

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 703 780**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 16/32 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
A61K 39/385 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.05.2012** **PCT/EP2012/059079**
87 Fecha y número de publicación internacional: **22.11.2012** **WO12156430**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.05.2012** **E 12720895 (7)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2018** **EP 2709655**

54 Título: **Preparación de una vacuna que contiene anticuerpos trifuncionales con propiedades potenciadoras de la inmunogenicidad del antígeno**

30 Prioridad:

17.05.2011 EP 11166386
06.03.2012 EP 12158164

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.03.2019

73 Titular/es:

TRION RESEARCH GMBH (100.0%)
Am Klopferspitz 19
82152 Martinsried, DE

72 Inventor/es:

LINDHOFER, HORST

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 703 780 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

Preparación de una vacuna que contiene anticuerpos trifuncionales con propiedades potenciadoras de la inmunogenicidad del antígeno

5

- [0001]** La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene anticuerpos biespecíficos y/o triespecíficos trifuncionales que pueden unirse a uno o varios antígenos objetivo (diana) específicos para su uso en un procedimiento de inmunización de mamíferos contra enfermedades en las que dicho(s) antígeno(s) específico(s) está(n) involucrado(s), y además a una composición farmacéutica que contiene anticuerpos biespecíficos y/o triespecíficos trifuncionales que pueden unirse a (a) antígeno(s) objetivo específico(s) que está(n) implicado(s) en una enfermedad de un mamífero, específicamente un ser humano.

10

Introducción

- [0002]** Los anticuerpos biespecíficos y triespecíficos trifuncionales que se unen (i) al complejo receptor de células T de un célula T, (ii) al antígeno asociado a tumor expuesto en la superficie en una célula tumoral y al receptor Fc-gamma activador I, II o III en una célula accesoria (es decir, una célula asesina natural, un macrófago, un monocito, una célula dendrítica) se han descrito en el documento US 6.551.592 como que tienen la capacidad de inducir inmunidad antitumoral. La inmunidad antitumoral se genera administrando una cantidad efectiva de un anticuerpo biespecífico y/o triespecífico trifuncional intacto que tiene las siguientes propiedades y efectos de: (a) unirse a una célula T y mediar una primera señal de activación; (b) unirse a antígenos asociados a tumores en una célula tumoral; (c) unirse, a través de su porción Fc (en el caso de los anticuerpos biespecíficos trifuncionales) o una tercera especificidad (en el caso de los anticuerpos triespecíficos) al receptor Fc-gamma de las células positivas para el receptor Fc-gamma; (d) la activación de la célula positiva para el receptor Fc mediante la unión a la célula positiva para el receptor Fc-gamma y, de ese modo, iniciar o aumentar la expresión de citoquinas y/o antígenos coestimulantes; (e) transferir al menos una segunda señal de activación requerida para la activación fisiológica de la célula T a la célula T por las citoquinas y/o los antígenos coestimulantes, en la que dicha activación provoca una regulación positiva de los marcadores de activación, eliminando el tumor celular y/o la proliferación de células T. De acuerdo con un ejemplo del documento US 6.551.592, los ratones C57BL/6 se inyectaron primero con 5×10^3 células tumorales B16 singénicas. Dos días después, un grupo de ratones ($n=18$) se trató con un anticuerpo biespecífico trifuncional.

30

- [0003]** Por lo tanto, los anticuerpos trifuncionales se aplicaron por separado de las células tumorales, y no se describe la aplicación de antígenos tumorales junto con anticuerpos trifuncionales. El documento US 7.018.632 B2 también describe la incubación *ex vivo* de células tumorales inactivadas con anticuerpos biespecíficos trifuncionales. Este es de hecho el enfoque convencional que usa células completas para la inducción de una inmunidad antitumoral.

35

- [0004]** Es obvio que este enfoque podría tener la desventaja de que no todas las células tumorales están inactivadas o que cualquier otro componente infeccioso o dañino de la célula tumoral se administra en el cuerpo del paciente. Además, el manejo de células tumorales en condiciones BPF (buenas prácticas de fabricación, en inglés GMP) es mucho más complicado que usar proteínas.

40

- [0005]** Snider y col. (1990) describen que el direccionamiento de un antígeno a las superficies de las células presentadoras de antígenos profesionales (CPA) mediante anticuerpos biespecíficos heteroreticulados aumenta enormemente la eficiencia con la que las CPA endocitas, procesan y presentan un antígeno. Dado que las respuestas de anticuerpos contra la mayoría de los antígenos proteicos requieren ayuda de las células T *in vivo*, Snider y col. (1990) han preguntado si los anticuerpos biespecíficos heteroreticulados también podrían aumentar la capacidad de un antígeno para inducir una respuesta de anticuerpos en ratones. Normalmente, la generación de respuestas inmunitarias después de la inmunización con vacunas y otros antígenos requiere cantidades relativamente grandes de antígeno, inyecciones múltiples y, en animales experimentales, adyuvantes.

