un método para producir un clon de un linfocito B inmortalizado capaz de producir un anticuerpo monoclonal humano con una especificidad de antígeno deseada, comprendiendo el método:

- 20 (i) inmortalizar una población de células que comprende o consiste en linfocitos B en presencia de un producto o composición como se describe en la presente memoria.

El método puede comprender además la etapa de

- 25 (ii) seleccionar los linfocitos transformados según la especificidad del antígeno.

El método puede comprender además la etapa de (iii) aislar un linfocito B inmortalizado.

30 En los métodos descritos anteriormente, los linfocitos B pueden ser linfocitos B indiferenciados o vírgenes o linfocitos B de memoria o una mezcla de ambos. Mientras que el linfocito B puede ser de cualquier origen, tal como de mamífero (o de mamífero no humano), este preferiblemente es un linfocito B humano.

35 El linfocito B a inmortalizar puede ser un linfocito B de memoria obtenido de un organismo que ha estado previamente en contacto con un antígeno de interés. Los productos o composiciones como se describe en la presente memoria se pueden usar así para volver a activar los linfocitos B de memoria. El linfocito B de memoria puede ser humano. El documento WO2004/076677, describe un método para producir linfocitos B de memoria humanos inmortalizados, que comprende la etapa de transformar linfocitos B de memoria humanos utilizando un virus transformante en presencia de un activador de linfocitos B policlonal. Se observó que activadores de linfocitos B policlonales (tales como secuencias de CpG) aumentaban la eficiencia de la inmortalización por el EBV y de la clonación de los linfocitos inmortalizados por el EBV.

40 Li et al (Li y otros, PNAS 7 marzo de 2006, vol 103:3557-3562) describe un proceso que emplea linfocitos B primarios para la generación de líneas celulares que producen anticuerpos específicos. El proceso requiere la exposición de la mezcla de linfocitos B primarios y linfocitos T con dicho antígeno ex vivo para la generación de linfocitos B inmortalizados que secretan anticuerpo específico. Los métodos descritos anteriormente pueden llevarse a cabo en ausencia de linfocitos T.

Los métodos descritos anteriormente pueden comprender además el uso de linfocitos B en ausencia de linfocitos T.

50 Los linfocitos B a transformar pueden proceder de cualquier especie adecuada y de varias fuentes (por ejemplo, de sangre entera, células mononucleares de sangre periférica (PBMC), cultivo de sangre, médula ósea, órganos, etc.). Preferiblemente, el linfocito B es un linfocito B humano. Los métodos adecuados para la obtención de linfocitos B humanas son bien conocidos en la técnica. Las muestras pueden incluir linfocitos que no son linfocitos B de memoria, por ejemplo, otras células sanguíneas.

55 Se puede seleccionar una subpoblación específica de linfocitos B que presenta una especificidad de antígeno deseada antes de la etapa de inmortalización mediante el uso de métodos conocidos en la técnica.

Detección y aislamiento de linfocitos B

60 Los linfocitos B transformados se seleccionaron para obtener aquellos que tienen la especificidad de antígeno deseada y, a continuación, se pueden producir los clones de linfocitos B individuales a partir de los linfocitos positivos. La etapa de selección puede llevarse a cabo mediante ELISA, por tinción de tejidos o células (incluyendo linfocitos transfectados), un ensayo de neutralización o uno de varios de otros métodos conocidos en la técnica para la identificación de la especificidad de antígeno deseada. El ensayo puede seleccionarse sobre la base de simple reconocimiento del antígeno, o puede seleccionarse sobre la base adicional de una función deseada por ejemplo para seleccionar anticuerpos neutralizantes en lugar de anticuerpos simplemente de unión a antígeno, para seleccionar

anticuerpos que pueden cambiar las características de las células diana, tales como sus cascadas de señalización, su forma, su tasa de crecimiento, su capacidad de influir en otras células, su respuesta a la influencia por otras células o por otros reactivos o por un cambio en las condiciones, su estado de diferenciación, etc.

5 La etapa de clonación para la separación de clones individuales de la mezcla de células positivas se puede llevar a cabo utilizando dilución limitante, micromanipulación, la deposición de una sola célula por clasificación de células u otro método conocido en la técnica. La clonación se puede llevar a cabo usando dilución limitante.

10 Los métodos divulgados en la presente memoria producen linfocitos B inmortalizados que producen anticuerpos que tienen una especificidad de antígeno deseada. En la presente memoria se divulga un clon de linfocitos B inmortalizadas obtenibles u obtenidos por los métodos divulgados en la presente memoria. Estos linfocitos B se pueden utilizar de diversas maneras, por ejemplo, como una fuente de anticuerpos monoclonales, como una fuente de ácido nucleico (ADN o ARNm) que codifica para un anticuerpo monoclonal de interés, para la administración a pacientes para la terapia celular, para la investigación, etc.

15 En la presente memoria se divulga un anticuerpo monoclonal obtenible u obtenido a partir de un clon de linfocitos B de la invención. En la presente memoria se divulgan fragmentos de estos anticuerpos monoclonales, particularmente, fragmentos que retienen la actividad de unión al antígeno de los anticuerpos.

20 Antígeno

Cualquier antígeno adecuado puede ser utilizado de acuerdo con la presente invención.

25 Si se utiliza en composiciones farmacéuticas destinadas para la vacunación profiláctica o terapéutica o para el tratamiento de una enfermedad como, por ejemplo, una enfermedad maligna, infecciosa o una alergia, se pueden obtener antígenos de una célula eucariota (por ejemplo, tumor, parásito, hongo), célula bacteriana, partícula viral o cualquier porción de las mismas.

30 Ejemplos de antígenos útiles de acuerdo con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, (i) antígenos específicos de la malaria tales como esporozoítos de plasmodios irradiados o antígenos de péptidos sintéticos que comprenden al menos un epítipo de linfocito T y/o linfocito B de la proteína del circumsporozoíto (CS) de la malaria (ver abajo); (ii) antígenos de proteínas o péptidos virales tales como los derivados de virus de la gripe (por ejemplo, glicoproteínas de superficie hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) [como la HA de la gripe del pavo o una HA A/Jalisco/95 H5 de la gripe aviar]; virus de la inmunodeficiencia (por ejemplo, un antígeno del virus de la inmunodeficiencia felina (FIV), un antígeno del virus de la inmunodeficiencia de simios (SIV) o un antígeno de virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), tal como el antígeno gp120, gp160, p18 [descrito en el Ejemplo 2, infra], Gag p17/24, Tat, Pol, Nef y Env; herpesvirus (por ejemplo, una glicoproteína, por ejemplo, del herpesvirus felino, herpesvirus equino, herpesvirus bovino, virus de la pseudorabia, herpesvirus canino, virus del herpes simple (HSV, por ejemplo, tk, gB, gD del HSV), virus de la enfermedad de Marek, herpesvirus del pavo (HVT) o citomegalovirus (CMV) o el virus de Epstein-Barr); virus de la hepatitis (por ejemplo, antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg)); virus del papiloma; virus de la leucemia bovina (por ejemplo, antígeno de la cubierta gp51,30); virus de la leucemia felina (FeLV) (por ejemplo, proteína de la cubierta FeLV, un antígeno del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), por ejemplo, HN o F); virus asociado al sarcoma de Rous (tales como RAV-1 env); virus de la bronquitis infecciosa (por ejemplo, de la matriz y/o peplómero); flavivirus (por ejemplo, un antígeno del virus de la encefalitis japonesa (JEV), un antígeno de la fiebre amarilla, o un antígeno del virus del Dengue); un antígeno del morbillivirus (por ejemplo, un antígeno del virus del moquillo canino, un antígeno del sarampión o un antígeno de la peste bovina, tal como HA o F); la rabia (por ejemplo, glicoproteína G de la rabia); parvovirus (por ejemplo, un antígeno de parvovirus canino); poxvirus (por ejemplo, un antígeno del virus de la ectromelia, un antígeno del poxvirus del canario o un antígeno de poxvirus de aves de corral); virus de la varicela del pollo (antígeno de la varicela zoster); virus de la bursitis infecciosa (por ejemplo, VP2, VP3 o VP4); virus de Hantaan; virus de las paperas; (iii) antígenos bacterianos, tales como lipopolisacáridos aislados de las paredes celulares de bacterias gramnegativas y específicos de estafilococos, específicos de estreptococos y específicos de neumococos (por ej., PspA [véase Publicación PCT N.º WO 92/14488]), específicos de *Neisseria gonorrhoeae*, específicos de *Borrelia* (por ejemplo, los antígenos OspA, OspB, OspC de *Borrelia* asociados con la enfermedad de Lyme, tal como *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia afzelli* y *Borrelia garinii* [véase, por ejemplo, la patente US-5.523.089; las publicaciones PCT N.º WO 90/04411, WO 91/09870, WO 93/04175, WO 96/06165, WO 93/08306; PCT/US92/08697; Bergstrom et al., Mol. Microbiol., 3: 479-486, 1989; Johnson et al., Infect. and Immun. 60: 1845-1853, 1992; Johnson et al., Vaccine 13: 1086-1094, 1995; The Sixth International Conference on Lyme Borreliosis: Progress on the Development of Lyme Disease Vaccine, Vaccine 13: 133-135, 1995]) y las proteínas o péptidos específicos de pseudomonas; (iv) antígenos fúngicos, tales como los aislados de *Candida*, *Trichophyton* o *Ptyrosporium* y (v) las proteínas específicas de tumores tales como los receptores ErbB, Melan A [MART1], gp100, tirosinasa, TRP-1/gp75 y TRP-2 (en melanoma); MAGE-1 y MAGE-3 (en el carcinoma de vejiga, cabeza y cuello y carcinoma no microcítico); proteínas EG y E7 del HPV (en el cáncer de cuello uterino); mucina [MUC-1] (en los cánceres de mama, páncreas, colon y próstata); antígeno específico de la próstata [PSA] (en cáncer de próstata); antígeno carcinoembrionario [CEA] (en los cánceres de colon, mama y gastrointestinales) y antígenos específicos de tumores compartidos, tales como MAGE-2, MAGE-4, MAGE-6, MAGE-10, MAGE-12, BAGE-1, CAGE-1,2,8, CAGE-3 a 7, LAGE-1, NY-ESO-1/LAGE-

2, NA-88, GnTV y TRP2-INT2.

Ejemplos de antígenos que se utilizan de acuerdo con la invención y el método de fabricación de los mismos se describen en el documento US2007/0231344. Los métodos para la selección y preparación de antígenos para las composiciones y métodos de tratamiento descritos en la presente memoria son conocidos por los expertos en la técnica. Ejemplos representativos de tales antígenos incluyen, pero no se limitan a, antígenos derivados de la envoltura o membrana externa de una bacteria patógena, mycobacterium o virus; un lípido, glicano o péptido derivada de una célula, por ejemplo, una célula de cáncer; o una molécula sintética. En los casos en que se conoce un determinante antigénico específico, este se puede usar en reacciones de acoplamiento y, a los efectos de la presente invención, será considerado como el "antígeno" en estos casos.

Los antígenos incluyen, pero no se limitan a, proteínas, polipéptidos, péptidos, polisacáridos, tales como glucanos, conjugados de polisacáridos, miméticos peptídicos y no peptídicos de polisacáridos y otras moléculas, moléculas pequeñas, lípidos, glicolípidos e hidratos de carbono.

Usando los productos y métodos descritos en la presente memoria, es posible provocar una respuesta inmunitaria a los antígenos que son normalmente inmunógenos débiles, tales como por ejemplo, péptidos pequeños, péptidos modificados, tales como por ejemplo fosfopéptidos o hidratos de carbono. Un antígeno a utilizar de acuerdo con la invención, por lo tanto, puede comprender, por ejemplo, un péptido, un péptido modificado tal como, por ejemplo, un fosfopéptido o un hidrato de carbono. El antígeno puede ser, por ejemplo, un péptido, un fosfopéptido o un hidrato de carbono.

Los péptidos antigénicos son presentados por células presentadoras de antígeno en las moléculas MHC. Los linfocitos T cooperadores (linfocitos T_H) interactúan con las moléculas del MHC de clase II. En respuesta a la activación, los linfocitos T_H secretan citocinas que contribuyen a la activación de linfocitos B. Las moléculas del MHC de clase II se unen a péptidos que son generalmente de entre aproximadamente 15 y 24 aminoácidos de longitud. Los péptidos más pequeños o más largos no se pueden presentar a través de MHC de clase II y, por lo tanto, no inducen una respuesta de los linfocitos T_H.

Sin embargo, incluso péptidos con una longitud apropiada pueden no inducir una respuesta de linfocitos T_H potente, si el receptor de los linfocitos T_H no es capaz de reconocer el péptido unido a la molécula del MHC debido a su secuencia específica (es decir, el péptido puede carecer de epitopos de linfocitos T).

Los productos y métodos de la presente invención, por lo tanto, permiten inducir respuestas inmunitarias a los antígenos, las cuales no inducen una respuesta de linfocitos T_H (cuando se administra en forma soluble, es decir, no fijado a un soporte como se describe en la presente memoria).

En la presente memoria se divulga un método para inducir o aumentar una respuesta inmunitaria específica de antígeno a un antígeno de unión a BCR en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto un producto que comprende un soporte y dicho antígeno fijado al soporte y en el que un inmunoestimulante está fijado al soporte o es administrado conjuntamente con dicho producto y en el que el antígeno está en forma soluble, es decir, no fijado a un soporte, no es capaz de inducir una respuesta de linfocitos T_H cuando se administra a un sujeto. "Inducir" en este contexto se refiere a una situación, donde un antígeno en forma soluble no es capaz de inducir una respuesta inmunitaria específica de antígeno, aunque una respuesta inmunitaria se pueda inducir cuando el antígeno está fijado a un soporte como se describe en la presente memoria. "Aumentar" en este contexto se refiere a una situación, donde un antígeno en forma soluble sólo induce una respuesta inmunitaria específica de antígeno débil, aunque se puede inducir una respuesta inmunitaria más fuerte cuando el antígeno está fijado a un soporte como se describe en la presente memoria. El antígeno puede, por ejemplo, comprender un péptido, un fosfopéptido, o un hidrato de carbono. El antígeno puede ser, por ejemplo, un péptido, un fosfopéptido o un hidrato de carbono.

Los métodos para la administración de un antígeno a un sujeto son bien conocidos en la técnica. En general, un antígeno como se describe en la presente memoria, es decir, un antígeno en partículas, se puede administrar directamente al sujeto por cualquier medio, tal como, por ejemplo, administración parenteral, tal como administración intravenosa, intramuscular o subcutánea, administración transdérmica, mucosal, intranasal, intradérmica o intratraqueal o administración oral. El antígeno se puede administrar sistémica o localmente.

Los antígenos pueden derivar de bacterias, micobacterias, virus, hongos y parásitos. Se entiende que los antígenos derivados de un microorganismo particular se pueden utilizar para prevenir y/o tratar una infección de ese microorganismo. A continuación se proporciona una lista de los microorganismos de los que pueden derivarse los antígenos.

Las bacterias incluyen, pero no se limitan a, bacterias gramnegativas y grampositivas. Las bacterias grampositivas incluyen, pero no se limitan a, especies de *Pasteurella*, especies de estafilococos y especies de estreptococos. Las bacterias gramnegativas incluyen, pero no se limitan a, especies de *Escherichia coli*, especies de *Pseudomonas* y especies de *Salmonella*. Ejemplos específicos de bacterias infecciosas incluyen, pero no se limitan a *Helicobacter pylori*, *Borelia burgdorferi*, *Legionella pneumophilia*, especies de *Mycobacteria* (por ejemplo, *M. tuberculosis*, *M.*

avium, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. goodii*, *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (*Streptococcus* del Grupo A), *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* del Grupo B), *Streptococcus* (grupo viridans), *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus* (especies anaerobias.), *Streptococcus pneumoniae*, especies patógenas de *Campylobacter*.,
 5 *Enterococcus* sp., *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium* sp., *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasturella multocida*, *Bacteroides* sp., *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Leptospira*, *Rickettsia* y *Actinomyces israelii*.

10 Los virus incluyen, pero no se limitan a, enterovirus (incluyendo, pero sin limitarse a, los virus de la *Picornaviridae*, tales como virus de la polio, virus de Coxsackie, virus ECHO), rotavirus, adenovirus, virus de la hepatitis. Ejemplos específicos de virus que se han encontrado en seres humanos incluyen, pero no se limitan a, *Retroviridae* (por ejemplo, virus de la inmunodeficiencia humana, como el VIH-1 (también conocido como HTLV-III, LAV o HTLV-III/LAV o VIH-III y otros aislados, tales como VIH-LP; *Picornaviridae* (por ejemplo, virus de la polio, virus de la hepatitis A; enterovirus, virus de Coxsackie humanos, rinovirus, ecovirus); *Calciviridae* (por ejemplo, cepas que causan gastroenteritis); *Togaviridae* (por ejemplo, virus de la encefalitis equina, virus de la rubéola); *Flaviviridae* (por ejemplo virus del dengue, virus de la encefalitis, virus de la fiebre amarilla); *Coronaviridae* (por ejemplo, coronavirus); *Rhabdoviridae* (por ejemplo, virus de la estomatitis vesicular, virus de la rabia); *Coronaviridae* (por ejemplo, coronavirus); *Rhabdoviridae* (por ejemplo, virus de la estomatitis vesicular, virus de la rabia); *Filoviridae* (por ejemplo, virus del Ébola); *Paramyxoviridae* (por ejemplo, virus parainfluenza, virus de la parotiditis, virus del sarampión, virus respiratorio sincitial); *Orthomyxoviridae* (por ejemplo, virus de la gripe); *Bungaviridae* (por ejemplo, virus Hantaan, virus bunga, flebovirus y virus Nairo); *Arenaviridae* (virus de la fiebre hemorrágica); *Reoviridae* (por ejemplo, reovirus, orbivirus y rotavirus); *Bimaviridae*; *Hepadnaviridae* (virus de la hepatitis B); *Parvoviridae* (parvovirus); *Papovaviridae* (virus del papiloma, virus de polioma); *Adenoviridae* (la mayoría de los adenovirus); *Herpesviridae* (virus herpes simplex (HSV) 1 y 2, virus de la varicela zoster, citomegalovirus (CMV), virus herpes; *Poxviridae* (virus de la viruela, virus vaccinia, poxvirus) e *Iridoviridae* (por ejemplo, el virus de la fiebre porcina africana) y los virus no clasificados (por ejemplo, los agentes etiológicos de encefalopatías espongiiformes, el agente de la hepatitis delta (se creía que era un satélite defectuoso del virus de la hepatitis B), los agentes de la hepatitis no A, no B (clase 1 = transmitidos internamente; clase 2 = transmitidos parenteralmente (es decir, hepatitis C); virus de Norwalk y virus relacionados y astrovirus).

Los virus que infectan a vertebrados humanos y no humanos, incluyen retrovirus, virus de ARN y virus de ADN. Este grupo de retrovirus incluye tanto retrovirus simples como retrovirus complejos. Los retrovirus simples incluyen los subgrupos de los retrovirus de tipo B, retrovirus de tipo C y retrovirus de tipo D. Un ejemplo de un retrovirus de tipo B es el virus del tumor mamario de ratón (MMTV). Los retrovirus de tipo C incluyen los subgrupos de tipo C grupo A (incluyendo el virus del sarcoma de Rous (RSV), virus de la leucemia aviar (ALV) y virus de la mieloblastosis aviar (AMV)) y tipo C grupo B (incluyendo el virus de la leucemia murina (MLV), virus de la leucemia felina (FeLV), virus del sarcoma murino (MSV), virus de la leucemia del mono gibón (GALV), virus de la necrosis del bazo (SNV), virus de la reticuloendoteliosis (RV) y el virus de sarcoma de simios (SSV)). Los retrovirus de tipo D incluyen el virus del mono de Mason-Pfizer (MPMV) y retrovirus de simio tipo 1 (SRV-1). Los retrovirus complejos incluyen los subgrupos de lentivirus, virus de la leucemia de linfocitos T y los virus espumosos. Los lentivirus incluyen el VIH-1, pero también incluyen el VIH-2, SIV, virus Visna, virus de la inmunodeficiencia felina (FIV) y virus de la anemia infecciosa equina (VAIE). Los virus de la leucemia de linfocitos T incluyen HTLV-I, HTLV-II, virus de la leucemia de linfocitos T de simio (STLV) y virus de la leucemia bovina (BLV). Los virus espumosos incluyen el virus espumoso humano (HFV), virus espumoso de simio (SFV) y virus espumoso bovino (BFV).

Ejemplos de otros virus de ARN que son antígenos en animales vertebrados incluyen, pero no se limitan a, miembros de la familia *Reoviridae*, incluyendo el género *Orthoreovirus* (múltiples serotipos de retrovirus de mamíferos y aviar), el género *Orbivirus* (virus de la lengua azul, virus Eugenangee, virus de Kemerovo, virus de la peste equina africana y virus de la fiebre por garrapatas de Colorado), el género *Rotavirus* (rotavirus humano, virus de la diarrea del becerro de Nebraska, rotavirus murino, rotavirus de simio, rotavirus bovino u ovino, rotavirus aviar); la familia *Picornaviridae*, incluyendo el género *Enterovirus* (poliovirus, virus de Coxsackie A y B, los virus entérico citopático huérfano humano (ECHO), virus de hepatitis A, enterovirus s simios, virus de la encefalomiелitis murina (ME), poliovirus muris, enterovirus bovinos, enterovirus porcinos, el género *Cardiovirus* (virus de la encefalomiocarditis (EMC), mengovirus), el género *Rhinovirus* (rinovirus humanos que incluyen al menos 113 subtipos; otros rinovirus), el género *Aphthovirus* (fiebre aftosa (FMDV); la familia *Calciviridae*, incluyendo el exantema vesicular del virus porcino, el virus del león marino de San Miguel, el picornavirus felino y el virus de Norwalk; la familia *Togaviridae*, incluyendo el género *Alphavirus* (virus de la encefalitis equina oriental, virus del bosque de Semliki, virus Sindbis, virus Chikungunya, virus O'Nyong-Nyong, virus del río Ross, virus de la encefalitis equina venezolana, virus de la encefalitis equina occidental), el género *Flavivirus* (el virus de la fiebre amarilla transmitidas por mosquitos, virus del dengue, virus de la encefalitis japonesa, virus de la encefalitis de San Luis, virus de la encefalitis del Valle Murray, virus del Nilo occidental, virus Kunjin, virus transmitido por garrapatas de Europa central, virus transmitido por garrapatas del Lejano Oriente, virus del bosque Kyasanur, virus Louping III, virus Powassan, virus de la fiebre hemorrágica Omsk), el género *Rubivirus* (virus de la rubéola), el género *Pestivirus* (virus de la enfermedad de la mucosa, virus de la peste porcina clásica, virus de la enfermedad de la frontera); la familia *Bunyaviridae*, incluyendo el género *Bunyavirus* (Bunyamwera y virus relacionados, virus del grupo de la

encefalitis de California), el género *Phlebovirus* (virus siciliano de la fiebre por flebotomos, virus de la fiebre del Valle del Rift), el género *Nairovirus* (virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, virus de la enfermedad ovina de Nairobi) y el género *Uukuvirus* (Uukuniemi y virus relacionados); la familia *Orthomyxoviridae*, incluyendo el virus del género *Influenza* (virus de la gripe tipo A, muchos subtipos humanos); virus de la gripe porcina y virus de la gripe aviar y equina; virus de la gripe tipo B (muchos subtipos humanos) y virus de la gripe tipo C (posible género separado); la familia *Paramyxoviridae*, incluyendo el género *Paramyxovirus* (virus Parainfluenza tipo 1, virus Sendai, virus de la hemadsorción, virus Parainfluenza tipos 2 a 5, virus de la enfermedad de Newcastle, virus de la parotiditis), el género *Morbillivirus* (virus del sarampión, panencefalitis esclerosante subaguda, virus de moquillo, virus de la peste bovina), el género *Pneumovirus* (virus sincitial respiratorio (RSV), virus sincitial respiratorio bovino y virus de la neumonía de ratones); la familia *Rhabdoviridae*, incluyendo el género *Vesiculovirus* (VSV), virus Chandipura, virus de Flandes-Hart Park), el género *Lyssavirus* (virus de la rabia), rhabdovirus de los peces y dos rhabdovirus probables (virus de Marburg y virus Ébola); la familia *Arenaviridae*, incluyendo el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCM), el complejo de virus Tacaribe y el virus Lassa; la familia *Coronoviridae*, incluyendo el virus de la bronquitis infecciosa (IBV), virus de la hepatitis de ratón, coronavirus entérico humano y el virus de la peritonitis infecciosa felina (coronavirus felino).