50

- [0006]** A diferencia, Snider y col. (1990) mostraron que los anticuerpos biespecíficos heteroreticulados (antilisozima de clara de huevo de gallina X anti-MHC II) inducen altos títulos de anticuerpos en ratones cuando se administran una vez con cantidades de nanogramos de antígeno xenogénico, en ausencia de un adyuvante y preparan a los ratones para una respuesta secundaria de anticuerpos IgG cuando se les vuelve a desafiar con antígeno soluble. Es de particular importancia que Snider y col., no proporcionan ninguna evidencia de una respuesta de células T en sus experimentos. Generar una respuesta de células T por parte de los anticuerpos usados por Snider y col. no solo es altamente improbable, sino que también se excluye, ya que la parte Fc de los anticuerpos convencionales no genera una respuesta de células T por sí sola, sino que requiere la adición externa de citoquinas con el fin de generar una respuesta adecuada de las células T CD8 (por ejemplo, IL-2, [Thibault y col., Int. J. Cancer 67 (2):232, 1996]) que no es necesaria cuando se usan los anticuerpos de la invención). Cabe destacar que el informe de Snider y col. (1990) no describió la inducción de las respuestas de las células T CD8 *in vivo* que claramente requerían anticuerpos intactos

60

para una terapia experimental con tumores. A modo de ejemplo, las respuestas de las células T CD8 y la protección antitumoral se inducen fuertemente mediante la inmunización de la vacuna de células enteras en combinación con un anticuerpo convencional con forma de IgG (con una región Fc funcional) que reconoce simultáneamente un antígeno diana expuesto en la superficie y receptores Fc (Kim y col., 2008). Cabe señalar que ambas entidades de anticuerpos usadas por Kim y col. (2008) y Snider y col. (1990) solo activó la captación de antígeno mediada por el receptor de Fc o MHC de clase II por parte de las células accesorias sin la participación de las células T, respectivamente, lo que llevó a un mejor resultado de la inmunización.

[0007] A diferencia, los anticuerpos biespecíficos y trispecíficos trifuncionales median los efectos de la inmunización al unirse simultáneamente a las células T a través del reconocimiento anti-CD3 y a las células accesorias a través de la participación del receptor Fc-gamma. Por lo tanto, en comparación con Kim y col. (2008) y Snider y col. (1990) solo los anticuerpos biespecíficos y trispecíficos trifuncionales son capaces de activar células T directamente para suscitar un determinado medio de citoquinas y señales de coestimulación que a su vez permiten la inmunización en el contexto de vacunas de células completas y, como se demostró en este caso, incluso contra entidades antigénicas solubles. Cabe señalar que los anticuerpos trifuncionales (por ejemplo, un semianticuerpo IgG2a murino/semianticuerpo IgG2b de rata) o los anticuerpos trispecíficos requieren la interacción entre la región Fc y los receptores Fc-gamma de activación en células presentadoras de antígenos (CPA) para la estimulación de respuestas inmunitarias humorales y mediadas por células contra las asociadas a células, y como se demostró en este caso, incluso antígenos objetivo solubles.

[0008] Ströhlen, Michael A y col., "Induction of anti-tumor immunity by trifunctional Ab in patients with peritoneal carcinomatosis", REVISTA DE INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL Y CLÍNICA, BIOMED CENTRAL LTD; LONDRES RU, vol. 28, n.º 1, 14 de febrero de 2009 (página 18) describe vacunas de refuerzo de un paciente con una composición que comprende entre otros células tumorales autólogas incubadas con ac (anticuerpos) biespecíficos trifuncionales, tales como actr-ntiEPCAM x anti-CD3, o anti-HER2/neu x anti-CD3, dependiendo de la expresión antigénica individual de las células tumorales autólogas (p20, rhc, §3). Los ac biespecíficos trifuncionales (usados en Ströhlein, Michael A y col.) son conocidos por su potencial adyuvante porque inducen las respuestas inmunitarias humorales y celulares en pacientes tratados con los mismos.

[0009] El documento EP0885614 describe la producción de una composición farmacéutica que comprende células tumorales y ac biespecíficos trifuncionales que se unen a antígenos asociados a tumores en las células tumorales para su uso en terapia tumoral (col 2, 17-32; c 3-8, 13; reivindicaciones).

[0010] Comenzando con esta técnica anterior, es un problema de la presente invención proporcionar un procedimiento de vacunación mejorado y una preparación farmacéutica para inmunizar a un mamífero para generar una respuesta inmunitaria humoral y/o celular contra (a) antígeno(s) objetivo involucrado(s) en enfermedades de dichos mamíferos que pueden evitarse o curarse (es decir, vacunación terapéutica) o aliviarse mediante un tratamiento de vacuna.

[0011] Este problema se resuelve mediante la invención como se describe en las reivindicaciones independientes adjuntas. Las realizaciones preferidas de la invención se incluyen en las reivindicaciones dependientes y se describen adicionalmente en la presente descripción, los ejemplos y las figuras y tablas.

Breve descripción de las figuras

[0012] Las figuras adjuntas muestran:

Figura 1A: Partículas similares a virus heterólogas (PSV) que muestran antígenos objetivo para la inmunización

Figura 1B: proteínas de fusión heterólogas, polipéptidos multiantigénicos o antígenos de proteínas unidas covalentemente [es decir, formato de fusión o conjugado: antígeno portador único y antígeno(s) objetivo único o múltiples]

Figura 2: Detección de títulos de anticuerpos anti-EpCAM de ratón en sueros de animales inmunizados de manera diferente. Tres ratones BALB/c por grupo se inmunizaron sc (por vía subcutánea) usando diferentes cantidades de antígenos de la proteína EpCAM humana recombinante (0,1 µg o 0,5 µg) en ausencia o presencia de 0,4 µg o 0,5 µg de anticuerpo anti-EpCAM x anti-CD3 BiLu, respectivamente. se realizó el ELISA anti-EpCAM como se describe en el capítulo de "Procedimientos".

Figura 3: Diseño del estudio del Ejemplo 3.

Figura 4: El resultado del ELISPOT IFN-γ de células inmunes reestimuladas con proteínas de EpCAM. Las barras representan valores medios de determinaciones por cuadruplicado con DE (desviación estándar) (barras de error).

Los asteriscos indican una diferencia estadísticamente significativa de los números de manchas en comparación con el control no tratado previamente (ensayo t de dos colas para muestras no relacionadas, p < 0,05). Además, el símbolo

indica la diferencia estadísticamente significativa entre ambos conjuntos de datos (ensayo t de dos colas para muestras no relacionadas, $p = 0,0023$). Se analizó un conjunto de células de cada tres ratones por grupo de inmunización.

Figura 5A: Producción de IFN-g (intracelular) de células T positivas para CD8 reestimuladas con proteína EpCAM

5 Figura 5B: Producción de IFN-g (intracelular) de células T positivas para CD4 reestimuladas con proteína EpCAM

Figura 6: Resultado de ELISPOT IFN-g de células inmunes reestimuladas con el péptido 225 derivado de EpCAM. Las barras representan valores medios de determinaciones por cuadruplicado con DE (barras de error). El asterisco indica una diferencia estadísticamente significativa de los números de manchas en comparación con el control no tratado previamente y el grupo de inmunización PSV-EpCAM (ensayo t de dos colas para muestras no relacionadas, $p = 0,0362$ y $p = 0,0089$ respectivamente). Se analizó un conjunto de células de cada tres ratones por grupo de inmunización.

Figura 7A: Supervivencia de ratones - grupos de inmunización EpCAM vs. EpCAM + BiLu. El grupo de inmunización EpCAM + BiLu ($n = 5$) muestra una supervivencia prolongada significativa en comparación con los ratones inmunizados solo con proteína EpCAM ($n = 5$) después de un desafío de tumor letal con células tumorales CT26-EpCAM (prueba de log-rank, $p = 0,0257$)

15 Figura 7B: Supervivencia de ratones - grupos de inmunización PSV-EpCAM vs. PSV-EpCAM + BiLu. El grupo de inmunización PSV-EpCAM + BiLu ($n = 5$) muestra una supervivencia prolongada significativa en comparación con los ratones inmunizados solo con PSV-EpCAM ($n = 5$) después de un desafío de tumor letal con células tumorales CT26-EpCAM (prueba de log-rank, $p = 0,0066$)

20 Figura 7C: Supervivencia de ratones - grupos de inmunización PSV-EpCAM vs. PSV + BiLu. El grupo de inmunización PSV-EpCAM ($n = 5$) y el grupo de control PSV + BiLu ($n = 5$) que no recibieron proteína EpCAM no mostraron diferencias significativas en las curvas de supervivencia (prueba de log-rank, $p = 0,8237$). Todos los ratones sucumbieron al tumor, excepto un ratón en el grupo de control E, lo que indica que no hubo o solo hubo un efecto de inmunización inespecífico menor inducido por la PSV y/o el anticuerpo BiLu.

25

Resumen de la invención

[0013] La invención se define en las reivindicaciones adjuntas y cualquier otro aspecto o realizaciones expuestos en este documento son únicamente para información. La invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende

• una cantidad farmacéuticamente efectiva de un anticuerpo biespecífico y/o trispecífico trifuncional que tiene las siguientes propiedades:

35 (a) unión a una célula T a través de CD3 y activación de dicha célula T;
 (b) unión a un antígeno diana aislado que está separado de su contexto natural, por ejemplo, una célula, un virus, una bacteria, un protozoo, o un hongo y que no está asociado o es parte de dicho contexto natural;
 (c) unión a través de su porción Fc o por una tercera especificidad (en el caso de los anticuerpos trispecíficos) a células positivas para receptores Fc- γ de tipo I, II y/o III e inicio de la producción de citoquinas o la regulación positiva de señales coestimulantes o una combinación de los mismos y la activación por lo tanto de las células T;
 40 (d) inicio de las respuestas de las células T sesgadas por TH1 acompañadas de interferón gamma y las respuestas inmunitarias humorales;
 y

45 una cantidad inmunológicamente efectiva de dicho antígeno diana aislado y opcionalmente uno o más antígenos adicionales aislados en una cantidad inmunológicamente efectiva, en la que dichos antígenos están presentes aislados de su contexto natural, por ejemplo, una célula, un virus, una bacteria, un protozoo, o un hongo y que no está asociado o es parte de dicho contexto natural, y un portador farmacéuticamente aceptable,

50 para su uso en un procedimiento de inmunización de un sujeto mamífero que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad farmacéuticamente efectiva de dicha composición farmacéutica para suscitar una respuesta inmunitaria humoral o mediada por células o una combinación de las mismas contra dicho antígeno diana y dichos opcionalmente uno o más antígenos adicionales para inmunizar dicho sujeto mamífero contra dicho uno o más antígenos.