Virus de ADN ilustrativos que infectan a animales vertebrados incluyen, pero no se limitan a, la familia *Poxviridae*, incluyendo el género *Orthopoxvirus* (Variola mayor, Variola minor, virus de la viruela del mono, viruela bovina, viruela del búfalo, viruela del conejo, ectromelia), el género *Leporipoxvirus* (mixoma, fibroma), el género *Avipoxvirus* (viruela aviar, otros virus de la viruela aviar), el género *Capripoxvirus* (viruela ovina, viruela caprina), el género *Suipoxvirus* (viruela porcina), el género *Parapoxvirus* (virus de la dermatitis postular contagiosa, pseudoviruela, virus de la estomatitis papular bovina); la familia *Iridoviridae* (virus de la peste porcina africana, virus de la rana 2 y 3, virus de la linfocistis de los peces); la familia *Herpesviridae*, incluyendo los alfa-herpesvirus (*Herpes simplex* tipos 1 y 2, varicela-zóster, virus del aborto equino, virus del herpes equino 2 y 3, virus de la pseudorabia, virus de la queratoconjuntivitis infecciosa bovina, virus de la rinotraqueítis infecciosa bovina, virus de la rinotraqueítis felina, virus de la laringotraqueítis infecciosa), los beta-herpesvirus (citomegalovirus humano y citomegalovirus de cerdos, monos y roedores); los gamma-herpesvirus (virus de Epstein-Barr (EBV), virus de la enfermedad de Marek, *Herpesvirus saimiri*, *Herpesvirus ateles*, *Herpesvirus sylvilagus*, herpesvirus del conejillo de indias, virus del tumor de Lucke); la familia *Adenoviridae*, incluyendo el género *Mastadenovirus* (subgrupos humanos A, B, C, D, E y no agrupados; adenovirus del simio (al menos 23 serotipos), hepatitis canina infecciosa y adenovirus de ganado vacuno, cerdos, ovejas, ranas y muchas otras especies, el género *Aviadenovirus* (adenovirus aviares) y adenovirus no cultivables; la familia *Papoviridae*, incluyendo el género *Papillomavirus* (virus del papiloma humano, virus del papiloma bovino, virus del papiloma del conejo de Shope y diversos papilomavirus patogénicos de otras especies), el género *Poliomavirus* (poliomavirus, agente de vacuolación de simios (SV-40), agente de vacuolante de conejo (RKV), virus K, virus BK, virus JC y otros virus de polioma de primates tales como el virus del papiloma linfotrófico); la familia *Parvoviridae* incluyendo el género de virus adenoasociados, el género *Parvovirus* (virus de la panleucopenia felina, parvovirus bovino, parvovirus canino, virus de la enfermedad aleutiana del visón, etc.). Por último, los virus de ADN pueden incluir virus que no se ajustan a las familias mencionadas, tales como los virus del Kuru y de la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob y agentes neuropáticos infecciosos crónicos (virus CHINA).

Los hongos son organismos eucariotas, sólo unos pocos de los cuales causan infecciones en mamíferos vertebrados. Debido a que los hongos son organismos eucariotas, difieren significativamente de las bacterias procariontas en tamaño, organización estructural, ciclo de vida y mecanismo de multiplicación. Los hongos se clasifican generalmente basándose en características morfológicas, modos de reproducción y características del cultivo. A pesar de que los hongos pueden causar diferentes tipos de enfermedades en sujetos, como las alergias respiratorias después de la inhalación de antígenos fúngicos, la intoxicación por hongos debido a la ingestión de sustancias tóxicas, tales como amatoxina y falotoxina producidas por hongos venenosos y aflatoxinas, producidas por especies de *Aspergillus*, no todos los hongos causan enfermedades infecciosas.

Los hongos infecciosos pueden causar infecciones sistémicas o superficiales. La infección sistémica primaria puede ocurrir en sujetos sanos normales y las infecciones oportunistas se encuentran con mayor frecuencia en individuos inmunocomprometidos. Los agentes fúngicos más comunes que causan infección sistémica primaria incluyen *Blastomyces*, *Coccidioides* e *Histoplasma*. Los hongos comunes que causan infección oportunista en sujetos inmunocomprometidos o inmunodeprimidos incluyen, pero no se limitan a, *Candida albicans* (un organismo que normalmente es parte de la flora de las vías respiratorias), *Cryptococcus neoformans* (a veces en la flora normal de las vías respiratorias) y varias especies de *Aspergillus*. Las infecciones fúngicas sistémicas son infecciones invasivas de los órganos internos. El organismo usualmente entra en el cuerpo a través de los pulmones, el tracto gastrointestinal o por vías intravenosas. Estos tipos de infecciones pueden ser causadas por hongos patógenos primarios u hongos oportunistas.

Los hongos incluyen, pero no se limitan a, las especies *Microsporium* o *Traicophyton*, es decir, *Microsporium canis*, *Microsporium gypsum*, *Tricofitin rubrum*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Chlamydia trachomatis* y *Candida albicans*.

Los parásitos incluyen, pero no se limitan a, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium knowlesi*, *Babesia microti*, *Babesia divergens*, *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma*

gondii, *Trichinella spiralis*, *Leishmania major*, *Leishmania donovani*, *Leishmania braziliensis* y *Leishmania tropica*, *Trypanosoma gambiense*, *Trypanosoma rhodesiense* y *Schistosoma mansoni*.

5 Otros microorganismos médicamente relevantes se han descrito ampliamente en la literatura, por ejemplo, ver C. G. A Thomas, Medical Microbiology, Bailliere Tindall, Gran Bretaña 1983. Cada una de las listas anteriores es ilustrativa, y no pretende ser limitante.

10 Otros patógenos incluyen los causantes de la gonorrea, *H. pylori*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., tales como *Streptococcus pneumoniae*, la sífilis; virus tales como el virus del SARS, virus de la hepatitis, virus del herpes, virus del VIH, virus del Nilo Occidental, virus de la gripe, virus de la polio, rinovirus; parásitos como *Giardia* y *Plasmodium malariae* (malaria) y micobacterias tales como *M. tuberculosis*.

15 Los antígenos pueden incluir toxinas u otras moléculas producidas a partir de microorganismos. Ejemplos de tales moléculas se proporcionan a continuación.

20 Ejemplos de toxinas incluyen abrina, ricina y estricnina. Otros ejemplos de toxinas incluyen toxinas producidas por *Corynebacterium diphtheriae* (difteria), *Bordetella pertussis* (tos ferina), *Vibrio cholerae* (cólera), *Bacillus anthracis* (ántrax), *Clostridium botulinum* (botulismo), *Clostridium tetani* (tétanos) y *Escherichia coli* enterohemorrágica (diarrea con sangre y el síndrome urémico hemolítico), toxina alfa de *Staphylococcus aureus*, toxina Shiga (ST), factor citotóxico necrosante tipo 1 (CnF1), toxina termoestable (ST) de *E. coli*, toxina botulínica, neurotoxinas del tétanos, toxina del síndrome del choque tóxico por *S. aureus* (TSST), aerolisina de *Aeromonas hydrophila*, perfringolisina O de *Clostridium perfringens*, hemolisina de *E. coli*, listeriolisina O de *Listeria monocytogenes*, neumolisina de *Streptococcus pneumoniae*, estreptolisina O de *Streptococcus pyogenes*, exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*, DNF de *E. coli*, LT de *E. coli*, CLDT de *E. coli*, EAST de *E. coli*, factor de edema de *Bacillus anthracis*, toxina dermonecrótica de *Bordetella pertussis*, toxina C2 de *Clostridium botulinum*, toxina C3 de *C. botulinum*, toxina A de *Clostridium difficile* A y toxina B de *C. difficile*.

30 Otros ejemplos de bacterias incluyen, pero no se limitan a, *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Clostridium difficile*, *Legionella* spp., *Pneumococcus* spp., *Haemophilus* spp. (por ejemplo, *Haemophilus influenzae*), *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Neisseria* spp. (por ejemplo, *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae*), *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Listeria* spp. (por ejemplo, *L. monocytogenes*), *Pasteurella* spp. (por ejemplo, *Pasteurella multocida*), *Streptobacillus* spp., *Spirillum* spp., *Treponema* spp. (por ejemplo, *Treponema pallidum*), *Actinomyces* spp. (por ejemplo, *Actinomyces israelii*), *Borrelia* spp., *Corynebacterium* spp., *Nocardia* spp., *Gardnerella* spp. (por ejemplo, *Gardnerella vaginalis*), *Campylobacter* spp., *Spirochaeta* spp., *Proteus* spp., *Bacteroides* spp. y *H. pylori*.

40 Otros ejemplos de virus incluyen, pero no se limitan a, VIH, virus del herpes simple 1 y 2 (incluyendo encefalitis, formas neonatal y genital), virus del papiloma humano, citomegalovirus, virus de Epstein Barr, virus de la hepatitis A, B y C, rotavirus, adenovirus, virus de la gripe A, virus respiratorio sincitial, virus de la varicela-zóster, virus de la viruela, virus de la viruela del mono y el virus SARS.

45 Otros ejemplos de hongos que se pueden utilizar incluyen, pero no se limitan a, hongos de la candidiasis, tiña, histoplasmosis, blastomicosis, paracoccidioidomicosis, criptococosis, aspergilosis, cromomicosis, micetoma, pseudallescheriasis y tiña versicolor.

50 Otros ejemplos de parásitos que se pueden utilizar incluyen, pero no se limitan a, protozoos y nematodos tales como los responsables de la amebiasis, *Trypanosoma cruzi*, *Fascioliasis* (por ejemplo, *Facioloa hepatica*), *Leishmaniasis*, *Plasmodium* (por ejemplo, *P. falciparum*, *P. knowlesi*, *P. malariae*), oncocercosis, paragonimiasis, *Trypanosoma brucei*, *Pneumocystis* (por ejemplo, *Pneumocystis carinii*), *Trichomonas vaginalis*, *Taenia*, *Hymenolepsis* (por ejemplo, *Hymenolepsis nana*), *Echinococcus*, esquistosomiasis (por ejemplo, *Schistosoma mansoni*), neurocisticercosis, *Necator americanus* y *Trichuris trichuria*.

55 Otros ejemplos de patógenos que pueden utilizarse incluyen, pero no se limitan a, *Chlamydia*, *M. tuberculosis* y *M. leprae* y rickettsias.

60 Un antígeno que se puede utilizar en sujetos que tienen o están en riesgo de desarrollar cáncer incluye, pero no se limita a, un antígeno asociado al cáncer. Antígenos asociados al cáncer incluyen, pero no se limitan a, HER 2 (p185), CD20, CD33, gangliósido GD3, gangliósido GD2, antígeno carcinoembrionario (CEA), CD22, proteína de núcleo de mucina de la leche, TAG-72, antígeno Lewis A, antígenos asociados al cáncer de ovario tal como OV-TL3 y MOV18, antígenos de alto Pm asociados al melanoma reconocidos por el anticuerpo 9.2.27. HMFG-2.SM-3, B72.3.PR5C5, PR4D2 y similares. Otros antígenos de cáncer se describen en la patente US-5.776.427.

65 Los antígenos asociados al cáncer se pueden clasificar de diferentes maneras. Los antígenos asociados al cáncer incluyen antígenos codificados por genes que han sufrido una alteración cromosómica. Muchos de estos antígenos se encuentran en el linfoma y la leucemia. Incluso dentro de esta clasificación, los antígenos pueden ser caracterizados como aquellos que implican la activación de genes quiescentes. Estos incluyen BCL-1 e IgH (linfoma

de células del manto), BCL-2 e IgH (linfoma folicular), BCL-6 (linfoma difuso de linfocitos B grandes), TAL-1 y TCR o SIL (leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T), c-MYC e IgH o IgL (linfoma de Burkitt), MUN/IRF4 e IgH (mieloma), PAX-5 (BSAP) (inmunocitoma).

5 Otros antígenos asociados al cáncer que implican alteración cromosómica y con ello crean un gen y/o proteína de fusión novedoso incluyen RAR, PML, PLZF, NPM o NuMA (leucemia promielocítica aguda), BCR y ABL (mieloides crónica/leucemia linfoblástica aguda), MLL (HRX) (leucemia aguda), E2A y PBX o HLF (leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B), NPM, ALK (leucemia anaplásica de células grandes) y NPM, MLF-1 (síndrome mielodisplásico/leucemia mieloide aguda).

10 Otros antígenos asociados al cáncer son específicos de un tejido o linaje celular. Estos incluyen proteínas de la superficie celular, tales como CD20, CD22 (linfoma no Hodgkin, linfoma de linfocitos B, leucemia linfocítica crónica (LLC)), CD52 (LLC de linfocitos B), CD33 (leucemia mielógena aguda (LMA)), CD10 (gp100) (leucemia linfocítica aguda (pre-B) común y melanoma maligno), CD3/receptor de linfocitos T (TCR) (linfoma de linfocitos T y leucemia),
15 CD79/receptor de linfocitos B (BCR) (linfoma de linfocitos B y leucemia), CD26 (neoplasias epiteliales y linfoides), antígeno leucocitario humano (HLA)-DR, HLA-DP, y HLA-DQ (neoplasias linfoides), RCAS1 (carcinomas ginecológicos, adenocarcinomas biliar y adenocarcinomas ductales de páncreas) y antígeno de membrana específico de la próstata (cáncer de próstata).

20 Antígenos asociados al cáncer específicos de un tejido o linaje celular también incluyen receptores de factor de crecimiento epidérmico (alta expresión), tales como EGFR (HER1 o erbB1) y EGFRvIII (cáncer de cerebro, pulmón, mama, próstata y cáncer de estómago), erbB2 (HER2 o HER2/neu) (cáncer de mama y cáncer gástrico), erbB3 (HER3) (adenocarcinoma) y erbB4 (HER4) (cáncer de mama).

25 Antígenos asociados al cáncer específicos de un tejido o linaje celular también incluyen proteínas asociadas a la célula, tales como como tirosinasa, Melan-A/MART-1, proteína relacionada con la tirosinasa (TRP)-1/gp75 (melanoma maligno), mucina epitelial polimórfica (PEM) (tumores de mama) y mucina epitelial humana (MUC1) (cánceres de mama, ovario, colon y pulmón).

30 Antígenos asociados al cáncer específicos de un tejido o linaje celular también incluyen proteínas secretadas tales como inmunoglobulina monoclonal (mieloma múltiple y plasmocitoma), cadenas ligeras de inmunoglobulina (mieloma múltiple), alfa-fetoproteína (carcinoma de hígado), calcitreínas 6 y 10 (cáncer de ovario), péptido liberador de gastrina/bombesina (carcinoma de pulmón) y antígeno específico de la próstata (cáncer de próstata).

35 Otros antígenos asociados al cáncer son los antígenos asociados al cáncer de testículos (CT) que se expresan en algunos tejidos normales, tales como los testículos y en algunos casos en la placenta. Su expresión es común en tumores de diversos linajes y como grupo, los antígenos forman dianas para la inmunoterapia. Ejemplos de expresión tumoral de antígenos asociados al CT incluyen MAGE-A1, -A3, -A6, -A12, BAGE, GAGE, HAGE, LAGE-1, NY-ESO-1, RAGE, SSX-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, HOM-TES-14/SCP-1, HOM-TES-85 y PRAME. Otros ejemplos
40 más de antígenos asociados al CT y a los cánceres en los que se expresan incluyen SSX-2, y -4 (neuroblastoma), SSX-2 (HOM-MEL-40), MAGE, GAGE, BAGE y PRAME (melanoma maligno), HOM-TES-14/SCP-1 (meningioma), SSX-4 (oligodendrioglioma), HOM-TES-14/SCP-1, MAGE-3 y SSX-4 (astrocitoma), miembro de SSX (cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, tumores linfoides, cáncer colorrectal y cáncer de mama), RAGE-1, -2, -4, GAGE-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7 y -8 (carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (CCECC)), HOM-TES14/SCP-1,
45 PRAME, SSX-1 y CT-7 (linfoma no Hodgkin) y PRAME (leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mielógena aguda (LMA) y leucemia linfocítica crónica (LLC)).

Otros antígenos asociados al cáncer no son específicos de un tejido particular o linaje celular. Estos incluyen miembros de la familia de antígeno carcinoembrionario (CEA):CD66a, CD66b, CD66c, CD66d y CD66e. Estos
50 antígenos se pueden expresar en diversos tumores malignos y pueden ser objetivo de inmunoterapia.

Otros antígenos más asociados al cáncer son proteínas virales y éstas incluyen la proteína del virus del papiloma humano (cáncer cervical) y el antígeno nuclear codificado por EBV (EBNA)-1 (linfomas del cuello y cáncer oral).

55 Otros antígenos más asociados al cáncer mutan o expresan de manera aberrante moléculas tales como, pero sin limitarse a, CDK4 y beta-catenina (melanoma).

Otros antígenos más asociados al cáncer pueden seleccionarse del grupo que consiste en MART-1/Melan-A, gp100, proteína de unión a la adenosina desaminasa (ADA), FAP, ciclofilina B, antígeno asociado al cáncer colorrectal (CRC)-C017-1A/GA733, antígeno carcinoembrionario (CEA), CAP-1, CAP-2, etv6, AML1, antígeno específico de la
60 próstata (PSA), PSA-1, PSA-2, PSA-3, antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA), receptor de linfocitos T/CD3-cadena zeta y CD20. El antígeno asociado al cáncer también se puede seleccionar del grupo que consiste en MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12, MAGE-Xp2 (MAGE-B2), MAGE-Xp3 (MAGE-B3), MAGE-XP4 (MAGE-B4),
65 MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE C4, MAGE-C5). En aún otra realización, el antígeno asociado al cáncer se selecciona del grupo que consiste en GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, GAGE-8,

GAGE-9 .Y en otra realización más, el antígeno asociado al cáncer se selecciona del grupo que consiste en BAGE, RAGE, LAGE-1, NAG, GnT-V, MUM-1, CDK4, tirosinasa, p53, familia MUC, HER2/neu, p21ras, RCAS1, [alfa]-fetoproteína, E-cadherina, [alfa]-catenina, P-catenina, [gamma]-catenina, p120ctn, gp100<Pmel117>, PRAME, NY-ESO-1, cdc27, proteína de la poliposis adenomatosa del colon (APC), fodrina, conexina 37, idiotipo de Ig, p15, gp75, gangliósido GM2, gangliósido GD2, proteínas del virus del papiloma humano, familia Smad de antígenos tumorales, Imp-1, P1A, antígeno nuclear codificado por EBV (EBNA)-1, glucógeno fosforilasa cerebral, SSX-1, SSX-2 (HOM-MEL-40), SSX-1, SSX-4, SSX-5, SCP-1 y CT-7 y c-erbB-2.

El antígeno puede ser un antígeno proteico. Puede ser un antígeno enzimático, tal como una enzima de mamífero no humano. Puede ser, por ejemplo la lisozima de huevo de gallina (HEL) o gammaglobulina de pollo (CGG). Puede ser un antígeno útil para un sistema de modelo in vitro.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende un producto de la invención en asociación con uno o más vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables y el uso de dichas composiciones en los métodos de inmunoterapia para el tratamiento o la profilaxis de un ser humano o animal. La composición farmacéutica puede comprender además un inmunoestimulante soluble.

Vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen los usados en formulaciones adecuadas para administración oral, rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), vaginal o parenteral (incluyendo la administración subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intratecal y epidural). Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse por cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de la farmacia.

Los productos y composiciones descritos en la presente memoria pueden usarse para provocar una intensificación de la respuesta inmunitaria in vitro o in vivo. Se pueden utilizar para aumentar la inmunogenicidad de un antígeno. La invención proporciona métodos que comprenden la etapa de poner en contacto los productos y composiciones descritos en la presente memoria con una célula diana, generalmente un linfocito B, con el fin de provocar una respuesta inmunitaria mediada por BCR específica del antígeno. La densidad (y por tanto la avidéz) del antígeno fijado al soporte se ajusta en las formas descritas en la presente memoria para conseguir el efecto deseado.

Los productos y composiciones divulgadas en la presente memoria se pueden administrar a un sujeto para tratar, prevenir o aliviar una enfermedad. Dichas enfermedades pueden ser cualquier enfermedad susceptible de tratamiento con las composiciones y los productos de la invención, por ejemplo, una enfermedad maligna, tal como cáncer y enfermedades infecciosas, una alergia o una enfermedad autoinmunitaria. El tratamiento de un sujeto con productos y composiciones divulgadas en la presente memoria se puede combinar con otros tratamientos.

En la presente memoria se divulga un método para inducir una respuesta inmunitaria mediada por BCR específica del antígeno en un sujeto que comprende la etapa de administrar a un sujeto una cantidad eficaz de un producto o composición como se describe en la presente memoria, para permitir la internalización y activación de linfocitos B mediada por BCR específica.

En la presente memoria se divulga un método para inducir una respuesta inmunitaria mediada por BCR a un antígeno que comprende la etapa de administrar a un sujeto una cantidad eficaz de un producto, comprendiendo el producto (i) un soporte, (ii) al menos un antígeno de unión al BCR fijado al soporte y, opcionalmente, (iii) al menos un inmunoestimulante fijado al soporte, o composición que comprende dicho producto. El antígeno está presente en una densidad (y por tanto avidéz) suficiente en el soporte para permitir la activación mediada por BCR de las respuestas inmunitarias específicas del antígeno. El método se puede utilizar para la vacunación profiláctica o terapéutica.

En la presente memoria se divulga un método para inducir una respuesta inmunitaria mediada por BCR a un antígeno que comprende la etapa de administrar a un sujeto una cantidad eficaz de un producto (o una composición que comprende el producto), comprendiendo el producto (i) un soporte y (ii) al menos un antígeno de unión a BCR fijado al soporte, comprendiendo además el método administrar conjuntamente a un sujeto un inmunoestimulante soluble. El antígeno está presente en una densidad (y por tanto avidéz) suficiente en el soporte para permitir la activación mediada por BCR de las respuestas inmunitarias específicas del antígeno. El método se puede utilizar para la vacunación profiláctica o terapéutica.