55 **[0014]** En una realización adicional de la invención, se describe una composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente efectiva de un anticuerpo biespecífico y/o trispecífico trifuncional que tiene las siguientes propiedades:

(a) unión a una célula T a través de CD3 y activación de dicha célula T;

60 (b) unión a un antígeno diana aislado que está separado de su contexto natural, por ejemplo, una célula, un virus, una bacteria, un protozoo, o un hongo y que no está asociado o es parte de dicho contexto natural;

(c) unión a través de su porción Fc o por una tercera especificidad (en el caso de los anticuerpos triespecíficos) a células positivas para receptores Fc-γ de tipo I, II y/o III e inicio de la producción de citoquinas o la regulación positiva de señales coestimulantes o una combinación de los mismos y la activación por lo tanto de las células T;

(d) inicio de las respuestas de las células T sesgadas por TH1 acompañadas de interferón gamma y las respuestas inmunitarias humorales;

y

una cantidad inmunológicamente efectiva de dicho antígeno diana aislado y opcionalmente antígenos adicionales aislados que están aislados de su contexto natural, por ejemplo, una célula, un virus, una bacteria, un protozoo, o un hongo y que no está asociado o es parte de dicho contexto natural, y un portador farmacéuticamente aceptable.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

15 **[0015]** La invención se define en las reivindicaciones adjuntas y cualquier otro aspecto o realizaciones expuestos en este documento son únicamente para información. La presente invención describe un procedimiento de inmunización que comprende anticuerpos biespecíficos o triespecíficos trifuncionales similares a adyuvantes y formulaciones de vacunas con el antígeno diana (es decir, proteínas de fusión heterólogas, polipéptidos multiantigénicos, polipéptidos multiepitopos, antígenos de proteínas unidas covalentemente o no covalentemente o partículas similares a virus (PSV) que muestran antígenos objetivo conjugados o asociados) en el que el antígeno diana o cualquier otro antígeno adicional está presente en forma soluble o crioconservada o en forma de partículas. Todas estas realizaciones incluyen solo aquellos antígenos que están en forma aislada, es decir, separados de su contexto natural, por ejemplo, de una célula como una célula tumoral, una célula bacteriana, una célula fúngica o un virus. Los antígenos objetivo y opcionalmente otros antígenos se usan en forma aislada. Las expresiones "antígeno diana aislado" y "antígeno aislado", como se usan en la presente invención, deben entenderse como que comprenden solo aquellos antígenos que no están asociados y no son parte de una célula. Si bien pueden haber estado presentes en una célula, por ejemplo, en una célula tumoral o en un virus antes de su uso en la presente invención, ya no son parte de esa célula o virus cuando se usan en la presente composición farmacéutica. Típicamente, los antígenos se usan en forma soluble; el término "solubilizado" excluye aquellos antígenos que están asociados o unidos a una célula, por ejemplo, una célula tumoral, o un virus de origen natural en la presente composición farmacéutica. Si los antígenos no están en forma soluble, están unidos, por ejemplo, a conjugados o asociados con un portador, es decir, también están en forma aislada pero en forma de partículas. Un portador típico es una partícula similar a un virus (PSV) o un antígeno portador al que el antígeno diana está unido o asociado. En una realización adicional más, el antígeno diana está presente en forma aislada crioconservada y preferentemente en forma soluble aislada o aislada en partículas. 35 Los anticuerpos tampoco están presentes como anticuerpos heteroreticulados.

[0016] En una realización preferida, la preparación farmacéutica de la invención no contiene ningún adyuvante inmunológicamente activo, es decir, un adyuvante inmunológicamente activo está ausente y no se administra al paciente durante la vacunación. Se ha descubierto que los anticuerpos trifuncionales y triespecíficos, tal como se definieron anteriormente y con la composición específica usada preferentemente en la presente invención, activan por sí mismos un efecto adyuvante que hace que sea innecesario añadir más adyuvantes externos. Además, la adición de citoquinas externas no es necesaria y se excluye en la presente invención, ya que los anticuerpos trifuncionales y triespecíficos actualmente usados ya activan la producción de citoquinas en sí. 40

45 **[0017]** La crioconservación es un procedimiento mediante el cual los antígenos objetivo presentes, por ejemplo, en forma de partículas o solubilizados, se congelan en condiciones controladas y se almacenan a bajas temperaturas. La crioconservación se usa con frecuencia para almacenar una muestra que debe mantenerse a lo largo del tiempo con el fin de asegurar un suministro listo de la muestra para su uso y experimentación. Los antígenos objetivo para los objetos de la invención se congelan habitualmente en suspensión en crioviales industriales. Se han desarrollado procedimientos de congelación para minimizar el impacto del choque osmótico y la formación de cristales de hielo intracelular, dos factores que contribuyen al daño durante el procedimiento de congelación y el almacenamiento congelado. 50

[0018] En general, una vacuna es una preparación biológica que mejora la inmunidad hacia una enfermedad infecciosa o maligna en particular. Una vacuna típicamente contiene un agente que se parece a un microorganismo causante de enfermedad o se deriva de una célula cancerosa. El agente estimula el sistema inmunológico del cuerpo para reconocer al agente como extraño, lo destruye y lo recuerda, de modo que el sistema inmunitario puede reconocer y destruir más rápidamente cualquiera de estos microorganismos que luego encuentra. En el caso de las enfermedades cancerosas, es absolutamente necesario que las vacunas pertinentes rompan la tolerancia inmune ya existente, especialmente la tolerancia de las células T contra los antígenos propios para inducir la eficacia antitumoral. Dicho enfoque sería un ejemplo para una vacunación terapéutica. Curiosamente, los anticuerpos biespecíficos o 60

triespecíficos trifuncionales con brazos de unión a anti CD3 tienen la capacidad de romper la tolerancia inmune dado que se inducen respuestas de células B y T secundarias contra los antígenos propios (Ruf y Lindhofer y col., 2002; Ströhlein y col., J. Exp. Clin. Cancer Res. 28:18, 2009).