Las formas adecuadas de administración de los productos y composiciones de la presente invención son conocidas en la técnica. Se puede utilizar cualquier método de administración adecuado.

El sujeto puede ser un mamífero no humano, por ejemplo, un conejo, una oveja, una cobaya, etc. El sujeto puede ser un ser humano. El sujeto puede ser un sujeto sano o puede padecer una enfermedad, o se sospecha que padece una enfermedad, susceptible de tratamiento con los productos, composiciones y métodos descritos en la presente memoria. Las enfermedades pueden ser, por ejemplo y sin limitación, una enfermedad maligna, tal como cáncer, una enfermedad infecciosa, como infección con un parásito, o una alergia, o en general una enfermedad autoinmunitaria.

En la presente memoria se divulga un método para aumentar la inmunogenicidad de un antígeno de unión a BCR en un sujeto, que comprende administrar al sujeto un producto que comprende un soporte y dicho antígeno fijado al soporte y en el que o bien un inmunoestimulante está fijado al soporte o se administra conjuntamente con dicho producto.

5 En la presente memoria se divulga un método para aumentar la inmunogenicidad de un antígeno de unión a BCR en un sujeto, que comprende administrar al sujeto un producto o composición como se describe en la presente memoria, en el que el antígeno está presente en una densidad (y por tanto avidez) suficiente en el soporte para permitir la activación de las respuestas inmunitarias específicas del antígeno.

10 Por "aumentar" se entiende que significa intensificar o ampliar la duración de una respuesta inmunitaria. Así, incluso los antígenos que no provocarían una respuesta inmunitaria, o que provocarían una respuesta inmunitaria débil, cuando se administran solos en forma soluble, pueden provocar una respuesta inmunitaria fuerte cuando se administran en un producto tal como se describe en la presente memoria. Así, se intensifica la respuesta inmunitaria al antígeno en comparación con la administración del antígeno solo en forma soluble o en partículas. La respuesta inmunitaria también se intensifica en comparación con la administración del antígeno junto con el inmunoestimulante soluble.

20 En la presente memoria se divulga un proceso para la fabricación de un producto como se describe en la presente memoria, que comprende las etapas de

- (a) fijar un antígeno de unión a BCR a un soporte, y, opcionalmente,
- (b) fijar un inmunoestimulante al soporte. La etapa (b) puede realizarse opcionalmente antes de la etapa (a).

25 En la presente memoria se divulga un método para aumentar la respuesta inmunitaria específica del antígeno a un antígeno de unión a BCR en un sujeto, comprendiendo el método las etapas de

- (a) fijar el antígeno a un soporte, y
- (b) fijar un inmunoestimulante al soporte,
- 30 opcionalmente realizando las etapas (a) y (b) en orden inverso y
- (c) administrar el soporte a un sujeto,

35 en el que el antígeno está presente en una densidad (y por tanto avidez) suficiente en el soporte para permitir la activación específica del BCR.

Como alternativa, el inmunoestimulante no está fijado al soporte, pero se administra conjuntamente al sujeto.

40 En la presente memoria se divulga un soporte para su uso en la preparación de un producto tal como se describe en la presente memoria, en el que un inmunoestimulante está fijado al soporte.

En la presente memoria se divulga un método para intensificar una respuesta inmunitaria específica del antígeno mediada por BCR, en un sujeto, que comprende administrar a un sujeto un producto o composición como se describe en la presente memoria.

45 En la presente memoria se divulga un método para inducir la absorción específica de un inmunoestimulante por una célula, que comprende las etapas de

- (i) fijar un antígeno de unión a BCR a un soporte,
- (ii) fijar el inmunoestimulante a dicho soporte, opcionalmente realizando las etapas (i) y (ii) en orden inverso y (iii)
- 50 poner en contacto la célula con el soporte así preparado para permitir la internalización y activación de los linfocitos B mediada por BCR específica.

La célula expresa BCR y es normalmente un linfocito B. El soporte así preparado es, por lo tanto, adecuado para ser internalizado por un linfocito B. La célula puede estar presente en un tejido o un sujeto.

55 En la presente memoria se divulga un método para inhibir la absorción no específica de un inmunoestimulante por un linfocito B, comprendiendo el método la etapa de fijar dicho inmunoestimulante a un soporte antes del contacto con dicho linfocito B. Al soporte se puede fijar un antígeno, tal como un antígeno de unión a BCR.

60 La inhibición comprende la inhibición parcial, es decir, restringir o limitar la absorción no específica. La presentación del inmunoestimulante sobre un soporte impide la absorción no específica por los linfocitos B. Si al soporte está fijado un antígeno de unión a BCR, la prevención o restricción de la absorción no específica conduce a aumento de la absorción específica del soporte a través de la unión al BCR.

65 En la presente memoria se divulga un método de administración de un antígeno de unión a BCR y un inmunoestimulante a una célula para provocar una respuesta inmunitaria específica del antígeno, que comprende

- (i) fijar un antígeno de unión a BCR a un soporte en una primera densidad,
- (ii) fijar el inmunostimulante a dicho soporte, opcionalmente realizando las etapas (i) y (ii) en orden inverso,
- (iii) poner en contacto el soporte así obtenido con una célula,
- (iv) ensayar la célula para determinar la activación mediada por antígeno, opcionalmente repetir las etapas (ii) a (iv) variando la densidad del antígeno sobre el soporte.

Vacunas - generación de anticuerpos - usos médicos

En la presente memoria se divulga el uso de los productos y métodos descritos en la presente memoria para la vacunación profiláctica o terapéutica de una respuesta inmunitaria mediada por BCR.

En la presente memoria se divulgan productos, composiciones y métodos que se pueden usar para estimular respuestas inmunitarias en seres humanos y/u otros sujetos, que pueden ser beneficiosos para (pero sin limitarse a) prevenir y/o tratar enfermedades. Tal como se usa en la presente memoria, tratar un sujeto significa proporcionar algún beneficio terapéutico o profiláctico para el sujeto. Esto puede ocurrir mediante la reducción parcial o total de los síntomas asociados con una enfermedad particular. El tratamiento de un sujeto no está sin embargo limitado a la curación del objeto del trastorno en particular.

Los productos, composiciones y métodos descritos en la presente memoria pueden usarse como una vacuna. Se pueden usar para la vacunación profiláctica o terapéutica.

Los productos o composiciones descritas en la presente memoria estimulan una respuesta inmunitaria que conduce a la producción de moléculas inmunitarias, incluyendo anticuerpos que se unen a antígenos. En la presente memoria se divulgan vacunas suficientes para reducir el número, la gravedad y/o duración de los síntomas. La vacuna también puede contener antígenos en forma libre y dichos antígenos pueden ser los mismos o diferentes de aquellos que se encuentran sobre el soporte.

Además del producto o composición como se describe anteriormente, una vacuna puede incluir sales, tampones, adyuvantes y otras sustancias o excipientes que pueden ser deseables para mejorar su eficacia. Ejemplos de componentes de la vacuna adecuados, así como una guía general con respecto a los métodos para la preparación de composiciones eficaces se pueden encontrar en textos estándar tales como Remington's Pharmaceutical Sciences (Osol, A, ed., Mack Publishing Co., (1990)). En todos los casos, el producto o composición como se describe en la presente memoria debe estar presente en una cantidad eficaz, es decir, una cantidad que produce el efecto deseado. Otros componentes de la vacuna deben ser fisiológicamente aceptables. La vacuna de la presente invención se puede administrar mediante dosis únicas o múltiples de una cantidad eficaz de producto o composición.

La vacuna se administra generalmente en cantidades eficaces, es decir, cantidades que son suficientes para inducir la respuesta inmunitaria deseada.

Las vacunas se pueden administrar a sujetos por cualquier vía conocida en la técnica, incluyendo vías parenterales (por ejemplo, inyección), inhalación, administración tópica u oral. Los métodos adecuados incluyen, por ejemplo, inyección intramuscular, intravenosa o subcutánea o administración intradérmica o intranasal. Vehículos adecuados que pueden usarse en preparaciones para inyección incluyen soluciones acuosas estériles (por ejemplo, solución salina fisiológica) o soluciones y suspensiones no acuosas, tales como propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Las estrategias de tratamiento y administración se pueden desarrollar utilizando la guía proporcionada por los trabajos de referencia estándar (ver, por ejemplo, N. Engl. J. Med. 345(16):1177-1183 (2001) para el tratamiento de niños y Arch. Intern. Med 154 (22):2545-57 (1994) para los tratamientos de adultos; ver Arch. Intern. Med 28, 154 (4):373-7 (1994) para una revisión de los ensayos clínicos.

Las vacunas pueden administrarse a un sujeto para tratar una enfermedad después de que han aparecido los síntomas. En estos casos, será ventajoso iniciar el tratamiento tan pronto como sea posible después de que aparezcan los síntomas y, dependiendo de las circunstancias, combinar la administración de la vacuna con otros tratamientos, por ejemplo, la administración de antibióticos o tratamientos contra el cáncer como la quimioterapia o la radioterapia.

En la presente memoria se divulga un método de producción de moléculas inmunitarias, tales como anticuerpos, contra un antígeno, comprendiendo dicho método introducir un producto o composición de la invención en un mamífero no humano y recuperar el suero inmunitario de dicho mamífero. El suero inmunitario obtenible por este método también se divulga en la presente memoria.

Los métodos de obtención del suero y los anticuerpos, incluyendo anticuerpos monoclonales, así como diferentes formas de anticuerpos, incluyendo fragmentos de anticuerpos, son conocidos en la técnica (Roitt's Essential Immunology, undécima edición, Blackwell Publishing).

Los métodos de producción de anticuerpos incluyen inmunizar un mamífero (por ejemplo, ratón, rata, conejo, caballo, cabra, oveja o mono) con los productos o composiciones descritas en la presente memoria. Los anticuerpos pueden obtenerse a partir de animales inmunizados usando cualquiera de varias técnicas conocidas en la técnica y pueden ensayarse, preferiblemente usando la unión del anticuerpo al antígeno de interés.

5 Por ejemplo, se pueden utilizar técnicas de transferencia Western o inmunoprecipitación (Armitage et al, 1992, Nature 357:80-82). Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales.

10 Los anticuerpos pueden ser modificados de diferentes maneras. De hecho, el término "anticuerpo" debe interpretarse como que abarca cualquier sustancia de unión específica que tiene un dominio de unión con la especificidad requerida. Por lo tanto, este término abarca fragmentos de anticuerpos, derivados, equivalentes funcionales y homólogos de anticuerpos, incluyendo cualquier polipéptido que comprende un dominio de unión de inmunoglobulina, ya sea natural o sintético. Como alternativa o suplemento a la inmunización de un mamífero, los anticuerpos con especificidad de unión adecuada se pueden obtener de una biblioteca producida de forma recombinante de dominios variables de inmunoglobulina expresada, por ejemplo, utilizando bacteriófago lambda o bacteriófago filamentosos que muestran dominios de unión de inmunoglobulina funcionales en sus superficies; por ejemplo, véase el documento WO92/01047.

15 En la presente memoria se divulga un método para la aceleración de la producción de anticuerpos específicos, comprendiendo el método introducir un producto o composición como se describe en la presente memoria en un mamífero no humano y recuperar anticuerpos de dicho mamífero.

20 Usando los métodos, productos y/o composiciones descritos en la presente memoria en la generación de suero específico del antígeno o anticuerpos específicos se acorta el intervalo de tiempo entre la inmunización y el momento en el que se generan los anticuerpos específicos en el sujeto inmunizado, en comparación con la inmunización con el antígeno (con o sin inmuoestimulante soluble). En otras palabras, cuando se utilizan los métodos descritos en la presente memoria, se pueden detectar los anticuerpos específicos y recuperar antes en comparación con los métodos de inmunización convencionales.

25 Esto tiene ventajas en la práctica clínica. Por ejemplo, los intervalos de vacunación acortados son beneficiosos para las personas que requieren la inmunización fiable dentro de un plazo de tiempo limitado, tales como por ejemplo los viajeros.

30 Como se discutió anteriormente, los productos y métodos descritos en la presente memoria también tienen como resultado el aumento de las respuestas inmunitarias a un antígeno dado. Esto ofrece más beneficios clínicos y prácticos. Por ejemplo, el número de administraciones de una vacuna se puede reducir debido a una mejor respuesta inmunitaria. Por ejemplo, la vacuna profiláctica contra el VHB se suele administrar con 3 administraciones a los 0, 1 y 6 meses. A menudo, las personas reciben la vacuna en el mes 0 y 1, pero no regresan para la administración final a los 6 meses. Ser capaz de reducir el número de administraciones necesarias para lograr una inmunización fiable, es por tanto, beneficiosa. Ser capaz de inducir la intensificación de una respuesta inmunitaria es además beneficioso para la vacunación de las personas con un sistema inmunitario debilitado o menos sensible, tales como por ejemplo los ancianos. Generalmente, si el ciclo de administración normal con una vacuna no puede establecer una inmunización fiable en estos individuos, estos tienen que recibir una administración más. Usando los productos y métodos de la invención, también se puede conseguir una respuesta fuerte en estos individuos, lo que hace innecesario una etapa de administración adicional.

35 Los métodos y productos divulgados en la presente memoria, por lo tanto, permiten conseguir la inmunización dentro de un tiempo más corto y/o con menos administraciones.

40 También son beneficiosos en el tratamiento y la terapia tiempos de respuesta más breves, donde una respuesta rápida y fuerte a un agente administrado es crítica para el tratamiento o permite una recuperación más rápida del paciente y/o un alivio más rápido de los síntomas.

45 Por lo tanto, en la presente memoria se describen métodos, productos y composiciones para la aceleración de una respuesta inmunitaria mediada por BCR específica del antígeno.

Las moléculas inmunitarias producidas por la inmunización con vacunas, por ejemplo, anticuerpos, pueden ser transferidas a otra persona, por lo transfiriendo pasivamente la inmunidad.

50 En la presente memoria se divulga un método de inmunización pasiva frente a una enfermedad, comprendiendo dicho método administrar a un sujeto un suero inmunitario que contiene anticuerpos obtenibles por los métodos descritos en la presente memoria.

55 Los productos y composiciones de la presente invención encuentran utilidad como medicamentos.

60 La administración preferencial de un agente es a las células dendríticas frente a los linfocitos B.

Los autores han demostrado que mientras que el inmunoestimulante soluble es captado de forma inespecífica por los linfocitos B, un inmunoestimulante fijado a un soporte no es captado por los linfocitos B (Fig 1B, C), sino que es internalizado por las células dendríticas (Fig 19). Por lo tanto, al fijar un agente a un soporte, es posible evitar la absorción por los linfocitos B y en su lugar conseguir la administración preferencial a las células dendríticas. Dado que el número de linfocitos B en la sangre de, por ejemplo, un ser humano es mayor que el número de células dendríticas, una gran proporción de moléculas de agente será captada en general por los linfocitos B, si el agente se administra en una forma soluble. Por tanto, debe administrarse más agente para conseguir una administración suficiente a las células dendríticas. Utilizando los métodos divulgados en la presente memoria, se puede lograr la administración dirigida (específica) a células dendríticas (administración preferencial a las células dendríticas frente a los linfocitos B). Esto tiene varias ventajas. Se puede administrar menos agente, ya que se administra de manera más eficiente a las células dendríticas y no es captado por los linfocitos B. Además, se pueden esperar menos efectos secundarios o menos graves ya que existe una disminución de la activación no específica de linfocitos B.

En la presente memoria se divulga un método de administración de un agente preferentemente a las células dendríticas frente a los linfocitos B, comprendiendo el método

- (i) fijar el agente a un soporte,
- (ii) poner en contacto una población de células con el agente fijado al soporte, en el que la población de células comprende linfocitos B y células dendríticas.

El soporte está exento de antígeno BCR de modo que no se pueda inducir la absorción por los linfocitos B mediada por BCR (o exento de antígeno BCR en una cantidad que pudiera inducir la absorción mediada por BCR).

El método se puede realizar in vivo o in vitro.

En la presente memoria se divulga un método de administración de un agente preferentemente a las células dendríticas frente a los linfocitos B a un sujeto, comprendiendo el método

- (i) fijar el agente a un soporte,
- (ii) administrar el agente sobre el soporte a un sujeto.

El sujeto puede ser un mamífero, preferiblemente un ser humano.

El agente puede ser un inmunoestimulante como se ha descrito describe anteriormente.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Lípidos inmunoestimuladores

MATERIALES Y MÉTODOS

Antígenos, preparación lipídica y revestimiento de microesferas

HEL y OVA fueron adquiridos en Sigma y CGG en Jackson Immuno Research. En caso necesario, los antígenos se biotinilaron mediante el uso de sulfo-NHS-LC-LC-biotina (Pierce). 1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfolina (DOPC) y N-Cap biotini-fosfatidiletanolamina (PE-biotina) se adquirieron en Avanti Polar Lipids. α GalCer se adquirió en Alexis Biochemical. IMM47 fue un obsequio del Dr. Vincenzo Cerundolo (WO2007/050668). La síntesis de α GalCer-Alexa 488 se basó en la metodología utilizada para la síntesis de α GalCer biotinilada (36) utilizando Alexa Fluor 488 (Invitrogen). Para la preparación de liposomas que contienen DOPC/PE-biotina (98/2, m/m) o DOPC/PE-biotina/ α GalCer (88/2/10, m/m/m) los lípidos se secaron en atmósfera de argón y se resuspendieron en Tris 25 mM/NaCl 150 mM, pH 7,0 con una mezcla vigorosa.

Las microesferas de sílice (100 nm) se adquirieron en Kisker GbR. Para el revestimiento, las microesferas se incubaron con liposomas seguido de la adición de estreptavidina y cantidades de saturación de proteínas biotiniladas. Para las perlas recubiertas con diferentes densidades/ afinidades de HEL, los antígenos se unieron a las partículas mediante el uso de un anticuerpo anti-HEL (Fab'2)-F10 biotinilado. Cuando se requerían diferentes densidades de antígeno, el anticuerpo biotinilado competía con diferentes cantidades de CGG biotinilado. La densidad de HEL en las perlas se detectó mediante FACS utilizando un anticuerpo monoclonal anti-HEL. La unión del antígeno a perlas recubiertas de liposomas se detectó por transferencia Western.

Para la cuantificación de la cantidad de α GalCer unida a las partículas, estas se recubrieron con liposomas que contienen α GalCer-Alexa 488. La intensidad de fluorescencia de las perlas recubiertas con liposomas se midió usando un lector de EnVision Multilabel y se relacionó con la intensidad de fluorescencia de diferentes cantidades de liposomas que contienen α GalCer-Alexa 488.

Ratones y líneas celulares

5 Los ratones MD4, D1.3, D1.3-H2 y J α 18^{-/-} fueron criados y mantenidos en las instalaciones de animales del Cancer Research UK y del Hospital John Radcliffe, Oxford. Los ratones C57BL/6 fueron adquiridos en Charles River. Todos los experimentos fueron aprobados por el Cancer Research UK Animal Ethics Committee y el United Kingdom Home Office. El hibridoma iNKT DN32.D3 fue proporcionado amablemente por A. Bendelac (Universidad de Chicago, Chicago, IL).

Ensayos de purificación y presentación de linfocitos B

10 Los linfocitos B del bazo fueron enriquecidos por selección negativa hasta > 99 % de pureza usando el kit de purificación de linfocitos B (Miltenyi Biotec). Para el análisis de presentación de α GalCer, los linfocitos B se incubaron durante la noche con partículas que contienen α GalCer y/o HEL, se lavaron extensamente y se cultivaron a razón de 5 x 10⁴ células por pocillo con el mismo número de células DN32.D3. La activación de NKT se ensayó
15 midiendo la producción de IL-2 en el sobrenadante del cultivo. Para los experimentos de bloqueo se incubaron células MD4 B con un anticuerpo de bloqueo antiCD1d (25 μ g/ml; clon 1B1) durante 2 h antes de la incubación con los linfocitos iNKT.

Transferencia adoptiva y análisis FACS

20 Se marcaron de cinco a diez millones de linfocitos B MD4 con CFSE 2 μ M (Molecular Probes) y se transfirieron adoptivamente por inyección en la vena caudal a ratones C57BL/6 WT o J α 18^{-/-} junto con las partículas que contienen α GalCer y/o HEL. Cinco días más tarde se recogieron los bazos de los ratones receptores y los esplenocitos se tiñeron para detectar las moléculas de superficie y la unión a HEL intracelular como se ha descrito
25 previamente (37).

Inmunizaciones

30 Los ratones se inmunizaron por vía intraperitoneal con 1-10 μ l de perlas que contienen diferentes antígenos y/o α GalCer. Los niveles de Ig específicos del antígeno se determinaron en sueros de ratones mediante ELISA.

ELISA y ELISPOT

35 La concentración de IL-2 en el sobrenadante de los cultivos se determinó por ELISA usando el anticuerpo de captura JES6-1A12 (BD Pharmingen). Se utilizó el JSE6-5H4 biotinilado (BD Pharmingen) para la detección. Los anticuerpos específicos en los sueros de los ratones se midieron utilizando placas recubiertas con antígeno (HEL, OVA u CGG) y diluciones seriadas de sueros. Los anticuerpos unidos se detectaron con anti-IgM, IgG, IgG1, IgG2b, IgG2c o IgG3 de ratón de cabra marcado con biotina (BD Pharmingen).

40 La frecuencia de células secretoras de anticuerpos anti-HEL se detectó mediante ELISPOT. Las suspensiones de células individuales de esplenocitos se incubaron durante 15-18 horas en placas de filtración de multipantalla recubiertas con HEL (Millipore). Las manchas se revelaron con anti-IgMa de ratón biotinilado obtenido en cabra seguido de estreptavidina-peroxidasa y 3-amino-9-etil-carbazol (Sigma).

Inmunohistoquímica

50 Se fijaron cortes de criostato (10 μ m de espesor) de los bazos fueron y se tiñeron con anti-CD45R/B220 de ratón obtenido en ratas (BD Biosciences). Las células HEL + se detectaron mediante la adición de HEL (200 ng/ml), seguido por el anticuerpo anti-HEL F10 Alexa-488. Los centros germinales se tiñeron con PNA-biotina (Vector Labs) y estreptavidina-Alexa 633.

RESULTADOS

55 Nuestro objetivo era investigar el impacto de la orientación a los linfocitos iNKT para ayudar a los linfocitos B específicos del antígeno durante el desarrollo de una respuesta inmunitaria. Con este fin hemos recubierto perlas de sílice (100 nm) con liposomas que contienen DOPC y PE-biotina en presencia de α GalCer (fig.1A). Se utilizó α GalCer marcada con Alexa-488 para cuantificar la cantidad de α GalCer cargada en las perlas y se determinó que esta era de 150 ng por μ l de perlas (10⁸ perlas/ μ l). Para evaluar la capacidad de los linfocitos B para presentar la α GalCer in vitro, se estimularon los linfocitos B durante 20 h con α GalCer en partículas o soluble antes de su
60 incubación con los linfocitos iNKT derivados de un hibridoma de ratón (DN32.D3). La secreción de IL-2 en el medio de cultivo se utilizó para medir la activación de linfocitos iNKT. De acuerdo con los informes anteriores (17), α GalCer soluble se presentó de manera eficiente por los linfocitos B e indujo la producción de IL-2 (Fig.1B). Por el contrario, al estimular con α GalCer en partículas se observó una atenuación severa de la producción de IL-2 a partir de linfocitos iNKT. Por lo tanto, los linfocitos B captaron mucho menos antígeno lipídico en partículas a través de la
65 manera no selectiva observada para α GalCer soluble.