- 5 **[0019]** Para los objetos de la presente invención, una "respuesta inmunitaria humoral" se refiere a una respuesta inmunitaria mediada por moléculas de anticuerpos, mientras que una "respuesta inmunitaria celular" o "respuesta inmunitaria mediada por células" es una mediada por los linfocitos T y/u otros glóbulos blancos. Una "respuesta inmunitaria protectora" es una respuesta inmunitaria que inhibe una función o actividad perjudicial (como un efecto perjudicial de un organismo patógeno como un virus), reduce la infección por un organismo patógeno (como un virus) o disminuye los síntomas que resultan de la infección por el organismo patógeno. Una respuesta inmunitaria protectora se puede medir, por ejemplo, mediante la inhibición de la replicación viral o la formación de placa en un ensayo de reducción de placa o un ensayo de neutralización por ELISA (NELISA), o midiendo la resistencia al desafío viral *in vivo*.

15 Adyuvantes

- [0020]** Las vacunas pueden ser profilácticas (por ejemplo, para evitar o mejorar los efectos de una futura infección por cualquier patógeno natural), o vacunas terapéuticas (por ejemplo, para el tratamiento de enfermedades virales crónicas como la hepatitis B o la hepatitis C o el cáncer). En su mayoría, las vacunas se administran en combinación con adyuvantes que aumentan los efectos de una vacuna al estimular el sistema inmunitario para que responda a la vacuna con mayor vigor y, por lo tanto, proporcionando mayor inmunidad a una enfermedad en particular.

- [0021]** Por lo tanto, un adyuvante es un agente que puede estimular el sistema inmunitario y aumentar la respuesta a una vacuna. Un adyuvante inmunológico se define como cualquier sustancia que actúa para acelerar, prolongar o mejorar las respuestas inmunitarias específicas de antígeno cuando se usa en combinación con antígenos de vacuna específicos.

- [0022]** Los adyuvantes realizan tareas inmunoestimuladoras imitando conjuntos específicos de moléculas conservadas evolutivamente, llamadas PMAP (patrones moleculares asociados a patógenos), que incluyen liposomas, lipopolisacáridos, jaulas moleculares para antígenos (es decir, nanopartículas, PSV, etc.), componentes de las paredes celulares bacterianas y ácidos nucleicos endocitados tales como ARN bicatenario, ADN monocatenario y ADN que contiene dinucleótido CpG no metilado (Glenn y O'Hagan, 2007). Debido a que los sistemas inmunitarios han evolucionado para reconocer estos restos antigénicos específicos, la presencia de un adyuvante junto con la vacuna puede aumentar considerablemente la respuesta inmunitaria innata al antígeno al aumentar las actividades de las células dendríticas, los linfocitos B y T, así como los macrófagos imitando una infección natural. Además, dado que los adyuvantes se atenúan más allá de cualquier función de virulencia, plantean poca o ninguna amenaza independiente a un organismo huésped.

- [0023]** Las sales de aluminio (por ejemplo, hidroxifosfato sulfato de aluminio) fueron los primeros adyuvantes aprobados por la Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) para su uso en seres humanos. El uso de sales de aluminio comenzó en la década de 1930, antes de que las directrices reguladoras se volvieran más estrictas. Más recientemente, se han obtenido aprobaciones en Europa para clases novedosas de adyuvantes no convencionales como MF59, un componente adyuvante de agua en aceite de la vacuna contra la influenza para pacientes ancianos (Fluad®, Novartis Vaccines) o AS04 (combinación de sulfato de aluminio potasio hidratado y monofosforil lípido A (MPL), GlaxoSmithKline) como adyuvante para una vacuna viral (hepatitis B, VHB).

- [0024]** Para mejorar las respuestas inmunitarias inducidas por las PSV homólogas o heterólogas, así como los antígenos proteicos o cualquier otra entidad codificante de vacunas (es decir, ADN, ARN), se requieren estrategias novedosas de inmunización más sofisticadas de tipo adyuvante para abordar los siguientes problemas inmunológicos y biotecnológicos:

- La especificidad antigénica de una estrategia novedosa de inmunización de tipo adyuvante como adyuvantes convencionales no es específica para estimular las respuestas inmunitarias.
- La viabilidad de un concepto de tecnología de plataforma con portadores de PSV o proteínas portadoras como objetivos universales para modular respuestas inmunitarias específicas de antígeno (véase también la Figura 1).
- La previsibilidad y la sencillez del desarrollo clínico para vacunas adecuadas a pesar de los enfoques de combinación de prueba y error con componentes adyuvantes no específicos de antígeno.
- Reducción de las cantidades de vacunas usadas para la inmunización con una relación dosis/respuesta comparable a la que se muestra para los entornos de adyuvantes convencionales.
- Mejora de la eficacia de la vacuna para personas que no responden (por ejemplo, vacunas contra el VHB) y apertura de novedosas oportunidades para estrategias terapéuticas de vacunación.

[0025] De acuerdo con una realización preferida de la invención, no deben usarse adyuvantes, es decir, las composiciones farmacéuticas y los procedimientos terapéuticos y profilácticos descritos en este documento están preferentemente libres de adyuvantes, por ejemplo, de los adyuvantes mencionados anteriormente y a continuación.

5 Ejemplos de adyuvantes que se usan generalmente en la técnica y que se evitan en la presente invención son adyuvantes inorgánicos, por ejemplo, sales de aluminio como fosfato de aluminio e hidróxido de aluminio, adyuvantes orgánicos como escualeno y adyuvantes basados en aceite.

[0026] Se ha descubierto sorprendentemente que los anticuerpos usados en la presente invención hacen uso
10 de adyuvantes superfluos, ya que el segundo brazo de unión al antígeno del anticuerpo trifuncional usado en este documento interactúa con el antígeno diana que está presente en forma solubilizada o crioconservada, por ejemplo, forma liofilizada, o que está presente en forma de partículas, por ejemplo, como epítipo portador de PSV expuestas a la superficie u otro epítipo portador-proteína adecuado; todos los anticuerpos biespecíficos y/o triespecíficos trifuncionales con el receptor Fc-gamma activador y el reconocimiento mitogénico anti-CD3 cumplen estos
15 prerrequisitos importantes para la estrategia de inmunización universal actualmente descrita que se puede usar en el campo del desarrollo de vacunas (Figura 1). En todos los casos, los antígenos son libres y no están unidos o asociados con, por ejemplo, una célula como una célula tumoral.

Principio de la invención

20 **[0027]** La presente invención describe por primera vez la capacidad de dichos anticuerpos trifuncionales y triespecíficos para inducir respuestas inmunitarias humorales y/o mediadas por células específicas del antígeno (preferentemente ambas) contra antígenos de proteínas solubles o crioconservadas o antígenos de proteínas presentes en forma de partículas en lugar del enfoque convencional adoptado hasta ahora en la técnica anterior en el
25 que el anticuerpo trifuncional siempre estaba dirigido contra un antígeno asociado o unido, por ejemplo, a una célula tumoral y no el antígeno tumoral aislado en forma crioconservada o en forma solubilizada o un antígeno diana que está presente en un portador en forma de partículas. El medio de citoquinas proinflamatorias sesgado por TH1 activado por interferón gamma y los eventos de señalización coestimulantes requeridos para el entorno de inmunización de tipo adyuvante se inducen *in vivo* a través de la interferencia de las células T y las células accesorias activadas por el
30 acoplamiento anti-CD3 y Fc-gamma-receptor de dicho anticuerpos biespecíficos y triespecíficos trifuncionales, respectivamente.

[0028] El inventor describe una nueva estrategia de vacunación y una composición farmacéutica que se usará para dicha vacunación utilizando la capacidad de los anticuerpos biespecíficos y triespecíficos trifuncionales de
35

- (a) unirse a una célula T y mediar una primera señal de activación;
- (b) unirse a antígenos específicos o asociados a tumores en una célula tumoral o proteínas solubles;
- (c) unirse, a través de su porción Fc (en el caso de los anticuerpos biespecíficos trifuncionales) o una tercera especificidad (en el caso de los anticuerpos triespecíficos) al receptor Fc-gamma I, II y/o III de las células positivas
40 para el receptor Fc-gamma;
- (d) la activación de la célula positiva para el receptor Fc mediante la unión a la célula positiva para el receptor Fc-gamma y, de ese modo, iniciar o aumentar la expresión de citoquinas y/o antígenos coestimulantes de regulación positiva;
- (e) transferir al menos una segunda señal de activación requerida para la activación fisiológica de la célula T a la célula
45 T por las citoquinas y/o los antígenos coestimulantes, en la que dicha activación provoca una regulación positiva de los marcadores de activación, eliminando el tumor celular y/o la proliferación de células T.

[0029] La composición farmacéutica y el procedimiento de vacunación de la invención se aplicarán en el tratamiento de mamíferos, preferentemente de seres humanos.
50

[0030] Los inventores han descubierto que un antígeno diana que está involucrado en una enfermedad y que se administra en una composición farmacéutica en forma solubilizada o en forma crioconservada o en forma de partículas específicamente unidas a un portador como una PSV, puede activar de forma efectiva el sistema inmunitario para inducir una respuesta inmunitaria humoral y mediada por células dirigida contra el antígeno diana y
55 adicionalmente a cualquier otro antígeno que se administre en estrecha proximidad con el antígeno diana, preferentemente al unirse al antígeno diana, por ejemplo, en forma de una partícula similar a un virus. Por lo tanto, no es absolutamente necesario que el anticuerpo se dirija contra el antígeno que está involucrado o que está asociado con una enfermedad a tratar; también es factible que el antígeno se dirija contra un epítipo de una proteína portadora que no esté involucrada en una enfermedad de todos modos; siempre que el antígeno involucrado en la enfermedad
60 se aplique en estrecha relación con el antígeno diana contra el cual se dirige el anticuerpo, el sistema inmunitario se activará mediante los anticuerpos de la presente invención para inducir una respuesta inmunitaria humoral y mediada

por células, que también estará dirigida contra el antígeno involucrado en la enfermedad, por ejemplo, un antígeno específico de tumor. Se supone entonces que el antígeno diana y el antígeno asociado a la enfermedad (involucrado en la enfermedad) se unen entre sí directamente o mediante un enlazador o mediante un portador o mediante otras proteínas (véase la Figura 1).