La presentación dependiente de CD1d de los lípidos antigénicos en partículas a los linfocitos iNKT se ve reforzada por la absorción mediada por BCR

Hemos unido lisozima de huevo de gallina (HEL) biotinilada, a través de un enlazador de estreptavidina a partículas cargadas con o sin α GalCer. La cantidad total de proteína unida se estimó usando transferencia Western (Fig. 1A). Para evaluar la capacidad de los linfocitos B para mediar en la absorción y presentación de estas partículas específicas de BCR, hemos utilizado linfocitos B primarios transgénicos específicos de HEL (MD4) y células DN32.D3. Los linfocitos B MD4 estimulados con HEL- α GalCer en partículas indujo una fuerte activación iNKT (Fig. 1C). Por el contrario, la producción de IL-2 no se detectó después de la incubación con HEL o α GalCer en partículas solo. Además, no se observó activación de iNKT después de la estimulación de los linfocitos B WT con HEL en partículas conjugada con α GalCer. Curiosamente, los linfocitos B MD4 de la zona marginal (purificados por clasificación FACS de la población de linfocitos B CD21^{alto} CD23^{bajo}) eran más eficientes en la presentación de HEL- α GalCer en partículas a linfocitos iNKT que los linfocitos B foliculares (Fig. 6). Es importante destacar que la activación de linfocitos iNKT está completamente bloqueada por la pre-incubación de los linfocitos B con un anticuerpo monoclonal contra CD1d, lo que indica que este proceso es absolutamente dependiente de la presentación mediada por CD1d (Fig. 1D). Estas observaciones demuestran que el reconocimiento del antígeno específico por BCR puede mejorar drásticamente la presentación del antígeno lipídico en partículas a los linfocitos iNKT.

Para explorar el efecto de la alteración de la afinidad del antígeno hemos utilizado diversas proteínas HEL que representan una amplia gama de afinidades por el BCR MD4 (HEL^{WT} $K_a = 2,1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$; HEL^{RDGN} $K_a = 5,2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$; HEL^{RKD} $K_a = 8,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) (18). Como se muestra en la Fig.1E y 1F, con la mayor densidad de antígeno se observaron niveles similares de activación de linfocitos iNKT independientemente de la afinidad del antígeno conjugado con α GalCer en partículas. Curiosamente, incluso el antígeno de baja afinidad HEL^{RKD} aumenta la presentación de α GalCer en partículas a iNKTs. Sin embargo, la disminución de la densidad de este antígeno en la superficie de la partícula 20 veces abolió la presentación de α GalCer en partículas (Fig. 1F). Por lo tanto, estos hallazgos indican que incluso los antígenos de muy baja afinidad pueden inducir la presentación eficiente de α GalCer en partículas siempre que exceden un umbral de avidéz estrechamente regulado para la estimulación del BCR.

Aunque el reconocimiento del antígeno por el BCR es necesario, no es suficiente para conducir la presentación óptima de los linfocitos B. Hemos observado que los linfocitos B transgénicos que expresan BCR con señalización deficiente (IgM-H2) con alta afinidad para HEL, mostraban una capacidad disminuida para inducir la activación de iNKT (Fig. 1G). De acuerdo con estos hallazgos HEL en partículas conjugada con α GalCer o Gal($\alpha 1 \rightarrow 2$) α GalCer daba lugar a una activación igualmente potente de los linfocitos iNKT (Fig. 1H). Como Gal($\alpha 1 \rightarrow 2$) α GalCer requiere un procesamiento intracelular antes de que pueda ser efectivamente reconocida por los linfocitos iNKT (19), se puede concluir que las perlas que contienen lípidos son internalizadas dentro de los linfocitos B antes de su presentación a los linfocitos iNKT.

Además, los inventores han demostrado la aplicabilidad más amplia de las observaciones descritas mediante el uso de otro agonista de linfocitos iNKT conocido como IMM47. De manera similar a α GalCer, se observó que IMM47 en partículas cuando se conjugaba con el antígeno daba lugar a la estimulación de los linfocitos iNKT in vitro a través de la producción de IL-2 (Fig.11).

Por lo tanto, se requiere el reconocimiento del antígeno y la internalización de los linfocitos B mediado por BCR para la presentación de α GalCer en partículas a los linfocitos iNKT.

La absorción mediada por BCR de α GalCer en partículas conduce al reclutamiento de la ayuda de linfocitos iNKT lo que se traduce en una intensa proliferación de linfocitos B y producción de anticuerpos in vivo

Habiendo demostrado que la absorción mediada por BCR de lípidos antigénicos en partículas conduce a la activación de linfocitos iNKT in vitro, se investigó el impacto de la absorción mediada por BCR de α GalCer en partículas en la activación y destino de los linfocitos B in vivo. Con este fin, se transfirieron de forma adoptiva linfocitos B de ratones MD4 específicos de HEL marcados con CFSE a receptores C57BL/6 estimulados por vía intravenosa con HEL en partículas con o sin α GalCer conjugada, en ausencia de cualquier otro adyuvante. Cinco días después de la estimulación, se extrajeron los bazo de los ratones receptores y la dilución de CFSE en la población de linfocitos B específicos de HEL se utilizó como una medida de la proliferación de linfocitos B.

Como se muestra en la Fig. 2A, se observó una extensa proliferación de los linfocitos B específicos de HEL en respuesta a HEL en partículas conjugada con α GalCer, después de cinco días los linfocitos B MD4 constituyen más del 7 % de los linfocitos esplénicos totales. Estos linfocitos B específicos de HEL se originaron a partir de las células MD4 transferidas de manera adoptiva, ya que no se detectaron tras la estimulación con HEL- α GalCer en partículas de C57BL/6. Es importante destacar que no se detectó proliferación después de la estimulación con α GalCer en partículas o HEL solo, ya que la propia HEL es incapaz de provocar una respuesta dependiente de linfocitos T en el fondo de C57BL/6 (20). Además, la proliferación de linfocitos B específicos de HEL era dependiente de la presencia de linfocitos iNKT, ya que no se observó en los experimentos de transferencia adoptiva similares utilizando ratones

J α 18^{-/-} como receptores (Fig. 2B).

El análisis inmunohistológico de cortes de bazo confirmó la expansión de los linfocitos B específicos de HEL en respuesta a partículas de HEL- α GalCer (Fig. 2C). Curiosamente, estos linfocitos B específicos de HEL expandidos se localizaban predominantemente como focos extrafoliulares en los canales del puente y la pulpa roja del bazo y mostraban una intensa tinción de HEL citoplasmática característica de las CP (Fig. 2C). La presencia de CP específicas se confirmó mediante citometría de flujo, basándose en la elevada tinción de HEL y la expresión de CD138 (Fig. 2D). La diferenciación de las CP fue acompañada por la producción de altos títulos de anticuerpos IgM anti-HEL (Fig. 2F). Estos anticuerpos se derivaban exclusivamente de los linfocitos B MD4 transferidos, ya que los anticuerpos producidos por ratones C57BL/6 serían del alotipo IgH^b. Las CP específicas de HEL o los anticuerpos anti-HEL no se detectaron en ratones estimulados con HEL o α GalCer en partículas solo (Fig. 2D y F). Las células secretoras de anticuerpos también se identificaron mediante ELISPOT específico de HEL sólo en los receptores estimulados con partículas que contienen HEL- α GalCer (Fig. 2E). Además, los linfocitos CD138⁺ HEL⁺ esplénicos no estaban presentes tras la estimulación con HEL- α GalCer en partículas de los linfocitos B MD4 transferidos adoptivamente en ratones J α 18^{-/-} (Fig. 2D y F). Por lo tanto la diferenciación en CP de los linfocitos B específicos de HEL en respuesta a HEL- α GalCer en partículas era dependiente de la presencia de linfocitos iNKT.

En particular y de acuerdo con nuestras observaciones in vitro, la proliferación de linfocitos B y la producción de anticuerpos dependían de la avidéz del BCR por el antígeno presente en las partículas (Fig. 3A-C). Una reducción de la afinidad o la densidad de HEL en la α GalCer en partículas tuvo como resultado la disminución de la proliferación de linfocitos B y de la producción de anticuerpos. Por lo tanto un umbral de avidéz para la internalización mediada por BCR de α GalCer en partículas también está presente in vivo. Sin embargo, es evidente que incluso un antígeno de baja afinidad puede inducir de manera eficiente la presentación de α GalCer a los iNKT, lo que permite la estimulación de las respuestas de linfocitos B.

La unión del antígeno proteico y del inmunoestimulante antigénico lipídico mediante las partículas dio lugar a una intensificación de la proliferación de linfocitos B y de la producción de anticuerpos mucho mayor que la observada para HEL en partículas sola administrada con α GalCer soluble (Fig. 3D-F). Significativamente, esto indica que la absorción de BCR específica de los lípidos antigénicos representa un medio más eficiente de internalización que el empleado por α GalCer soluble. La estimulación con HEL- α GalCer en partículas se traduce en una mayor estimulación de las respuestas de linfocitos B específicos mediadas por iNKT. Por lo tanto, hemos identificado una estrategia que implica lípidos antigénicos en partículas para permitir la intensificación y la proliferación de linfocitos B específicos y el desarrollo de CP extrafoliulares funcionales in vivo.

La inmunización con el antígeno en partículas conjugado con α GalCer intensifica las respuestas de anticuerpos específicos

Dado el impacto de la α GalCer en partículas con el antígeno conjugado sobre el destino de los linfocitos B, tratamos de investigar su capacidad para inducir una respuesta inmunitaria sistémica in vivo. Para evaluar esto, hemos utilizado una estrategia de inmunización intraperitoneal de dosis única, empleando gammaglobulina de pollo (CGG) como antígeno. Se ha demostrado previamente que CGG induce fuertes respuestas dependientes de linfocitos T en ratones. Ratones C57BL/6 y J α 18^{-/-} fueron estimulados con CGG en partículas conjugado con α GalCer y después de 7 y 14 días se analizaron las respuestas de anticuerpos específicos mediante ELISA.

Se detectó la producción de anticuerpos anti-CGG específicos, que comprende títulos elevados de IgM y de la clase cambiada a IgG ya a los 7 días después de la inmunización de ratones C57BL/6 con CGG en partículas conjugadas con α GalCer (Fig. 4A). No se detectaron anticuerpos específicos en este momento en ratones inmunizados con CGG o α GalCer en partículas solo. La inmunización de los dos tipos de ratones, C57BL/6 y J α 18^{-/-} con CGG en partículas dio lugar a respuestas de anticuerpos específicos similares a lo largo de todo el transcurso de tiempo medido después de la inmunización (Fig. 4B). Por el contrario, la inmunización con CGG en partículas conjugado con α GalCer indujo un aumento drástico de la producción de anticuerpos específicos de CGG en ratones C57BL/6 en comparación con los ratones J α 18^{-/-}. Esto demuestra el requisito de iNKT para la producción de anticuerpos específicos en respuesta a α GalCer en partículas conjugado con antígeno. Es importante destacar que, se detectó el mismo patrón de anticuerpos específicos de antígeno cambiado de clase observados usando CGG como antígeno, en respuesta a la inmunización de ratones C57BL/6 con HEL conjugado con α GalCer en partículas (Fig. 4C). Por lo tanto, tras la inmunización, los linfocitos iNKT pueden activar de manera eficiente la producción de anticuerpos específicos y el cambio de clase sin el reclutamiento de linfocitos T cooperadores CD4⁺ específicos.

Hasta ahora hemos demostrado que se requiere el reconocimiento específico de BCR para la presentación de linfocitos B eficiente de los lípidos antigénicos en partículas a linfocitos iNKT y que el reclutamiento de ayuda de linfocitos iNKT puede modular la activación de linfocitos B. Sin embargo, estábamos interesados en evaluar el impacto de la co-absorción de antígeno y α GalCer en la producción de anticuerpos específicos durante el desarrollo de una respuesta inmunitaria sistémica. Para abordar esto, inmunizamos ratones C57BL/6 con dos combinaciones diferentes de partículas: Un primer grupo de ratones se inmunizó con CGG en partículas conjugado con α GalCer junto ovoalbúmina (OVA) en partículas, mientras que un segundo grupo recibió OVA en partículas conjugado con α GalCer junto CGG en partículas (Fig. 5A). Niveles elevados de anticuerpos específicos se generaron en cada grupo

en respuesta al antígeno- conjugado con α GalCer, mostrando que la co-absorción de antígeno- α GalCer intensifica la activación de linfocitos B y la producción de anticuerpos específicos (Fig. 5A). Cabe destacar que también se observó una intensificación en la producción de anticuerpos específicos en respuesta a la inmunización con CGG en partículas conjugado con α GalCer en comparación con CGG en partículas y α GalCer soluble (Fig. 5B). Este resultado, de acuerdo con nuestros experimentos de proliferación in vivo, demuestra que la absorción mediada por BCR de α GalCer en partículas es más eficiente que la absorción de α GalCer soluble, lo que se traduce en una intensificación de las respuestas de linfocitos B específicos.

Ejemplo 2 - agonistas de TLR

MATERIALES Y MÉTODOS (cuando sean diferentes de los descritos en el Ejemplo 1)

Materiales

CpG OD1668 biotinilado con enlace fosforotioato se adquirió en Sigma. Las microesferas de poliestireno recubiertas con estreptavidina (130 nm) se adquirieron en Bangs Laboratories.

Purificación de linfocitos B y proliferación in vitro

Los linfocitos B esplénicos fueron enriquecidos por selección negativa hasta > 99 % de pureza usando el kit de purificación de linfocitos B (Miltenyi Biotec). Los linfocitos B MD4 fueron marcados con 2 μ m de CFSE, se cultivaron a razón de 1×10^6 células y se incubaron con partículas que contienen HEL y/o CpG. Después de 72 h, las células se cosecharon y se sometieron a análisis de citometría de flujo. El sobrenadante se recogió y se determinó por ELISA la secreción de IL-6 e IgM específica de HEL.

El antígeno-CpG en partículas estimula la proliferación y la diferenciación in vitro del linfocitos B

Hemos utilizado el inmunoestimulante CpG, un agonista de TLR9, como un sistema modelo para la activación de las respuestas de TLR intracelulares. En primer lugar hemos querido investigar si se requería la absorción del antígeno mediada por BCR para que las partículas CpG se internalicen. Por lo tanto, se recubrieron microesferas de poliestireno recubiertas con estreptavidina comparables al tamaño de un virus (130 nm) con el antígeno modelo de lisozima de huevo de gallina (HEL) biotinilado en presencia o ausencia de CpG biotinilado. Hemos utilizado perlas de poliestireno con estreptavidina, comparables en diámetro al de un patógeno viral típico, con el fin de investigar el mecanismo por el cual CpG en partículas inicia las respuestas de linfocitos B mediada por TLR9. El revestimiento con éxito de las partículas con HEL se demostró por tinción con el anticuerpo monoclonal F10 específico de HEL (Fig. 11A), por citometría de flujo y mediante detección de HEL con anticuerpo policlonal por transferencia Western. La presencia de CpG se evaluó por la competencia de HEL en la superficie de las perlas, de modo que aparece como una reducción de la unión de F10 a HEL. Linfocitos B transgénicos específicos de HEL MD4 marcados con CFSE (Goodnow et al., 1988) se recogieron tres días después de la estimulación in vitro con perlas recubiertas de HEL y CpG. La citometría de flujo se utilizó para controlar la proliferación de linfocitos B y la diferenciación de CP, a través de la dilución de CFSE y la regulación positiva de la expresión de CD138, respectivamente. Además, en el sobrenadante de los cultivos se detectó la secreción de IL-6, asociada con la estimulación de TLR9 (Barr et al., 2007) y la secreción de IgM durante la diferenciación de células plasmáticas.

Después de la estimulación con perlas que contienen HEL y CpG, se observó que los linfocitos B MD4 sufrían una amplia proliferación y diferenciación en células plasmáticas, como se demostró por su dilución de CFSE y la regulación positiva de CD1138 (Fig.7A, panel izquierdo). Esto se correlacionaba con la secreción de IL-6 e IgMa por los linfocitos B como se detectó en el sobrenadante (Fig.7A, paneles medio y derecho). Es importante destacar que, en la estimulación con perlas que contienen HEL solo o CpG solo, no se observó la proliferación o diferenciación de células plasmáticas (Fig. 7A).

Por tanto, es evidente que la absorción de CpG en partículas depende de la internalización mediada por antígeno por el BCR con el fin de estar disponible para su receptor. Además, la co-participación de TLR9 en los linfocitos B se traduce en la proliferación y diferenciación en CP.

La avides del antígeno influye en la respuesta de los linfocitos B al antígeno-CpG en partículas in vitro

En el Ejemplo 1, la respuesta de los linfocitos B a la estimulación del BCR por el antígeno en partículas se demostró que era dependiente de la avides global el antígeno, así que se examinó la influencia de la avides del antígeno sobre la proliferación de linfocitos B y la diferenciación después de la estimulación con perlas que contienen HEL y CpG in vitro. Hemos utilizado tres mutantes HEL que cubren una gama de afinidades del BCR, como se ha descrito anteriormente (Batista y Neuberger, 1998): HELRD mutante de alta afinidad ($K_a 8 \times 10^8 M^{-1}$); HEL^{KD} mutante de afinidad intermedia ($K_a 4 \times 10^6 M^{-1}$) y HEL^{RKD} mutante de baja afinidad ($K_a 8 \times 10^5 M^{-1}$). Para asegurarse de que las cantidades de antígeno inmovilizado en las perlas eran comparables, se utilizó F10 biotinilado como un enlazador para diversos antígenos HEL a perlas de estreptavidina. Además, también generamos perlas con diferentes densidades mediante la inclusión de varias concentraciones de CGG biotinilado durante la fase inicial de

revestimiento para competir con F10 biotinilado por la unión a las perlas de estreptavidina (Fig.11B).

Hemos observado que los linfocitos B MD4 estimulados con perlas que contienen HEL y CpG de afinidad alta o intermedia sometidos a una proliferación y diferenciación sustancia (Fig. 8A). Sin embargo después de la estimulación con perlas que contienen HEL y CpG de baja afinidad, los linfocitos B CD4 no secretaron ni IL-6 ni IgMa. Por tanto, parece que se requiere un umbral de afinidad del antígeno para desencadenar la internalización mediada por BCR y estimular la proliferación de linfocitos B dependiente de TLR9 y la diferenciación en CP. Habiendo observado este umbral de afinidad del antígeno se examinó la dependencia de la respuesta de los linfocitos B sobre la densidad del antígeno recubierto sobre las perlas. En el caso del antígeno de alta e intermedia de afinidad, se observó que la proliferación y la diferenciación de linfocitos B (Fig. 7C y datos no mostrados) y la producción de IgMa e IL-6 (Fig. 7C) eran dependientes de la densidad del antígeno. Con la afinidad del antígeno más baja, no existe proliferación y diferenciación de linfocitos B (Fig. 7C y datos no mostrados) ni tampoco se podía detectar IgMa ni IL-6 incluso a la mayor densidad de perlas recubiertas de antígeno.

Así, hemos demostrado la importancia de la avidéz del antígeno, tanto en términos de afinidad como densidad, para determinar el grado de la proliferación de linfocitos B mediada por TLR9 y la diferenciación in vitro. Sugerimos, por tanto, que la fuerza global de la interacción entre el BCR y el antígeno debe ser superior a un umbral definido para que tenga lugar de forma eficiente la absorción de las perlas y la consiguiente unión a TLR9.

El antígeno-CpG en partículas estimula la proliferación y la diferenciación in vivo de linfocitos B

Como se ha observado, la proliferación de linfocitos B mediada por TLR9 y la diferenciación en células plasmáticas por estimulación con antígeno- CpG en partículas in vitro, queríamos determinar si tras la administración de antígeno- CpG en partículas inducía un comportamiento de los linfocitos B similar. Para abordar esto, se co-administraron linfocitos B MD4 marcados con CFSE y microesferas que contienen HEL y CpG a ratones receptores de tipo natural. Cuatro días después de la transferencia adoptiva, se analizaron los linfocitos B esplénicos como antes para determinar la dilución del CFSE. Las células plasmáticas se revelaron por regulación positiva de CD138 y por elevada unión de HEL intracelular como se ha descrito previamente. Además, en el suero se determinaron niveles de IgMa específicos de HEL.

Se observó que la co-inyección de linfocitos B MD4 y perlas que contienen tanto HEL como CpG, condujo a una extensa proliferación de linfocitos B específicos de HEL (Fig. 8A). Además, aproximadamente el 65 % de estas células formaban CP como se determinó por citometría de flujo. Su presencia se confirmó por la secreción IgMa medida en el suero (Fig. 2A panel derecho). Por el contrario, la co-inyección de linfocitos MD4 B y perlas que contienen HEL solo no era suficiente para estimular la proliferación de linfocitos B o la diferenciación en CP en la ausencia de ayuda de linfocitos T específicos (Fig. 8A). Además, la estimulación con CpG en partículas solo no era capaz de desencadenar la proliferación ni la diferenciación de linfocitos B. Por lo tanto, se ha demostrado que se requiere la internalización mediada por BCR de CpG en partículas para promover la diferenciación de CP in vivo.

La avidéz del antígeno influye en la respuesta de los linfocitos B a antígeno-CpG en partículas in vivo

Se observó una relación entre la avidéz global del antígeno y la respuesta de linfocitos B tras la estimulación con el antígeno en partículas y CpG in vitro, por lo tanto, hemos utilizado las diversas perlas con HEL y CpG generadas anteriormente para estimular los linfocitos MD4 B marcados con CFSE in vivo.

Se ha observado la extensa proliferación de linfocitos B después de la estimulación con perlas que contienen CpG conjugado con el mutante HEL de alta afinidad o con el de afinidad intermedia (Fig. 9A panel superior). Esto tuvo como resultado niveles similares de diferenciación en CP, como se demostró por la regulación positiva de CD138, la tinción de HEL, intracelular y la producción de IgMa (Fig. 9A y 9B). Por el contrario, las perlas que contienen el mutante HEL de baja afinidad y CpG dieron lugar a una estimulación mucho menos prominente de la proliferación de linfocitos B y a una reducción de tres veces en las CP específicas de HEL CD138⁺ (Fig. 9A). Como era de esperar, la co-inyección de los linfocitos B con las perlas que contiene el antígeno solo o CpG solo no dio lugar a ninguna proliferación de linfocitos B observable, independientemente de la afinidad del antígeno (datos no mostrados). La reducción de la densidad del antígeno del mutante HEL de alta afinidad de alta a intermedia en presencia de CpG no cambió drásticamente la magnitud de la proliferación y diferenciación en CP (Fig. 9C panel superior). Sin embargo, una reducción adicional de la densidad se traduce en una reducción en el porcentaje de CP formadas (Fig. 9B y D, paneles superiores). El impacto de la densidad del antígeno es más patente cuando se utilizan los antígenos HEL de afinidad más baja, lo que indica que existe un cierto umbral, por encima del cual las perlas que contiene el antígeno y CpG se pueden absorber, y por lo tanto, se estimula la proliferación y diferenciación. Parece que este umbral de avidéz del antígeno observado in vivo es más bajo que el observado in vitro, por lo que es de suponer que esto es una consecuencia del entorno más favorable para la proliferación y la diferenciación in vivo de linfocitos B.