5

[0031] El antígeno diana no necesariamente tiene que ser un antígeno que esté involucrado en el tratamiento de una enfermedad como un tumor, una infección viral o bacteriana o fúngica, etc. El antígeno diana también puede ser un antígeno que sea específico para el portador o cualquier otra entidad contra la cual se dirige el anticuerpo. En dicho caso, el antígeno diana junto con el anticuerpo biespecífico o trispecífico trifuncional actuará como un tipo de adyuvante e iniciará una respuesta inmunitaria humoral y mediada por células que también ayudará a inmunizar al individuo a tratar contra el antígeno específico de la enfermedad. A nivel molecular y celular, esta reactividad similar hacia diferentes especies de proteínas se refleja simplemente por la estructura agregada originada a partir de entidades proteicas unidas covalentemente o asociadas que se fagocita, se procesa y se presenta a las células T a través de una única CPA en el contexto del entorno inmunoestimulador que se crea por los anticuerpos biespecíficos y trispecíficos trifuncionales actualmente usados. Dicho entorno inmunoestimulador implica la activación de la célula positiva para el receptor de Fc mediante la unión a la célula positiva para el receptor de Fc gamma y el inicio o el aumento de la expresión de citoquinas y/o antígenos coestimulantes; en segundo lugar, al menos una segunda señal de activación requerida para la activación fisiológica de la célula T será transferida a la célula T por los antígenos y/o citoquinas coestimulantes o viceversa de la célula T a la célula accesoria, en la que dicha activación causa una regulación positiva de los marcadores de activación, la muerte de la célula tumoral y/o la proliferación de células T. Se debe enfatizar que el uso actual de los anticuerpos incluidos en la invención evita la adición externa de citoquinas como las interleuquinas, ya que estos anticuerpos mismos inician la producción de citoquinas al activar las células positivas para el receptor de Fc gamma.

25 Antígenos objetivo

[0032] Un "antígeno diana" o descrito breve e indistintamente como "antígeno" es un compuesto, composición o sustancia que puede estimular la producción de anticuerpos o una respuesta de células T en un animal o ser humano, incluidas las composiciones que se inyectan o absorben en un animal o ser humano o. Un antígeno reacciona con los productos de inmunidad humoral o celular específica.

[0033] Un "polipéptido antigénico" (usado indistintamente con "antígeno diana") es un polipéptido al que se puede estimular una respuesta inmunitaria, como una respuesta de células T o una respuesta de anticuerpos. El término "antígeno diana" incluye también epítomos antigénicos relacionados. "Epítopo" o "determinante antigénico" se refiere a un sitio en un antígeno al que responden las células B y/o T. Los epítomos pueden formarse a partir de aminoácidos contiguos (lineales) o aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por plegamiento terciario de un polipéptido antigénico (conformacional). Los epítomos formados a partir de aminoácidos contiguos se conservan típicamente en la exposición a disolventes desnaturizantes, mientras que los epítomos formados por plegamiento terciario se pierden típicamente en el tratamiento con disolventes desnaturizantes. Normalmente, un epítopo incluirá entre aproximadamente 5 y 15 aminoácidos, tal como, 7, 9, 10, 12 o 15 aminoácidos. Los aminoácidos se encuentran en una conformación espacial particular. Los procedimientos para determinar la conformación espacial de epítomos incluyen, por ejemplo, la cristalografía de rayos X y la espectroscopia de resonancia magnética nuclear multidimensional. Los procedimientos para determinar la conformación espacial de epítomos incluyen, por ejemplo, la cristalografía de rayos X y la espectroscopia de resonancia magnética nuclear multidimensional. Véase, por ejemplo, "Epitope Mapping protocols" en Methods in Molecular Biology, vol. 66, Glenn E. Morris, Ed (1996).

[0034] El término "antígeno diana" indica antígenos de ambas subunidades (por ejemplo, antígenos que están separados y son discretos de un organismo completo con el cual el antígeno está asociado en la naturaleza), así como bacterias, virus, hongos, protozoos, parásitos u otros microbios atenuados y también epítomos inmunológicamente activos de cualquiera de estos antígenos.

[0035] Un "antígeno" incluye una proteína con modificaciones, tales como delecciones, adiciones y sustituciones (generalmente de naturaleza conservadora) a la secuencia nativa, siempre que la proteína mantenga la capacidad de provocar una respuesta inmunológica, como se define en este documento. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como a través de la mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, como a través de mutaciones de huéspedes que producen los antígenos.

[0036] Dicho antígeno diana puede ser un antígeno asociado a la enfermedad seleccionado de uno o más miembros de entre el grupo que consiste en antígenos asociados a tumores, antígenos fúngicos, antígenos virales, protozoos y antígenos bacterianos, y/o dicho antígeno diana es un portador específico pero no un antígeno asociado a la enfermedad en la que el antígeno asociado a la enfermedad está conjugado o asociado con dicho portador, y/o

dicho antígeno diana es un antígeno no asociado a la enfermedad conjugado o asociado a uno o más antígenos asociados a la enfermedad, y/o un epítipo inmunológicamente activo de cualquiera de dichos antígenos objetivo.

[0037] En una realización de la invención, el antígeno diana es un antígeno asociado a tumor. En general, todos los tipos de tumores pueden tratarse con el presente procedimiento. En particular, se pueden tratar tumores epiteliales, adenocarcinomas, carcinomas de colon, carcinomas de mama, carcinomas de ovario, carcinomas de pulmón, garganta, nariz y oído. Además, se pueden tratar preferentemente tumores no epiteliales como leucemias y linfomas y tumores inducidos por virus como tumores hepáticos o carcinomas de cuello uterino. Ejemplos de antígenos asociados a tumores que se usarán son EpCAM, Her2/neu, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A5, MAGE-AX, NY-ESO-1, NFX2, SSX2, SSX4, Trp2, gp100, tirosinasa, Muc-1*, CEA, telomerasa, survivina, CD20, G250, proteoglicanos, p53, EGF-R, CA125, MUC, antígeno Wue, antígeno Lewis Y, HSP-27, HSP-70, HSP-90, PSA, PMSA, GD2, GD3, FAP, Pgp, MCSP, EpHA2, CD33 y objetivos de superficie celular GC182, GT468 o GT512.