En conjunto, se observó que la interacción avidéz del antígeno-BCR determina la magnitud de la proliferación de linfocitos B mediada por TLR9 y el antígeno-CpG en partículas y la respuesta de diferenciación en células plasmáticas in vivo.

La inmunización con el antígeno en partículas conjugado con CpG mejora las respuestas de anticuerpos específicos

Dado el impacto de CpG en partículas con el antígeno conjugado sobre el destino de los linfocitos B, tratamos de investigar su capacidad para inducir una respuesta inmunitaria sistémica in vivo. Para evaluar esto, hemos utilizado una estrategia de inmunización intraperitoneal de dosis única, empleando gammaglobulina de pollo (CGG) como antígeno. Previamente se había demostrado que CGG induce fuertes respuestas dependientes de linfocitos T en ratones. Ratones C57BL/6 fueron estimulados con CGG en partículas conjugado con CpG y después de 7 y 14 días se analizaron las respuestas de anticuerpos específicos mediante ELISA.

Se detectó la producción de anticuerpos anti-CGG específica, que comprende la IgG cambiada de clase tan pronto como 7 días después de la inmunización de ratones C57BL/6 con CGG en partículas conjugado con CpG (datos no mostrados). No se detectaron anticuerpos específicos en este punto temporal en ratones inmunizados con CGG en partículas o CpG solo. Al día 14, se pudo detectar IgG por inmunización con CGG solo, sin embargo los títulos eran diez veces mayores si tanto CGG como CpG estaban presentes en las microesferas. Curiosamente, se pudo detectar IgG del subtipo IgG1 tras la inmunización con el antígeno solo o el antígeno y CpG, aunque el cambio de clase para las subclases IgG2b e IgG2c sólo se produjo si las partículas se recubrieron con CGG y con CpG (Fig 10A).

Hasta ahora hemos demostrado que se requiere el reconocimiento específico del BCR para la estimulación intracelular del TLR eficaz en los linfocitos B. Sin embargo, estábamos interesados en evaluar el impacto de la co-absorción del antígeno y CpG sobre la producción de anticuerpos específicos durante el desarrollo de una respuesta inmunitaria sistémica. Para abordar esto inmunizamos ratones C57BL/6 con dos combinaciones diferentes de partículas: Un primer grupo de ratones se inmunizó con CGG en partículas conjugado con CpG junto con ovoalbúmina (OVA) en partículas, mientras que un segundo grupo recibió OVA en partículas conjugado con CpG junto CGG en partículas (Fig. 10B). Se generaron niveles elevados de anticuerpos específicos en cada grupo en respuesta al antígeno conjugado con CpG, lo que demuestra que la co-absorción de antígeno y CpG intensifica la activación de linfocitos B y la producción de anticuerpos específicos.

Ejemplo 3

La inmunización con fosfo-péptido en partículas conjugado con α GalCer intensifica la respuesta de anticuerpos específicos

[0291]Los inventores trataron de investigar la capacidad de los conjugados de fosfo-péptido- α GalCer en partículas para inducir una respuesta inmunitaria sistémica in vivo. Para evaluar esto, los inventores han utilizado una estrategia de inmunización intraperitoneal de dosis única, empleando fosfo-péptido como antígeno. Ratones C57BL/6 (3 grupos) fueron estimulados con fosfo-péptido en partículas conjugado con α GalCer (10 μ l/ratón) o fosfo-péptido en partículas solo y las respuestas de los anticuerpos específicos fueron analizados mediante ELISA en los días 0 y 7 después de la inmunización.

Material y métodos

Antígenos, preparación lipídica y revestimiento de microesferas

Para la preparación de liposomas que contienen 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfolina (DOPC) y N-Cap biotinilfosfatidiletanolamina (PE-biotina) (ambos de Avanti Polar Lipids), DOPC/PE-biotina (98/2, m/m) o DOPC/PE-biotina/ α GalCer (88/2/10, m/m/m), los lípidos se secaron en atmósfera de argón y se resuspendieron en Tris 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7,0 mezclando vigorosamente. α GalCer fue adquirido en Alexis Biochemical. Para el revestimiento, las microesferas de sílice (100 nm; Kisker GbR) fueron incubadas con liposomas, seguido de estreptavidina y proteínas biotiniladas.

El fosfo-péptido tenía la secuencia: Biotina-GDTTST(fosfo)FCGTPNY-amida

Inmunizaciones y ELISA

Los ratones C57BL/6 WT fueron adquiridos en Charles River. Los ratones se inmunizaron por vía intraperitoneal con 10 μ l de perlas que contienen fosfo-péptido y/o α GalCer y los niveles de IgG específica del antígeno de los sueros se determinaron por ELISA.

Los anticuerpos de los sueros se midieron mediante ELISA utilizando placas recubiertas de BSA-péptido. Se añadieron diferentes diluciones de sueros de los ratones a las placas, se lavaron y mediante el uso de anti-IgM o anti-IgG de ratón obtenidos en cabra marcados con biotina para la detección, se detectaron en los sueros de los ratones los anticuerpos IgM e IgG específicos del péptido (BD Pharmingen).

Resultados

Los inventores detectaron la producción de anticuerpos anti-péptido específicos, que comprende altos títulos de IgM e IgG, tan pronto como 7 días después de la inmunización de ratones C57BL/6 con fosfo-péptido en partículas conjugado con α GalCer (Fig. 14). No se detectaron anticuerpos específicos en este punto temporal en ratones inmunizados con fosfo-péptido en partículas solo.

Ejemplo 4

10 Materiales y métodos

HEL y OVA (Sigma-Aldrich); CyG (Jackson Immuno Research); CFSE (Invitrogen); CpG 1668 5' biotinilado (Sigma-Genosys) e IL-6 recombinante (BD Biosciences). HELRD, HEL^K, HEL^{KD} y HELR^{KD} se describieron previamente 35. Microesferas recubiertas con estreptavidina de 0,13 μ m (Bangs Inc) y microesferas FluoSpheres Neutravidin de 0,2 μ m (Invitrogen).

15 Anticuerpos

Anticuerpos monoclonales contra antígenos de ratón: anti-CD138-PE (clon 281-2) y -biotina; Anti-CD45.2-PerCP-Cy5.5 (10G); Anti-IL-6 (MP5-20F3); Anti-IL-6-biotina (MP5-32C11); Anti-CD16/32 (2.4G2); Anti-IgMa-biotina (DS-1); Anti-IgG1-biotina (A85-1); Anti-IgG2b-biotina (R12-3); Anti-IgG3-biotina (R40-82) y anti-CD45R/B220 (RA3-6B2) (todos de BD Biosciences). El anti-HEL F10 monoclonal ya se ha descrito 36. Anti-IgG-HRP de ratón policlonal (Pierce); Anti- β -actina monoclonal (AC-15) y Anti-albúmina de huevo de pollo monoclonal (OVA-14) (ambos de Sigma Aldrich); Anticuerpo Anti-fosfo-MAP quinasa p38 (Thr180/Tyr182) y Anticuerpo anti-MAP quinasa p38 (ambos de Cell Signalling). Anticuerpos policlonales contra antígenos de ratón: Anti-IgM-biotina; Anti-IgG-biotina; Anti-IgG2c-biotina; Anti-IgM; Anti-IgG; Anti-IgG1; Anti-IgG2b; Anti-IgG2c y Anti-IgG3 (todos de Southern Biotech Inc). Anti-lisozima de pollo (United States Biological), Anti-IgG(H+L+) de ratón obtenido en cabra con AlexaFluor-488 y Anti-IgG(H+L+) de rata obtenido en cabra con AlexaFluor-546 (ambos de Invitrogen).

30 Revestimiento de microesferas

Las microesferas recubiertas con estreptavidina se lavaron antes de la adición de CpG biotinilado y/o Ag biotinilado (OVA, HEL o CyG) y se resuspendieron en PBS. Para generar microesferas recubiertas con mutantes de HEL en varias densidades, se usó para el revestimiento inicial anti-HEL F10 biotinilado y/o CpG biotinilado, como se ha descrito previamente 36.

Purificación de linfocitos B, marcaje y cultivo

Los linfocitos B esplénicos fueron enriquecidos por selección negativa hasta > 99 % de pureza usando un kit de purificación de linfocitos B (Miltenyi Biotec) y se marcaron con CFSE 2 μ M. Los linfocitos B se cultivaron en medios RPMI-1640 (Invitrogen) suplementado con FCS 10 % (PAA Labs), β -mercaptoetanol 50 μ M (Sigma-Aldrich), Hepes 25 mM (Invitrogen) y 10 unidades/ml de penicilina/estreptomina (Invitrogen). Tras 72 h de incubación se cosecharon 1×10^6 linfocitos B marcados con CFSE estimulados con 1 μ l de partículas para evaluar la proliferación y la diferenciación.

45 Purificación de CD y cultivo

Se generaron CD derivadas de médula ósea mediante el cultivo de precursores a partir de fémures de ratones en los medios descritos anteriormente suplementados con GMCSF recombinante (R&D Systems). Después de 5 días, las CD se enriquecieron hasta > 99 % de pureza usando microperlas CD11c+ (Miltenyi Biotec).

Transferencia adoptiva e inmunizaciones

Se transfirieron adoptivamente mediante inyección en la vena caudal a ratones C57BL/6 WT, $1-5 \times 10^6$ linfocitos B MD4 marcados con CFSE o HyHe110 junto con 1-10 μ l de partículas que contienen HEL y/o CpG. Los ratones se inmunizaron por vía intraperitoneal con 1-10 μ l de partículas recubiertas con OVA o CyG (como Ag) y/o CpG.

Citometría de flujo

La detección de la proliferación y diferenciación de CP en el bazo se basó en un método previamente descrito 40. Brevemente, se prepararon suspensiones de células individuales de bazo y las muestras se bloquearon con anti-CD16/32 purificado. Se detectaron los linfocitos B específicos de HEL con HEL seguido de anti-HEL F10-AlexaFluor-647. Las CP se identificaron por su unión a anti-CD138-PE.

Para detectar la unión a HEL intracelular, se fijaron linfocitos B en PFA y se permeabilizaron utilizando saponina 0,1 %. La magnitud de la absorción de las partículas celulares estimuladas con 1 μ l/partículas fluorescentes para 10^6

células se evaluó por citometría de flujo después de 3 h.

Ensayos inmunológicos e inmunohistoquímica

5 Se utilizaron ensayos ELISA para cuantificar en los sueros la producción de IgMa e IgG específicas del antígeno e IL-6, de una manera similar a la descrita previamente 36. Las placas de ELISPOT recubiertas con 100 µg/ml de HEL o CyG en PBS, se bloquearon y se incubaron con esplenocitos como se ha descrito 36 antes del desarrollo, con anti-IgG-HRP o anti-IgMa-biotina. La inmunohistoquímica de los cortes esplénicos se realizó como se ha descrito previamente 36.

10

Resultados

La unión directa de CpG al Ag intensifica las respuestas de anticuerpos específicos tras la inmunización in vivo

15

Los inventores pretendían inicialmente investigar el impacto que la conjugación directa de Ag y CpG tiene sobre la respuesta inmunitaria humoral in vivo. Para lograr esto diseñaron un método que implica la conjugación directa de Ag y CpG sobre perlas de poliestireno de estreptavidina, comparables en diámetro al de un patógeno viral típico. La generación con éxito de los conjugados en partículas, después de revestimiento con Ag y/o CpG biotinilado, se confirmó mediante citometría de flujo (**Figura 19A**). Los ratones C57BL/6 fueron inmunizados de forma simultánea con dos antígenos en partículas, γ -globulina de pollo (CyG) y ovoalbúmina (OVA). En cada grupo de ratones inmunizados, uno de los antígenos en partículas se conjugó con CpG. La producción de anticuerpos IgG específicos del Ag se midió mediante ELISA 14 días después de la administración de las partículas. Se observó una intensificación selectiva en los títulos de anticuerpos específicos de Ag después de la inmunización para el CpG conjugado portador del antígeno en partículas (CpG-Ag). Esta respuesta intensificada al Ag-CpG en partículas fue acompañada por la producción de anticuerpos específicos del Ag que han sufrido un cambio de clase, predominantemente de los isotipos IgG2b e IgG2c. Curiosamente, los anticuerpos del isotipo IgG2 son mediadores particularmente eficaces de las respuestas inmunitarias asociadas con la neutralización del virus 41 y su producción se ha asociado con la estimulación de TLR9. Además, los inventores observaron células secretoras de anticuerpos (CSA) específicas del antígeno dentro de la médula ósea hasta tres meses después de la inmunización con una dosis única de CyG-CpG en partículas (**Figura 13**). Por lo tanto, hemos demostrado que la inmunización con partículas directamente asociadas con ambos Ag y CpG aumenta los títulos de anticuerpos específicos del antígeno e induce el cambio de clase principalmente al subtipo IgG2 in vivo.

20

25

30

35

Se requiere la absorción mediada por BCR de los conjugados Ag-CpG para estimular la diferenciación en CP dependiente de TLR in vitro

Para dilucidar el mecanismo subyacente al aumento de los títulos de anticuerpos específicos, los inventores han empleado linfocitos B MD4 transgénicos que expresan BCR específico para la lisozima de huevo de gallina (HEL). Linfocitos B MD4 marcadas con CFSE se estimularon con partículas que contienen HEL (como Ag) y/o CpG in vitro (**Figura 19B**). Tres días después de la estimulación, se utilizó la citometría de flujo para controlar la proliferación de linfocitos B y la diferenciación en CP por dilución de CFSE y regulación positiva de la expresión de CD138, respectivamente. Se observó una proliferación extensa de linfocitos B MD4, además de la diferenciación para formar CP, después de la estimulación con HEL-CpG en partículas. Estas respuestas de los linfocitos B se correlacionaban con la secreción de IL-6 y de IgMa específica de HEL, en consonancia con los estudios anteriores. Se obtuvieron resultados similares con partículas de varios tamaños, siempre que su diámetro no exceda 0,5 µm (datos no mostrados). Curiosamente, no se observó la proliferación ni la diferenciación tras la estimulación con partículas que contienen ya sea HEL o CpG solo.

40

45

50

55

60

Para identificar las características críticas de las partículas que permiten la estimulación de las respuestas de linfocitos B, los inventores utilizaron la citometría de flujo para detectar la absorción celular de las partículas marcadas con fluorescencia. Aunque los linfocitos B fueron capaces de absorber HEL-CpG en partículas, se observó que no podían capturar CpG en partículas solo (**Figura 19C**). De este modo, las partículas que contienen CpG solo no pueden estimular respuestas de linfocitos B no específicas de la misma manera que se ha observado para CpG soluble. La imposibilidad de CpG en partículas de entrar en los linfocitos B no se debe a una exclusión general de estas partículas de las células, ya que la absorción de CpG por las células dendríticas no se ve afectada por la conjugación con partículas (**Figura 19C**). Sin embargo, se observó que el antígeno en las partículas permite la entrada en el linfocito B (**Figura 19C**), lo que sugiere que el BCR está involucrado en el mecanismo utilizado para permitir la entrada de estos conjugados en los linfocitos B.

Un estrecho umbral de avidéz Ag-BCR regula la activación de linfocitos B estimulada por Ag-CpG in vitro

Observaciones previas han sugerido que la fuerza de unión de la interacción Ag-BCR influye en el resultado de la diferenciación de linfocitos B. Dado que se requiere el reconocimiento del antígeno por el BCR para que el Ag-CpG en partículas estimule las respuestas de linfocitos B, los inventores examinaron la influencia de la avidéz del antígeno, tanto en términos de afinidad como de densidad, sobre la proliferación y diferenciación dependiente de

65

TLR9 in vitro. Para abordar esto, los inventores utilizaron varios mutantes HEL recombinantes anteriormente descritos que unen el BCR con afinidad disminuida: tipo natural HEL ($K_a 2 \times 10^{10} M^{-1}$); HELRD ($K_a 7,9 \times 10^8 M^{-1}$); HEL^K ($K_a 8,7 \times 10^6 M^{-1}$); HEL^{KD} ($K_a 4,0 \times 10^6 M^{-1}$) y HELR^{KD} ($K_a 0,8 \times 10^6 M^{-1}$). Las diversas proteínas HEL se inmovilizaron a las partículas a través de anti-HEL F10 monoclonal biotinilado como un puente para garantizar densidades de revestimiento comparables. La disminución de la afinidad de HEL en aproximadamente 5000 veces (K_a de 2×10^{10} a $4,0 \times 10^6 M^{-1}$) tuvo poco efecto sobre la proliferación de linfocitos B y sobre la producción de IL-6 cuando el Ag estaba presente en el CpG en partículas a alta densidad (**Figuras 21A y B**). Sin embargo, una reducción adicional de 5 veces en la afinidad de HEL (hasta $K_a 0,8 \times 10^6 M^{-1}$) redujo drásticamente la capacidad de CpG en partículas para estimular la activación de linfocitos B. Por tanto, es evidente que debe superarse un umbral mínimo de afinidad del antígeno con el fin de desencadenar la internalización del antígeno mediada por BCR, la proliferación de linfocitos B asociada y la secreción de IL-6. La observación de tal umbral en la afinidad del antígeno sugiere que la respuesta inducida por Ag-CpG en partículas es dependiente de la cantidad de partículas absorbidas por los linfocitos B. Para corroborar esta hipótesis hemos utilizado partículas fluorescentes para comparar la capacidad de los linfocitos B para adquirir los diferentes conjugados de HEL. Como se muestra en la **Figura 14**, por encima del umbral de afinidad la cantidad de partículas absorbidas era comparable a lo largo de una amplia gama de afinidades (desde $K_a 2 \times 10^{10}$ hasta $4,0 \times 10^6 M^{-1}$). Por el contrario, por debajo de este umbral se observó una marcada reducción en la cantidad de partículas adquiridas por los linfocitos B. Por lo tanto, es evidente que por encima de un umbral estrecho, la afinidad del antígeno por el BCR influye en la cantidad de Ag-CpG en partículas internalizado.

Dado que la fuerza de unión de la interacción Ag-BCR depende de la afección del Ag vista por el BCR, se postula que podría observarse una mayor discriminación de la capacidad estimuladora mediante la reducción de la densidad de HEL en las partículas. Para generar partículas que contienen densidades reducidas de HEL, incluimos una proteína biotinilada irrelevante durante la fase inicial de revestimiento para competir con F10 biotinilado por la unión a las microesferas de estreptavidina. Como era de esperar, la estimulación con CpG en partículas que contienen densidades reducidas de las diversas proteínas HEL dio lugar a menores cantidades de proliferación de linfocitos B y de secreción de IL-6. Una reducción de 2 veces en la densidad de HEL^{RKD} en las partículas que contienen CpG las incapacitó para estimular la proliferación de linfocitos B y la producción de IL-6. Del mismo modo, una reducción de 4 veces en la densidad de la proteína HELRD de mayor afinidad también dio partículas que contienen CpG que no pueden estimular respuestas de linfocitos B. Es interesante que el umbral de afección de la interacción BCR-Ag para inducir la secreción de IgMa parece inferior al requerido para la estimulación de la proliferación y la producción de IL-6. Por tanto, es probable que el antígeno deba estar presente en una afección suficiente para inducir el grado mínimo de incorporación por el BCR requerido para la internalización del Ag-CpG en partículas. Por lo tanto, incluso un antígeno de baja afinidad presente en una densidad suficientemente alta podría superar el umbral requerido para permitir la internalización mediada por BCR y la estimulación de las respuestas de linfocitos B asociada. Así, los inventores han demostrado la importancia de la afección del antígeno en determinar la magnitud de la proliferación de linfocitos B mediada por TLR9 y la diferenciación in vitro. Sugerimos por lo tanto que la fuerza global de la interacción entre BCR y el antígeno sea superior a un umbral definido para permitir la absorción eficiente de las partículas y la posterior estimulación por TLR9 de CpG en partículas.

La magnitud de la diferenciación de los linfocitos B por Ag-CpG en partículas está determinada por la fuerza de la estimulación de TLR9 in vitro

Como la cantidad total de Ag-CpG en partículas absorbidas por los linfocitos B depende de la afección global de la interacción Ag-BCR, es probable que el componente CpG de las partículas afecte a la magnitud de la activación de linfocitos B inducida. Por tanto, los inventores trataron de investigar el efecto de la variación de la cantidad de CpG conjugado con HEL en partículas sobre las respuestas de los linfocitos B inducidas. Para lograr esto, las partículas se recubrieron con diferentes cantidades de CpG, salvo la misma cantidad total de HEL, para lograr la afección constante del Ag y, por tanto, la entrada mediada por BCR a la célula. Como se muestra en **Figura 15**, una reducción de la cantidad de CpG presente en las partículas se correlacionaba directamente con una disminución en la proliferación de linfocitos B y la secreción de IL-6 e IgMa. Como tal, HEL en partículas que contiene la mayor cantidad de CpG conjugado estimulaba la diferenciación para formar CP en la mayor magnitud. Sin embargo, la diferenciación de linfocitos B era apenas detectable después de la estimulación con partículas que contienen una reducción de 10 veces en la cantidad de CpG conjugado.

Por lo tanto, es evidente que la cantidad de CpG adquirida por los linfocitos B es crítica para la generación de CP EF en respuesta a Ag-CpG en partículas, lo que indica que la magnitud de la señalización a través de TLR9 es importante en la determinación del resultado de la diferenciación de linfocitos B.

HEL-CpG en partículas estimula la diferenciación para formar CP EF in vivo

Los inventores estaban interesados en determinar si sus observaciones in vitro eran representativas de las respuestas de los linfocitos B a Ag-CpG en partículas in vivo. Para evaluar estos linfocitos B MD4 marcados con CFSE y partículas que contienen HEL y/o CpG fueron co-administrados a ratones receptores de tipo natural. La proliferación de linfocitos B esplénicas MD4 se evaluó mediante la dilución de CFSE en los puntos de tiempo indicados después de la transferencia adoptiva. Además la presencia de CP esplénicas MD4 HEL+ intracelular

CD138+ se cuantificó usando citometría de flujo multicolor.

Se observó una gran proliferación de linfocitos B específicos de HEL tras la co-inyección de linfocitos B MD4 y HELRD-CpG en partículas (**Figura 16A, panel izquierdo**). Esta proliferación alcanzó un máximo de tres días después de la estimulación (**Figura 16B**) y fue coincidente con la formación de CP y la aparición de IgMa específica de HEL en el suero (**Figura 16A** paneles central y derecho; **Figura 16C**). Esta población de CP CD138+ parecía ser de vida corta, ya que su número alcanzó su punto máximo alrededor de tres a cuatro días después de la estimulación. En consonancia con esto, se observaron unas cinéticas similares para la población de las CP específicas de HEL formadas en la región EF del bazo (**Figura 16D**). Además, estas respuestas no fueron detectadas tras la estimulación de los linfocitos B MD4 B de tipo natural, ya sea con CpG en partículas o HEL solo (**Figura 16A**). Por lo tanto, y de acuerdo con las observaciones in vitro de los inventores, se requiere la participación secuencial de BCR y TLR9 para estimular respuestas robustas de linfocitos B in vivo. Así han demostrado que HEL-CpG en partículas estimula la proliferación mediada por TLR9 y la diferenciación de linfocitos B en CP EF de vida corta in vivo. Análogamente a los resultados in vitro, se observó que se requería sobrepasar un umbral en la fuerza de la interacción BCR-Ag con el fin de inducir la activación de linfocitos B in vivo. Como tal, una reducción mayor que 2000 veces en la afinidad de HEL (desde $K_a \times 10^{10}$ hasta $8,7 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) no disminuye las respuestas de linfocitos B estimuladas. Sin embargo, una disminución adicional de 2 veces en la afinidad del antígeno conduce a una importante alteración de la proliferación y diferenciación de linfocitos B después de la estimulación por HEL-CpG en partículas. Además las partículas revestidas con una menor densidad de HEL siguen permitiendo la proliferación y diferenciación de linfocitos B, incluso a niveles ligeramente reducidos. Por el contrario, las partículas que contienen una baja densidad de HEL^K no son capaces de producir respuestas de linfocitos B significativas. Así, siempre que esté presente un antígeno de menor afinidad en suficiente densidad, se pueden usar las partículas para estimular la proliferación y la diferenciación de linfocitos B in vivo. Estas observaciones demuestran la necesidad de sobrepasar un umbral de la fuerza de unión de BCR antes de la estimulación mediada por TLR9 de las respuestas de linfocitos B a Ag-CpG en partículas in vivo. Por último, estábamos interesados en establecer el impacto de la variación de la cantidad de estimulación de TLR9 sobre el resultado de la diferenciación de linfocitos B in vivo. Como se muestra en las **Figuras 17D**, la magnitud de proliferación de linfocitos B y la formación de CP específica de HEL era directamente dependiente de la densidad de CpG conjugado con HEL en partículas. Por lo tanto, dado que in vitro, la cantidad de estimulación de TLR9 es importante en la determinación de las respuestas de linfocitos B in vivo, potencialmente podría ser útil como un mecanismo para el ajuste fino de los resultados de la estimulación con Ag-CpG en partículas. En conjunto, es evidente que, tras la internalización mediada por BCR, los conjugados Ag-CpG en partículas estimulan la proliferación y diferenciación de linfocitos B para formar CP EF in vivo, estableciendo, por lo tanto, la importancia fisiológica de nuestras observaciones in vitro.

HEL-CpG en partículas estimula la producción de anticuerpos cambiados de clase específicos del antígeno

Las observaciones de los inventores indicaban que la inmunización de ratones con Ag-CpG en partículas condujo a la producción de anticuerpos cambiados de clase específicos del antígeno. Sin embargo, como los linfocitos B MD4 transgénicos utilizados en nuestras investigaciones no son hasta el momento capaces de sufrir un cambio de clase, hemos empleado un sistema de modelo transgénico alternativo para investigar más a fondo este fenómeno. Este sistema de ratón transgénico produce linfocitos B que expresan BCR HyHEL10 de alta afinidad y capaz de someterse a recombinación con cambio de clase. Los linfocitos B HyHEL10 adoptivamente transferidos en un receptor de tipo natural sufrieron una extensa proliferación y diferenciación para formar CP en respuesta a HEL-CpG en partículas, de una manera similar a la observada para linfocitos B MD4 (datos no mostrados). El análisis del isotipo de los anticuerpos secretados reveló una recombinación con cambio de clase se produjo después de la estimulación con HEL-CpG en partículas, lo que se traduce en la producción de IgG predominantemente del subtipo IgG2 (**Figura 18E**). Es importante destacar que, como se detectó un patrón similar de isotipos de anticuerpos después de la simulación de los linfocitos B HyHEL10 solo en cultivo, el cambio de clase observado in vivo es probable que sea independiente de la ayuda de linfocitos T CD4+ (**Figura 17F**). Estos resultados concuerdan con nuestras observaciones de las inmunizaciones originales realizadas. Por lo tanto, es evidente que, después de la internalización mediada por BCR, Ag-CpG en partículas estimula no sólo la proliferación y diferenciación de linfocitos B para formar CP de vida corta, sino también la recombinación con cambio de clase al isotipo IgG2.

Discusión

El agonista de TLR9 CpG tiene la capacidad de estimular una plétora de respuestas asociadas con la activación tanto de las ramas innata como adaptativa del sistema inmunitario. Aquí los inventores han establecido que la conjugación directa de CpG con el antígeno da lugar a una intensificación de las respuestas de linfocitos B específicas. Este estudio incluyó el desarrollo de una estrategia para generar partículas tanto con Ag como con CpG inmovilizados en la superficie, para permitir su absorción por los linfocitos B a través del BCR. Los inventores observaron que la absorción mediada por receptor se caracteriza por un umbral de avidéz estrechamente regulado y se traduce en la administración de CpG a TLR9 intrínseca a la de los linfocitos B de una manera específica del antígeno. Es importante destacar que CpG en partículas solo queda excluido de la utilización de medios no específicos de entrada en los linfocitos B, dando partículas de Ag-CpG altamente selectivas en su capacidad de estimular respuestas mediadas por TLR9. Además, los inventores han demostrado que tras la absorción mediada por BCR, la participación de TLR9 desencadena un aumento drástico en la proliferación de linfocitos B y la

formación de CP EF de vida corta. Varias investigaciones anteriores sobre el impacto de la estimulación de TLR9 sobre el comportamiento de los linfocitos B han empleado CpG soluble. Tales estudios informan de que la estimulación de TLR9 conduce a una intensificación de la proliferación y diferenciación de linfocitos para formar CP capaces de producir anticuerpos cambiados de isotipo. Aquí se observó que CpG en partículas, a diferencia del CpG soluble, no puede entrar en los linfocitos B a través de pinocitosis de fase fluida no específica. Por el contrario, la conjugación de CpG con partículas no impidió su absorción por fagocitos especializados, tales como células dendríticas. Estos fagocitos conservan la capacidad de adquirir partículas potencialmente a través de los receptores de reconocimiento de patrones asociados con la función celular inmunitaria innata. Por el contrario, los linfocitos B requieren la presencia de un BCR específico del antígeno y competente para la señalización para permitir la absorción eficaz de Ag-CpG en partículas. La necesidad del BCR en la internalización de los complejos inmunitarios que contienen ligandos estimuladores de TLR9 se ha demostrado durante el desarrollo de enfermedades autoinmunitarias.

Los inventores han demostrado que la avidez de la interacción Ag-BCR influye en el resultado de la activación de los linfocitos B después de la estimulación con Ag-CpG en partículas. Las primeras investigaciones de las respuestas de linfocitos B dependientes de linfocitos T introdujeron la noción de que la decisión de que los linfocitos B activados se diferenciase en CP o CG es un proceso estocástico. Sin embargo, dos estudios más recientes han utilizado varias afinidades de antígeno y BCR para investigar el impacto de la avidez global BCR-Ag sobre el resultado de la diferenciación de linfocitos B. Dado que los antígenos que inducen una mayor señalización a través del BCR preferentemente inducen a los linfocitos B a convertirse en CP EF, el grupo de Brink han propuesto un modelo elegante mediante el cual la fuerza de señalización de la interacción BCR-Ag controla el resultado de la diferenciación de los linfocitos B. Aquí, por encima de un umbral definido, los inventores observaron una correlación entre la avidez de la interacción Ag-BCR, la internalización de las partículas y la cantidad de diferenciación para formar CP EF. Así, parece que después de la internalización, la estimulación de TLR puede anular la señalización dependiente de BCR para determinar el resultado de la diferenciación del linfocito B. Además, un mecanismo similar puede ser la base de las observaciones anteriores después de la estimulación con NP como antígeno en presencia de adyuvante. Por tanto, los inventores sugieren que los resultados presentados aquí no son contradictorios, sino más bien complementarios, a los anteriores estudios de avidez Ag-BCR, en que, como se esperaba por el estudio de Brink 5, la diferenciación de los linfocitos B se controla mediante una combinación de factores. El concepto de señalización combinatoria que funciona para influir en el resultado de la activación de linfocitos B se ha sugerido previamente 31. De hecho, los autores demostraron que la supervivencia sostenida y la diferenciación de linfocitos B humanos indiferenciados requería el acoplamiento del BCR con el antígeno, la disponibilidad de ayuda de linfocitos T y la señalización a través del sistema de TLR.

Aquí los inventores han demostrado que, siempre que se alcance el umbral necesario de avidez para la internalización mediada por BCR, la estimulación de TLR9 intracelular por Ag-CpG en partículas influye en el resultado de la diferenciación de los linfocitos B. Además, usando una estrategia de transferencia adoptiva, han demostrado de manera concluyente que la proliferación de linfocitos B y la diferenciación para formar CP de vida corta depende de la estimulación de TLR9 intrínseca in vivo. Como tal, el aumento de la magnitud de la estimulación mediada por TLR9, mediante el aumento de la cantidad de CpG conjugado con el antígeno en partículas, aumenta la generación de CP EF de una manera cuantitativa.

Estas observaciones están de acuerdo con investigaciones anteriores que han identificado un papel crítico para la señalización mediada por TLR intrínseca en la diferenciación de los linfocitos B activados. Por otra parte, se ha demostrado muy recientemente que la señalización mediada por TLR, pero no la ayuda de linfocitos T CD4+, es absolutamente necesaria para la activación y el desarrollo EF de linfocitos B auto-reactivos 48. Curiosamente, y en apoyo de nuestras observaciones, se ha encontrado que la señalización mediada por TLR9 puede disociarse temporalmente de la estimulación inicial de la BCR31. La capacidad de señalización mediada por TLR para anular las señales dependientes de BCR y estimular la producción de CP EF es probable que desempeñe un papel importante durante las primeras etapas de la respuesta inmunitaria a través de la rápida producción de la primera oleada de anticuerpos protectores. Tras la absorción mediada por BCR, los inventores observaron que Ag-CpG en partículas lograban el acceso para estimular TLR9 dentro del linfocito B. Los estudios previos han demostrado que la estimulación de BCR se traduce en la formación de un complejo intracelular formado por la fusión de muchas vesículas de tipo endosomal 49. Este complejo es el sitio donde los receptores internalizados se convierten en localizados y parece similar al compartimento de tipo autofagosoma rico en TLR9 observado después de la estimulación de BCR 20. La importancia funcional de la localización dirigida de la endocitosis del BCR junto con el antígeno asociado se apreció primero a través de la demostración de que las moléculas del MHC-II recién sintetizadas también se localizaban dentro de estos compartimentos endosomales 50. Por consiguiente, la internalización mediada por BCR facilita el procesamiento y la carga eficiente del antígeno sobre la molécula del MHC-II para su posterior presentación a los linfocitos T CD4+ cooperadores específicos necesarios para la activación completa de los linfocitos B. Además, se ha demostrado que la molécula de tipo MHC CD1d adquiere antígenos lipídicos, tales como α GalCer, dentro de los compartimentos endosomales antes de su presentación en la superficie a los linfocitos iNKT. Se requería un mecanismo similar de internalización mediada por BCR para la estimulación específica mediada por iNKT de la proliferación de linfocitos B y la diferenciación en CP EF en respuesta a Ag- α GalCer en partículas 36. Estas observaciones tomadas en conjunto implican compartimentos endosomales o de tipo endosomal como sitios críticos para la coordinación de las comunicaciones intracelulares que en definitiva gobiernan el resultado de procesos celulares, tales como la diferenciación. Se demuestra aquí la estimulación selectiva y controlada de la respuesta inmunitaria humoral específica del antígeno mediante el uso de

conjugados Ag-CpG en partículas. Dado que estas partículas proporcionan un medio para dirigir la capacidad inmunoestimulante de CpG frente a una población específica de células, son de enorme valor como adyuvantes eficaces en el futuro diseño de estrategias de vacunación exitosas. Como tal, se prevé el uso de CpG en esta forma de partículas para proteger contra el desarrollo de enfermedades autoinmunitarias asociadas con la estimulación de TLR9 no específica y la destrucción del folículo linfóide 53 asociada con la administración repetida de CpG soluble. Además, variando su composición precisa, Ag-CpG en partículas podría ser utilizado para ofrecer un control complejo de las respuestas inmunitarias estimuladas durante la inmunización. De hecho, la inclusión de múltiples antígenos dentro de los conjugados de CpG en partículas podría potencialmente permitir una inducción más eficaz de las respuestas inmunitarias protectoras. Los inventores han desarrollado un enfoque para la conjugación directa del antígeno y el inmunoestimulante CpG sobre la superficie de partículas. Estas partículas permiten la entrada selectiva en los linfocitos específicos del antígeno a través de la endocitosis mediada por BCR, lo que permite el acoplamiento de TLR9 intracelular. La estimulación con estas partículas se traduce en el aumento de la proliferación de linfocitos B y la diferenciación para formar CP EF competentes para secretar anticuerpos cambiados de clase específicos del antígeno in vivo. Las investigaciones que emplean estas partículas son útiles no sólo para dilucidar los principios relativos a la implicación de TLR9 durante el desarrollo de las respuestas inmunitarias primarias, sino también en el desarrollo de inmunoestimulantes específicos del antígeno requeridos en las vacunas.

Referencias

1. Rajewsky K (1996) Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 381: 751-758.
2. Reth M, Wienands J (1997) Initiation and processing of signals from the B cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol* 15: 453-479.
3. Kurosaki T (2002) Regulation of B cell fates by BCR signaling components. *Curr Opin Immunol* 14: 341-347.
4. Lanzavecchia (1985) Antigen-specific interaction between T and B cells. *Nature* 314: 537-539.
5. MacLennan I, Toellner K, Cunningham A, Serre K, Sze D, Zúñiga E, Cook M, Vinuesa C (2003) Extrafollicular antibody responses. *Immunol Rev* 194: 8-18.
6. Moller (1987) Role of somatic mutation in the generation of lymphocyte diversity. *Immunological reviews* 96: 1-162.
7. Amigorena S, Drake J, Webster P, Mellman I (1994) Transient accumulation of new class II MHC molecules in a novel endocytic compartment in B lymphocytes. *Nature* 369: 113-120.
8. Brigi M, Brenner M (2004) CD1: antigen presentation and T cell function. *Annu Rev Immunol* 22: 817-890.
9. Calabi F, Milstein C (2000) The molecular biology of CD1. *Semin Immunol* 12: 503-509.
10. Moody D, Porcelli S (2003) Intracellular pathways of CD1 antigen presentation. *Nat Rev Immunol* 3: 11-22.
11. Bendelac A, Savage P, Teyton L (2007) The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol* 25: 297-336.
12. Godfrey D, Kronenberg M (2004) Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *J Clin Invest* 114: 1379-1388.
13. Van Kaer L (2007) NKT cells: T lymphocytes with innate effector functions. *Curr Opin Immunol* 19: 354-364.
14. Kawano T, Cui J, Koezuka Y, Taura I, Kaneko Y, Motoki K, Ueno H, Nakagawa R, Sato H, Kondo E, et al. (1997) CD1d-restricted and TCR-mediated activation of α 14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* 278: 1626-1629.
15. Spada F, Koezuka Y, Porcelli S (1998) CD1d-restricted recognition of synthetic glycolipid antigens by human natural killer T cells. *J Exp Med* 188: 1529-1534.
16. Galli G, Nuti S, Tavarini S, Galli-Stampino L, De Lalla C, Casorati G, Dellabona P, Abrignani S (2003) CD1d-restricted help to B cells by human invariant natural killer T lymphocytes. *J Exp Med* 197: 1051-1057.
17. Bezbradica J, Stanic A, Matsuki N, Bour-Jordan H, Bluestone J, Thomas J, Unutmaz D, Van Kaer L, Joyce S. (2005) Distinct roles of dendritic cells and B cells in Va14Ja18 natural T cell activation in vivo. *J Immunol* 174: 4696-4705.
18. Fleire SJ, Goldman JP, Carrasco YR, Weber M, Bray D, Batista FD (2006) B cell ligand discrimination through a spreading and contraction response. *Science* 312: 738-741.
19. Prigozy T, Naidenko O, Qasba P, Elewaut D, Brossay L, Khurana A, Natori T, Koezuka Y, Kulkarni A, Kronenberg M (2001) Glycolipid antigen processing for presentation by CD1d molecules. *Science* 291: 664-667.
20. Gammon G, Shastri N, Cogswell J, Wilbur S, Sadegh-Nasseri S, Krzych U, Miller A, Sercarz E (1987) The choice of T-cell epitopes utilized on a protein antigen depends on multiple factors distant from, as well as at the determinant site. *Immunol Rev* 98: 53-73.
21. van den Elzen P, Garg S, León L, Brigi M, Leadbetter E, Gumperz J, Dascher C, Cheng T, Sacks F, Illarionov P, et al. (2005) Apolipoprotein-mediated pathways of lipid antigen presentation. *Nature* 437: 906-910.
22. Vidard L, Kovacovics-Bankowski M, Kraeft S, Chen L, Benacerraf B, Rock K (1996) Analysis of MHC class II presentation of particulate antigens of B lymphocytes. *J Immunol* 156: 2809-2818.
23. Batista F, Neuberger M (2000) B cells extract and present immobilized antigen: implications for affinity discrimination. *EMBO J* 19: 513-520.
24. Lin K, Freeman S, Zabetian S, Brugger H, Weber M, Lei V, Dang-Lawson M, Tse K, Santamaria R, Batista F, et al. (2008) The rap GTPases regulate B cell morphology, immune-synapse formation, and signaling by particulate B cell receptor ligands. *Immunity* 28: 75-87.
25. Mattner J, Debord K, Ismail N, Goff R, Cantu C, Zhou D, Saint-Mezard P, Wang V, Gao Y, Yin N, et al. (2005) Exogenous and endogenous glycolipid antigens activate NKT cells during microbial infections. *Nature* 434: 525-529.

26. Kinjo Y, Wu D, Kim G, Xing G, Poles M, Ho D, Tsuji M, Kawahara K, Wong C, Kronenberg M (2005) Recognition of bacterial glycosphingolipids by natural killer T cells. *Nature* 434: 520-525.
27. Galli G, Pittoni P, Tonti E, Malzone C, Uematsu Y, Tortoli M, Maione D, Volpini G, Finco O, Nuti S, et al. (2007) Invariant NKT cells sustain specific B cell responses and memory. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 3984-3989.
- 5 28. Tupin E, Kinjo Y, Kronenberg M (2007) The unique role of natural killer T cells in the response to microorganisms. *Nat Rev Microbiol* 5: 405-417.
29. Hansen D, Siomos M, De Koning-Ward T, Buckingham L, Crabb B, Schofield L (2003) CD1d-restricted NKT cells contribute to malarial splenomegaly and enhance parasite-specific antibody responses. *Eur J Immunol* 33: 2588-2598.
- 10 30. Kinjo Y, Tupin E, Wu D, Fujio M, Garcia-Navarro R, Benhnia M, Zajonc D, Ben-Menachem G, Ainge G, Painter G, et al. (2006) Natural killer T cells recognize diacylglycerol antigens from pathogenic bacteria. *Nat Immunol* 7: 978-986.
31. Brigl M, Bry L, Kent S, Gumperz J, Brenner M (2003) Mechanism of CD1d-restricted natural killer T cell activation during microbial infection. *Nat Immunol* 4: 1230-1237.
- 15 32. Salio M, Speak A, Shepherd D, Polzella P, Illarionov P, Veerapen N, Besra G, Platt F, Cerundolo V (2007) Modulation of human natural killer T cell ligands on TLR-mediated antigen-presenting cell activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 20490-20495.
33. Paget C, Mallevaey T, Speak A, Torres D, Fontaine J, Sheehan K, Capron M, Ryffel B, Faveeuw C, Leite de Moraes M, et al. (2007) Activation of invariant NKT cells by toll-like receptor 9-stimulated dendritic cells requires type I interferon and charged glycosphingolipids. *Immunity* 27: 597-609.
- 20 34. Roark J, Park S, Jayawardena J, Kavita U, Shannon M, Bendelac A (1998) CD1.1 expression by mouse antigen-presenting cells and marginal zone B cells. *J Immunol* 160: 3121-3127.
35. Martin F, Kearney J (2002) Marginal-zone B cells. *Nat Rev Immunol* 2: 323-335.
- 25 36. Yuan W, Qi X, Tsang P, Kang S, Illarionov P, Illaniorov P, Besra G, Gumperz J, Cresswell P (2007) Saposin B is the dominant saposin that facilitates lipid binding to human CD1d molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 5551-5556.
37. Phan T, Amesbury M, Gardam S, Crosbie J, Hasbold J, Hodgkin P, Basten A, Brink R (2003) B cell receptor-independent stimuli trigger immunoglobulin (Ig) class switch recombination and production of IgG autoantibodies by anergic self-reactive B cells. *J Exp Med* 197: 845-860.
- 30 38. Chiron D, Bekeredjian-Ding I, Pellat-Deceunynck C, Bataille R and Jego G (2008) Toll-like receptors: lessons to learn from normal and malignant human B cells. *Blood* epub Jun 30.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para provocar *in vitro* una respuesta inmunitaria específica del antígeno, comprendiendo el método la etapa de poner en contacto *in vitro* un linfocito B con un producto que comprende:
- (i) una perla de polímero o de sílice que tiene un tamaño de desde 1 nm hasta 10 μm ;
 - (ii) un antígeno de unión al receptor de linfocitos B fijado a la superficie de la perla, y
 - (iii) un inmunoestimulante fijado a la superficie de la perla, en donde el inmunoestimulante es α -galactosilceramida ($\alpha\text{Gal-Cer}$) o un oligodesoxinucleótido CpG (ODN);
- 10 en el que el producto es internalizado por un linfocito B para provocar una respuesta inmunitaria mediada por BCR específica del antígeno frente a dicho antígeno de unión al receptor de linfocitos B.
- 15 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la perla está revestida de liposoma.
3. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el antígeno y el inmunoestimulante están fijados a la perla a través de un enlazador.
- 20 4. Un método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el enlazador es un enlazador de avidina-biotina.
5. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el inmunoestimulante comprende al menos dos inmunoestimulantes diferentes.
- 25 6. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el antígeno comprende al menos dos antígenos diferentes.
- 30 7. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el antígeno comprende una proteína, un polipéptido, un péptido, un fosfopéptido, un polisacárido, tal como un glicano, un conjugado de polisacárido, un mimético peptídico o no peptídico de un polisacárido, una molécula pequeña, un lípido, un glicolípido o un hidrato de carbono.

Fig 1

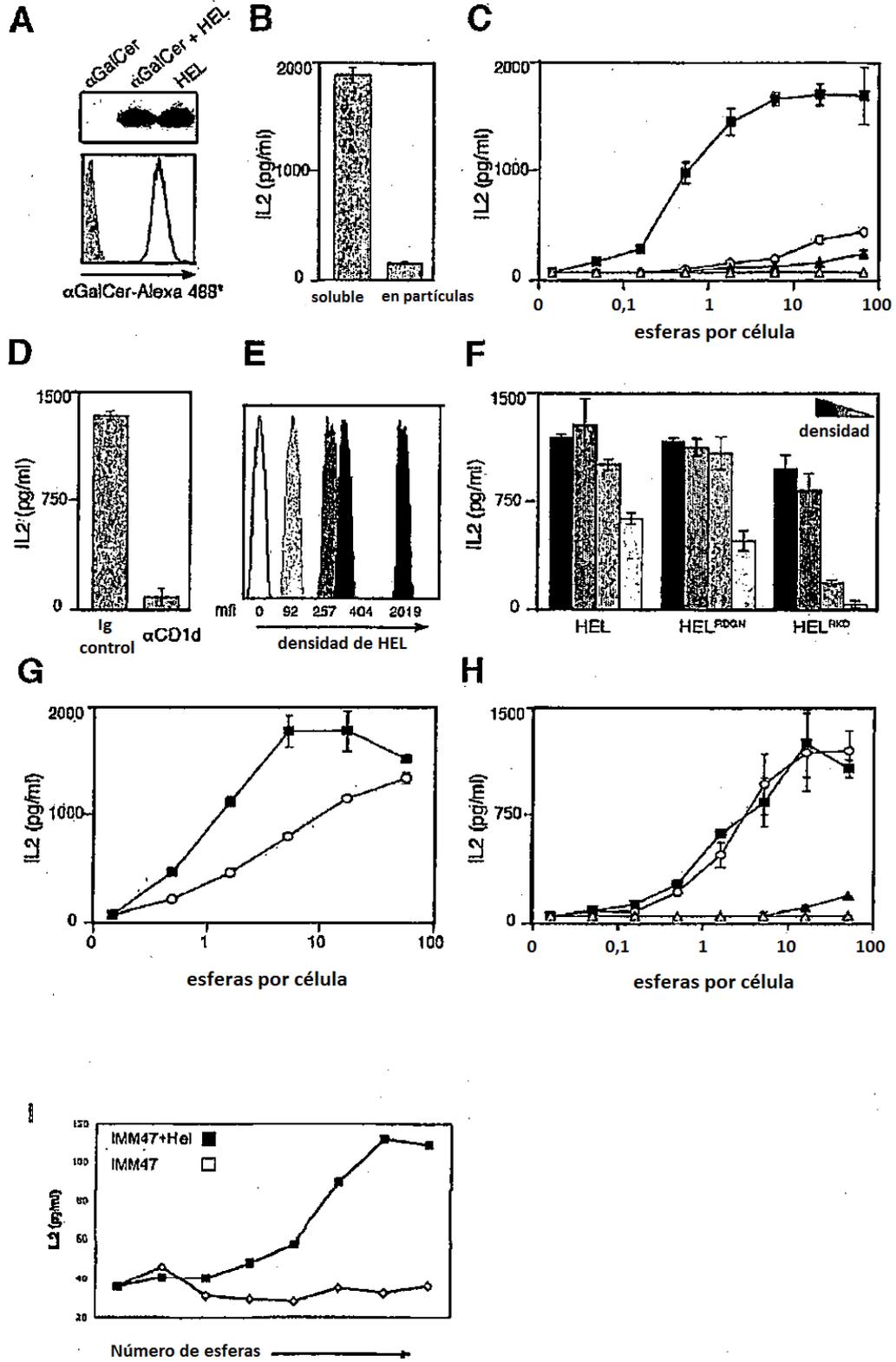


Fig 2

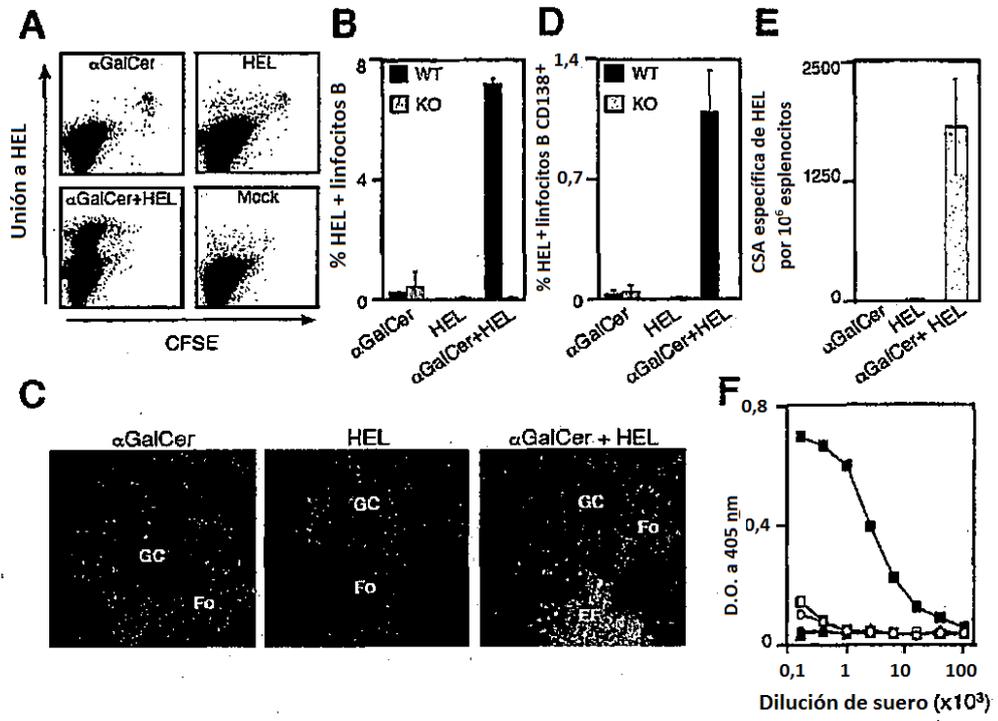


Fig 3

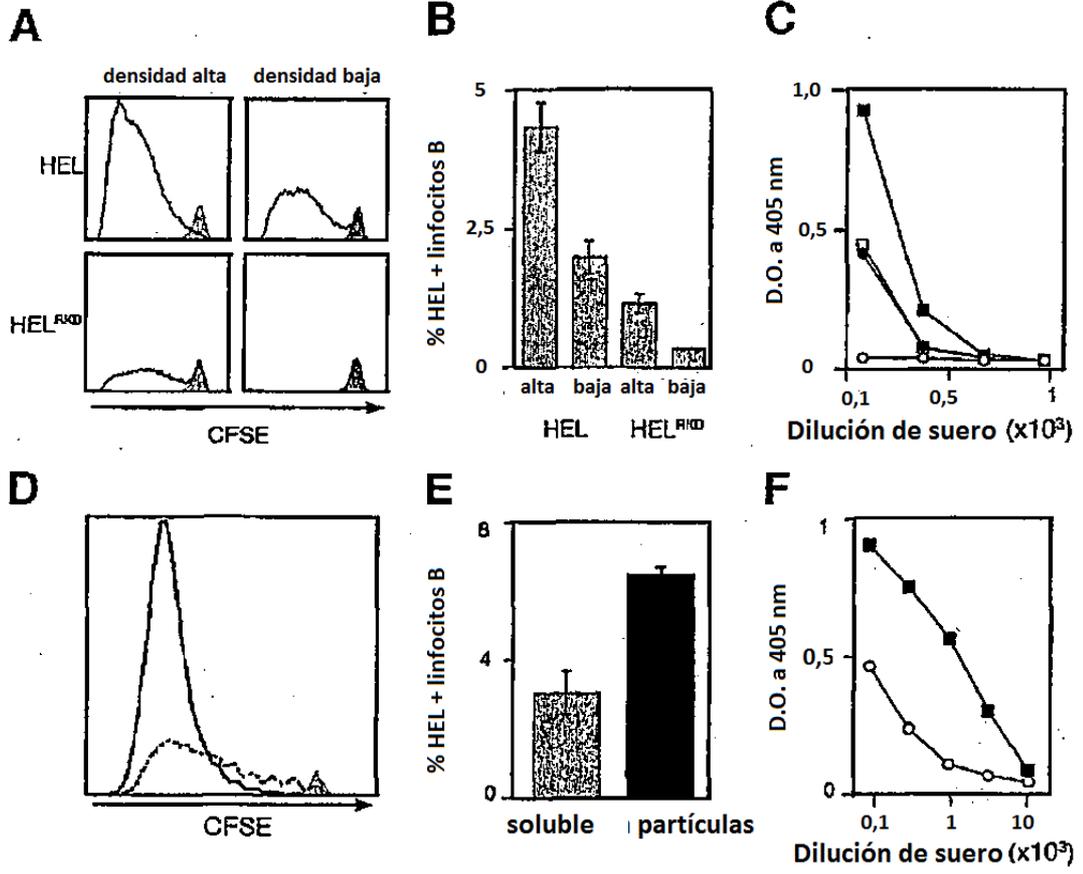


Fig 4

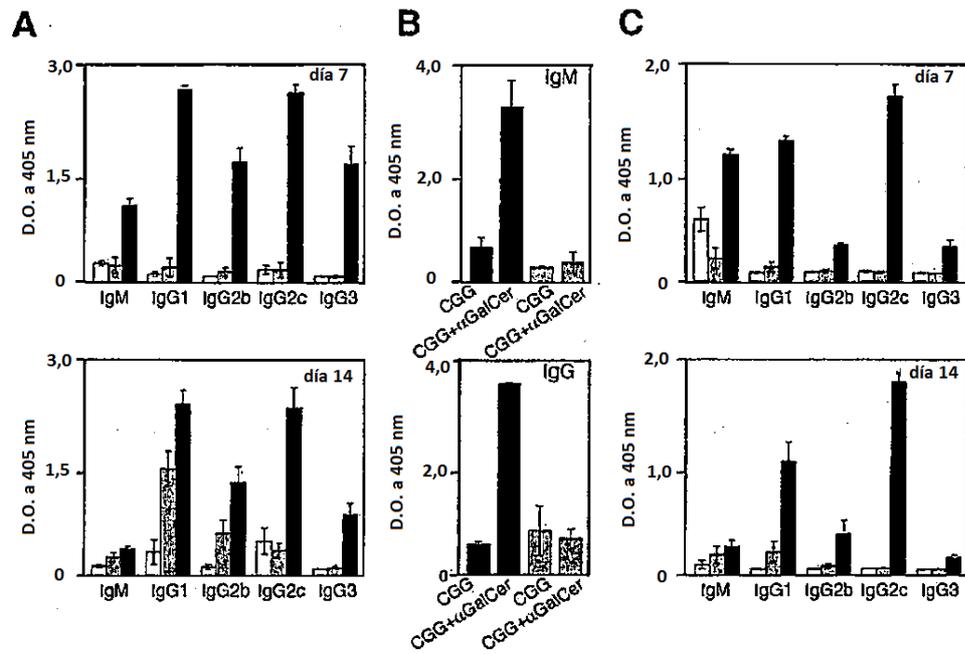


Fig 5

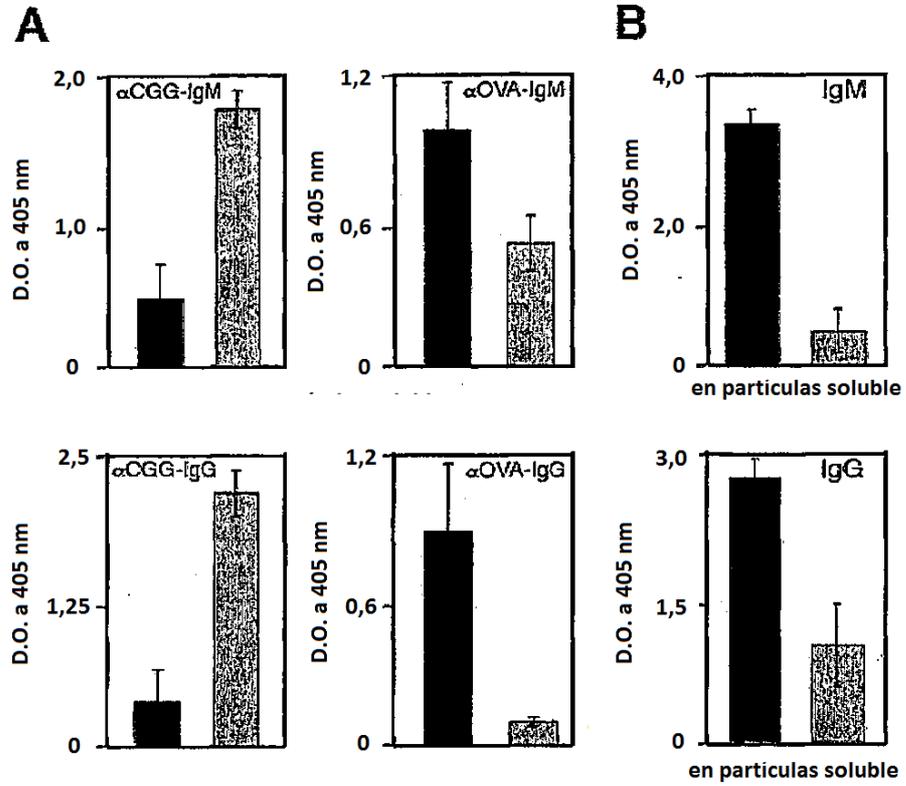


Fig 6

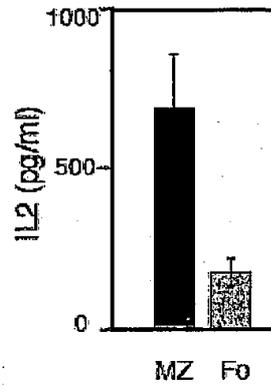
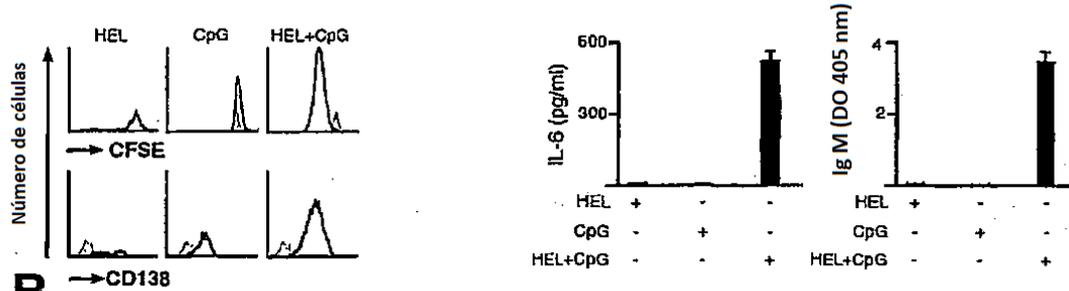
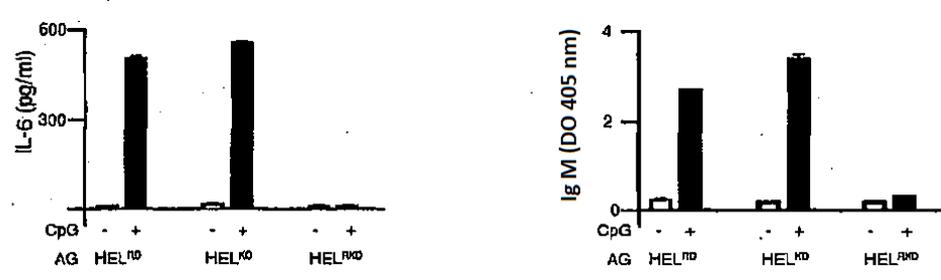


Fig 7

A



B



C

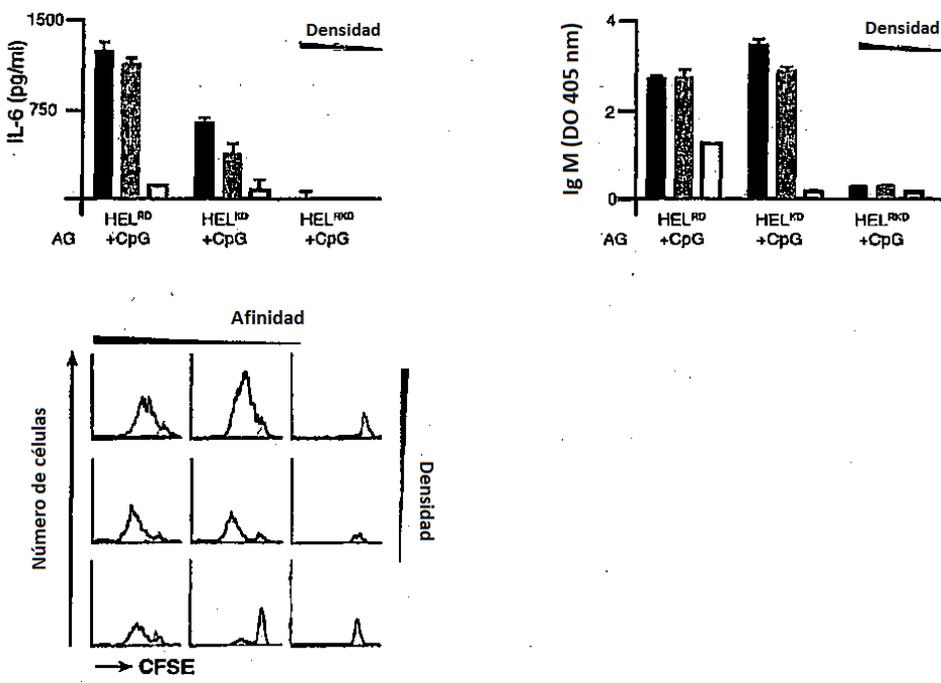


Fig 8

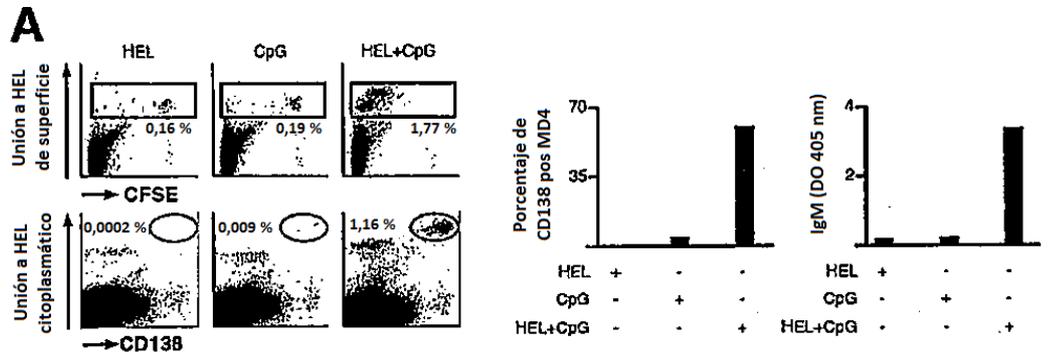


Fig 9

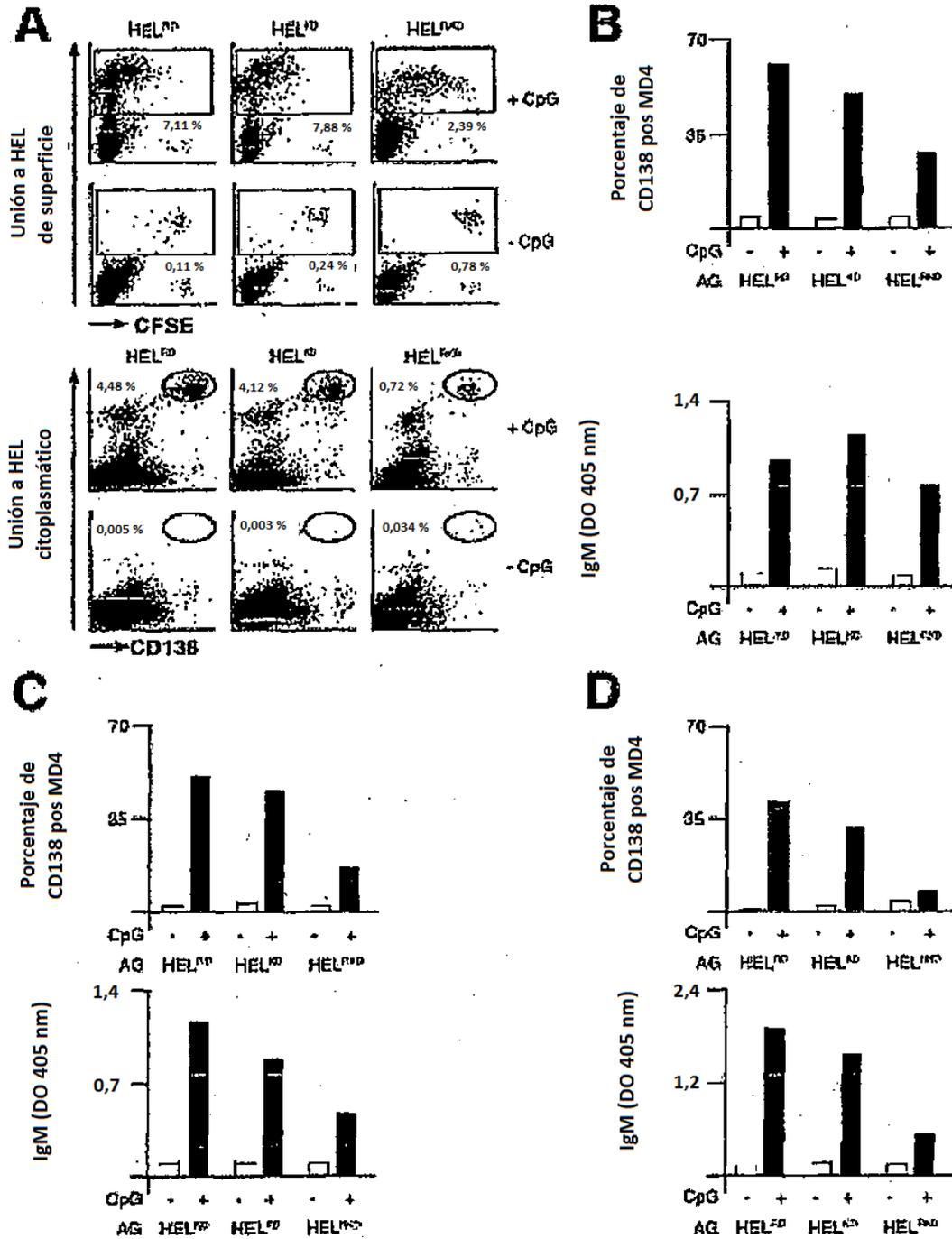


Fig 10

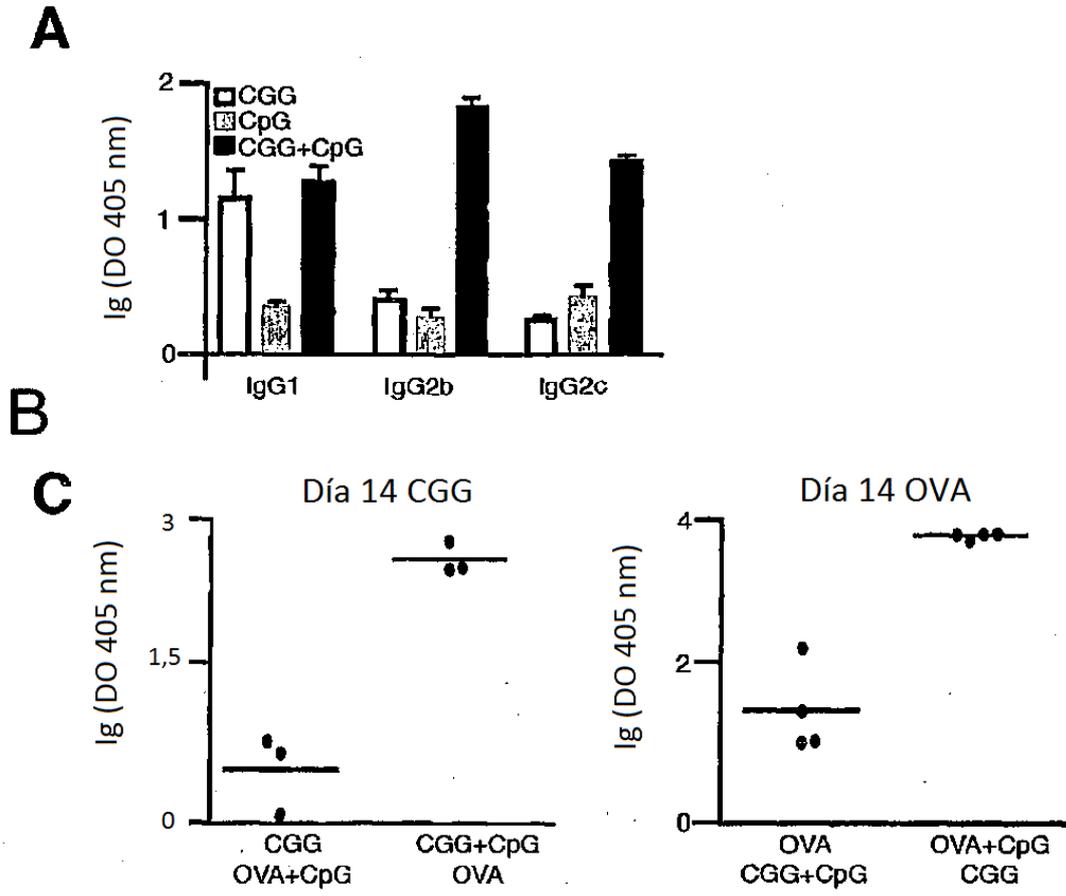
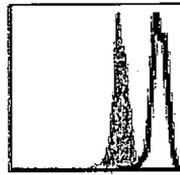


Fig 11

A



B

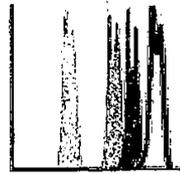


Figura 12

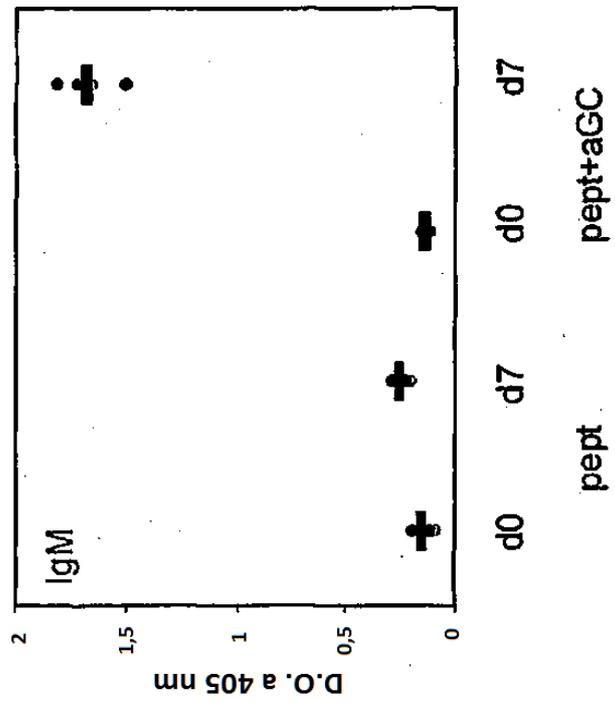
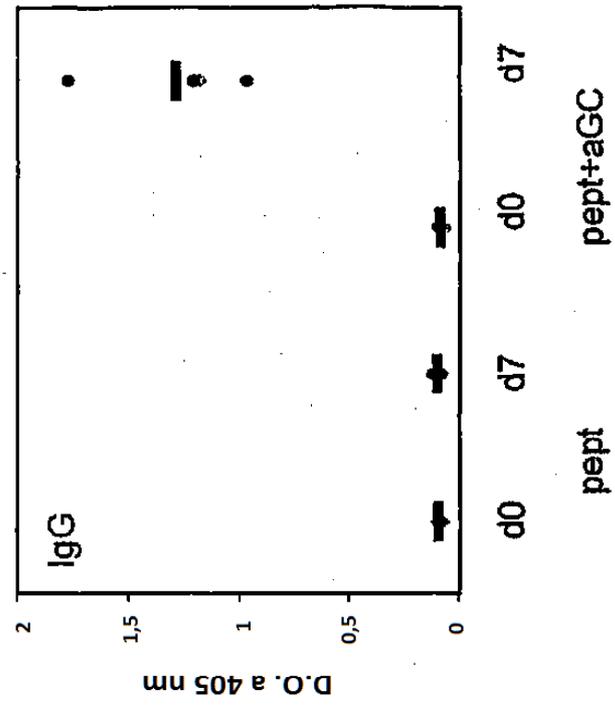


Fig 13

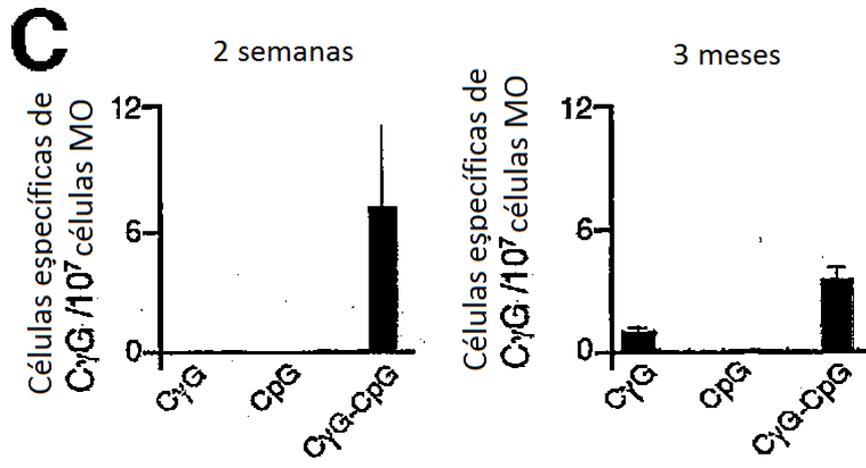


Fig 14

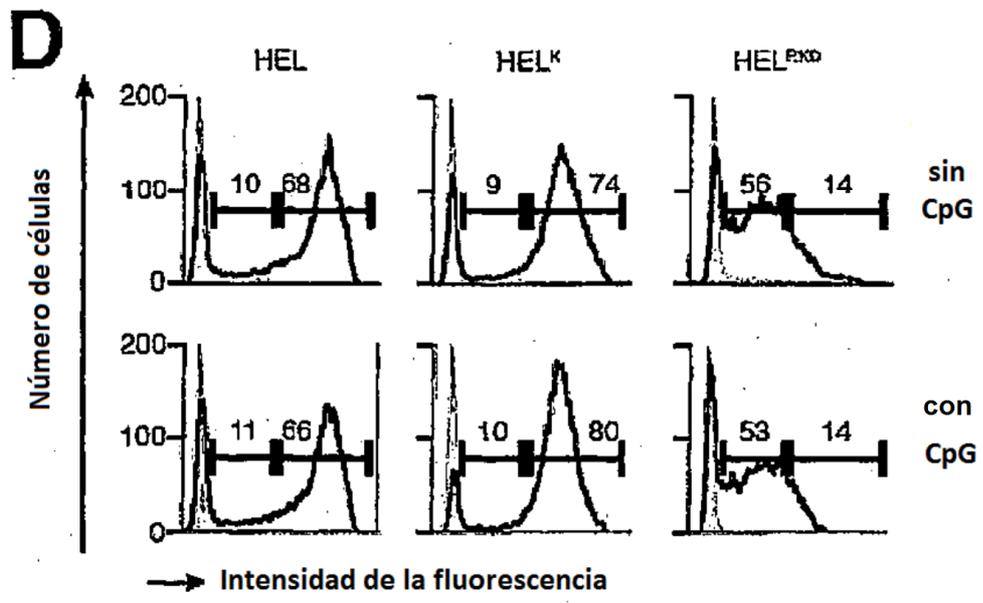
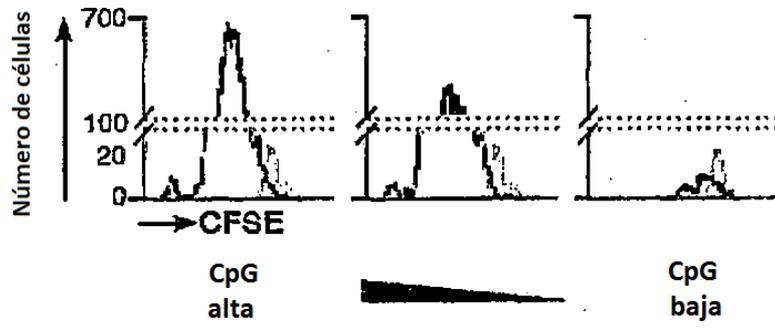


Fig 15

A



B

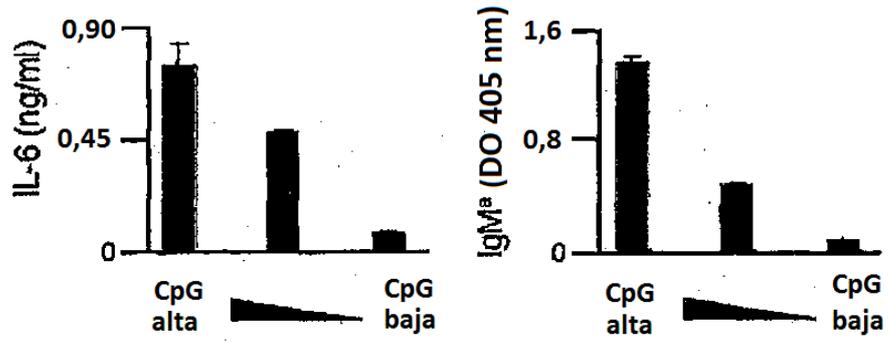


Fig 16

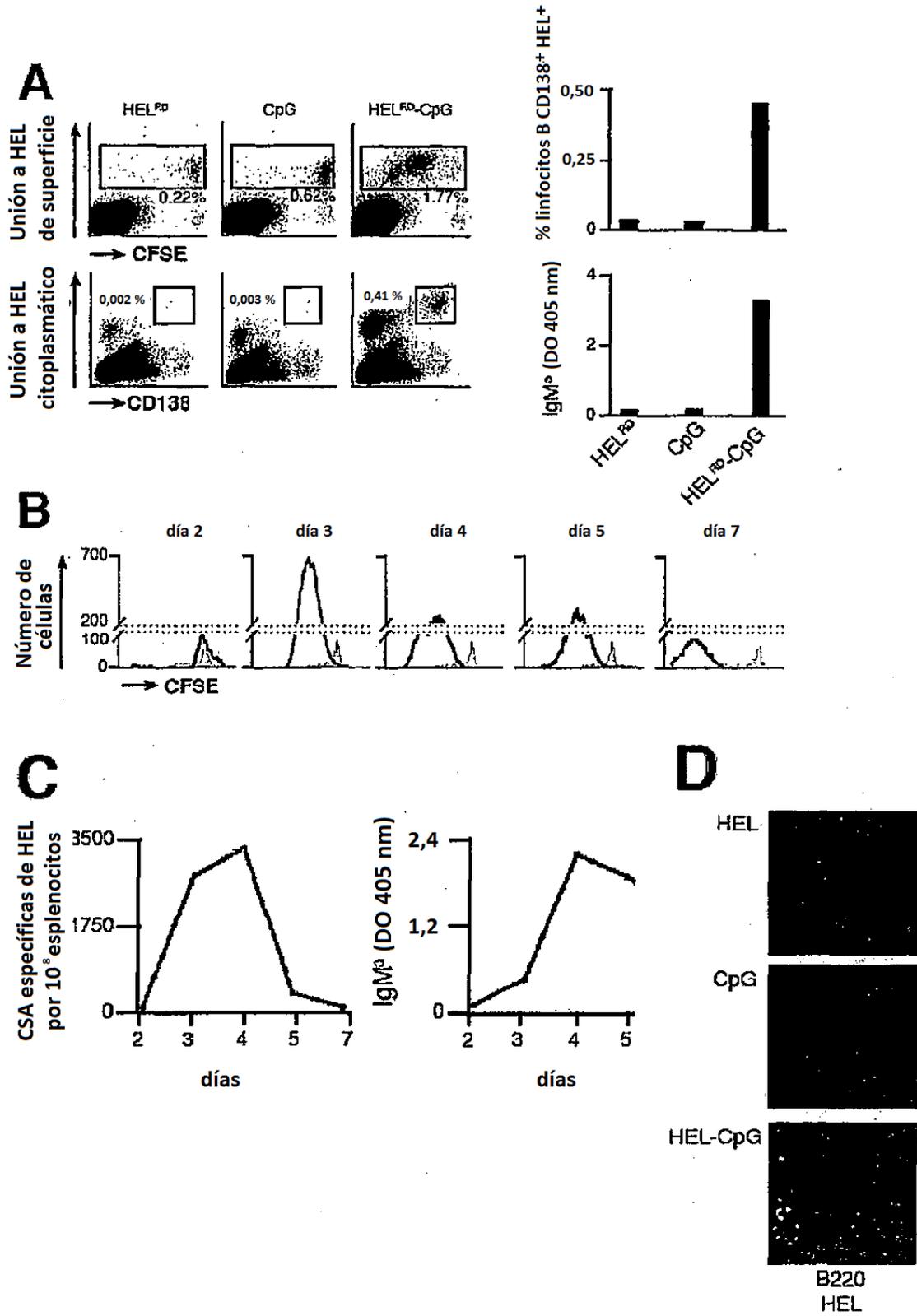


Fig 17

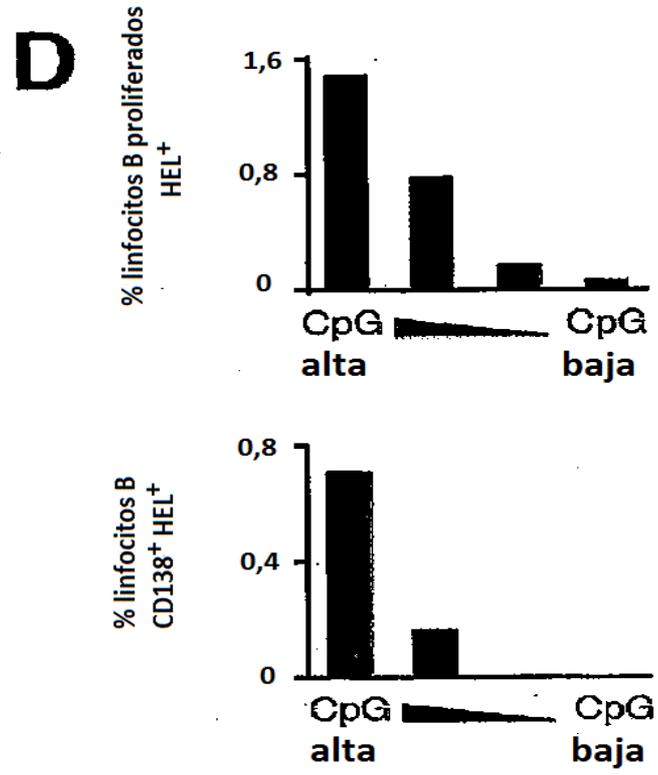
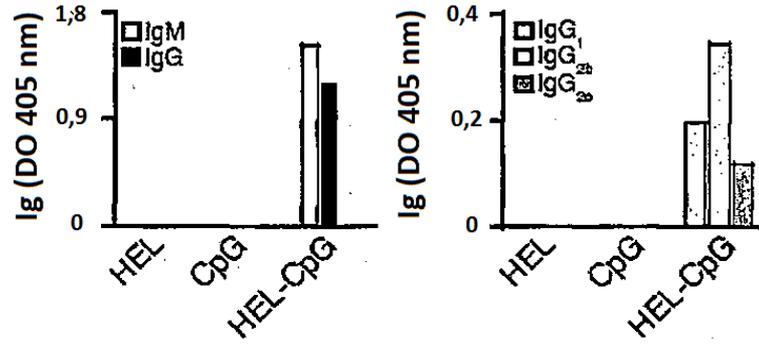


Fig 18

E



F

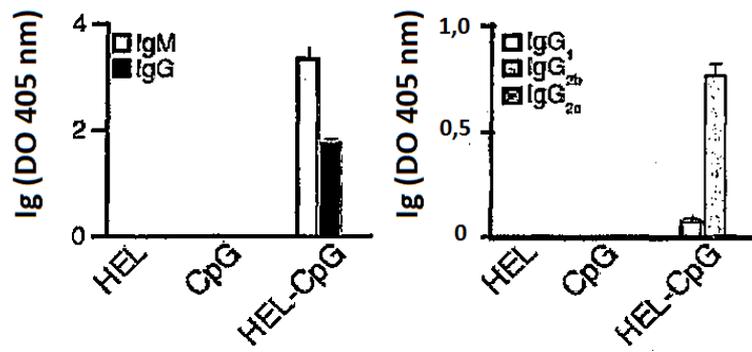


Fig 19

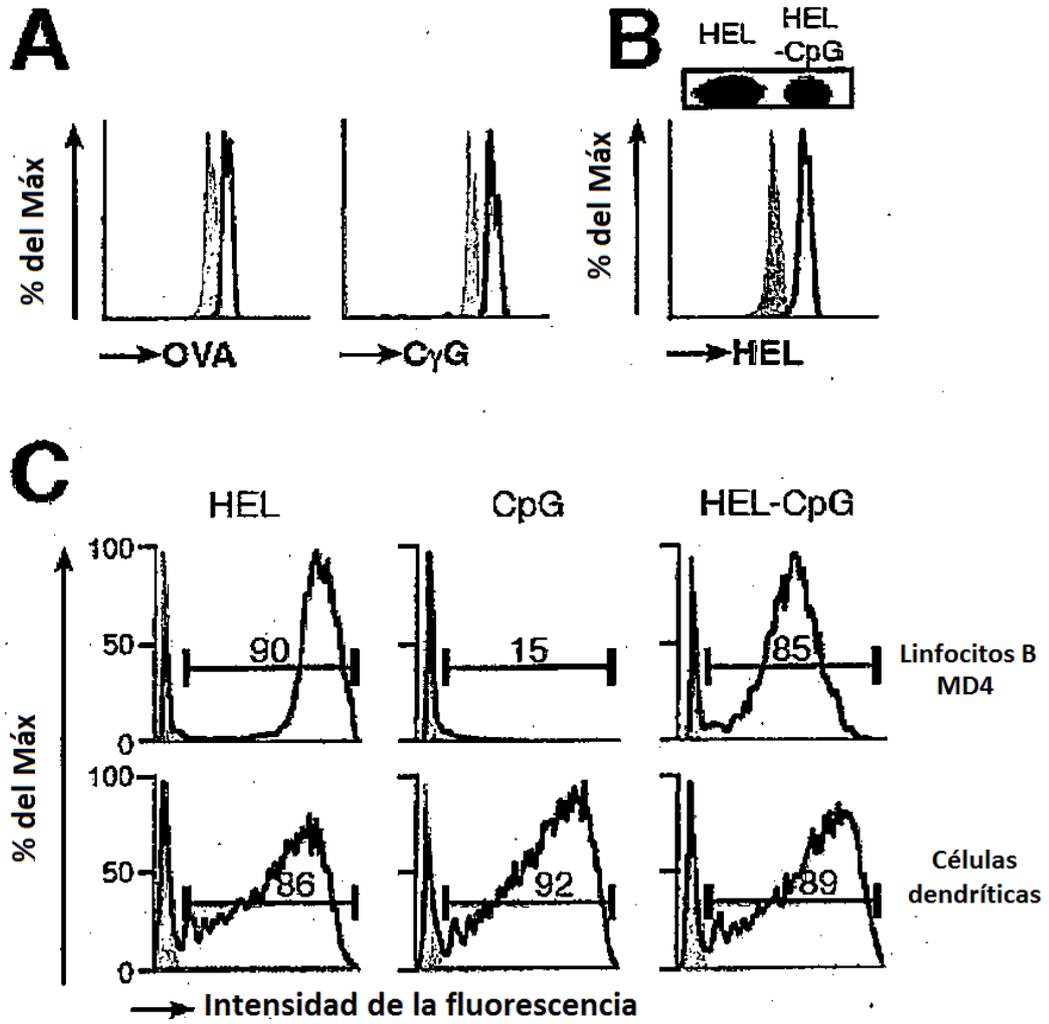


Fig 20

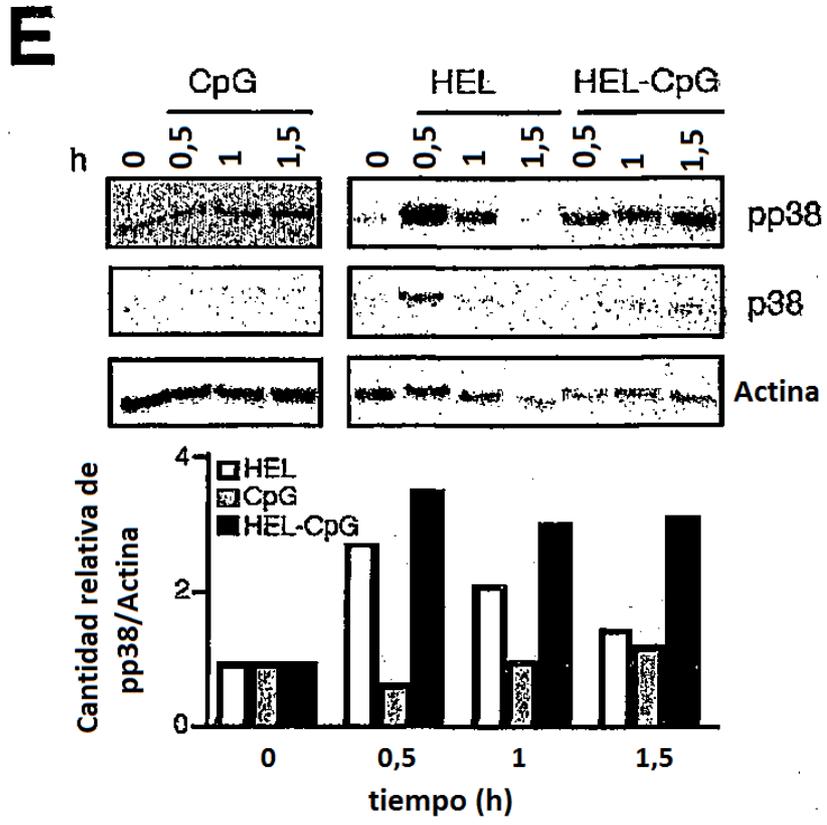


Fig 21