[0038] Los antígenos asociados a tumores descritos anteriormente se asocian o son específicos de tumores particulares. Por ejemplo, EpCAM se asocia típicamente con adenocarcinomas, Her2/neu con carcinomas de mama, pero también con cáncer de colon, pulmón, estómago, páncreas y ovario, CD20 con linfomas de células B como el linfoma no Hodgkin o leucemia linfática crónica, G250 con carcinomas renales, proteoglicanos GD3 y GD2, gp100, tirosinasa con melanomas, EGF-R y CEA con tumores epiteliales.

[0039] Otros antígenos a usar son antígenos de virus humanos, por ejemplo, HBsAg o HBcAg de virus de la hepatitis B o la hepatitis C, gp41, gp120 o nef de VIH-1, L1 de papilomavirus, HA y NA del virus de la influenza; antígenos bacterianos, por ejemplo, Ag85B o ESAT-6 de *Mycobacterium tuberculosis*; antígenos fúngicos, por ejemplo, la manoproteína 65 o Hsp90 de *Candida albicans*, Hsp60 o proteína de superficie similar a histon-H2B de *Histoplasma capsulatum*, el polisacárido capsular GXM de *Cryptococcus neoformans*; antígenos protozoarios, por ejemplo, la proteína circunsporozoite, MCSP-1, var, PfEMBI o AMA1/MSP-1 de *Plasmodium spp.*, GST o tetraspanina o paramiosina de *Schistosoma spp.*, gp63 o PSA-2.

[0040] En resumen, dicho antígeno diana asociado a la enfermedad se selecciona, por ejemplo, de uno o más miembros de entre el grupo que consiste en EpCAM, Her2/neu, PMAGE-A3, NY-ESO-1, Trp2, gp100, Muc-1*, CEA, MUC, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A5, MAGE-AX, NFX2, SSX2, SSX4, tirosinasa, telomerasa, survivina, CD20, G250, proteoglicanos, p53, EGF-R, CA125, Hsp-27, Hsp-70, Hsp-90, PSA, PMSA, antígeno Wue, antígeno Lewis Y, FAP, Pgp, MCSP, EpHA2, CD33, objetivos de superficie celular GC182, GT468 o GT512, antígenos virales: HA y NA del virus de la influenza; HBsAg y HBcAg de VHB o VHC, L1 de papilomavirus, gp 41 específico de VIH1, gp120 o nef, antígenos bacterianos: Ag85B o ESAT-6 de *Mycobacterium tuberculosis*; antígenos fúngicos: por ejemplo, la manoproteína 65 o Hsp90 de *Candida albicans*, Hsp60 o proteína de superficie similar al histon-H2B de *Histoplasma capsulatum*, el polisacárido capsular GXM de *Cryptococcus neoformans*; antígenos protozoarios, por ejemplo, la proteína circunsporozoite o AMA1/MSP-1 o PfEMP1 o var de *Plasmodium spp.*, GST o tetraspanina o paramiosina de *Schistosoma spp.*, gp63 o PSA-2.

[0041] Dicho antígeno diana y/o uno o más de dichos otros antígenos adicionales están presentes en forma aislada y no conjugada, o dicho antígeno diana está conjugado o asociado con un portador o en el que dicho antígeno diana y dicho uno o más antígenos adicionales están asociados o se conjugan entre sí directamente o a través de un portador, opcionalmente en el que dicho antígeno diana se presenta mediante una partícula similar a un virus.

[0042] Dicho antígeno diana también puede ser un antígeno específico del portador pero no asociado a la enfermedad, en el que el antígeno asociado a la enfermedad está conjugado o asociado con dicho portador.

[0043] Dicho antígeno diana también puede ser un antígeno no asociado a la enfermedad conjugado o asociado con uno o más antígenos asociados a la enfermedad.

[0044] Dicho portador para la asociación o conjugación con dicho antígeno diana y/o antígenos adicionales puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en PSV homólogas, PSV heterólogas/quiméricas con antígenos proteicos unidos covalentemente o asociados, antígenos de proteína única, polipéptidos multiantígenos, proteínas de fusión heterólogas.

55 Forma de administración de los antígenos objetivo en combinación con los anticuerpos biespecíficos o trispecíficos trifuncionales

[0045] Los antígenos objetivo se administran en una realización de la invención en forma de una proteína solubilizada y en ausencia de un adyuvante en una preparación farmacéutica en combinación con un anticuerpo biespecífico o trispecífico trifuncional y portadores farmacéuticamente compatibles. "Proteína solubilizada" significa que el antígeno diana no está presente, por ejemplo, en una célula, por ejemplo, una célula tumoral, sino en una forma

soluble en agua o solución salina fisiológica. La solubilidad de una proteína del antígeno diana depende, entre otros, del punto isoeléctrico y la fuerza iónica. Las proteínas globulares son fácilmente solubles en agua o solución salina fisiológica. Cuanto mayor sea el número de grupos hidrófilos en la superficie de la proteína del antígeno diana, mayor será la capa de solvatación formada y mejor será su solubilidad.

5

Partículas similares a virus

[0046] En una realización adicional de la invención, los antígenos objetivo se presentan en la superficie de partículas similares a virus (PSV). Partícula similar a virus (PSV), como se usa en este documento, se refiere a una
10 partícula de virus no replicativa o no infecciosa, preferentemente una partícula de virus no replicativa y no infecciosa, o se refiere a una partícula de virus no replicativa o no infecciosa, preferentemente una partícula de virus no replicativa y no infecciosa que se asemeja a una estructura infecciosa, preferentemente una cápside de virus. La expresión "no replicativa", como se usa en este documento, se refiere a que es incapaz de replicar el genoma comprendido por la PSV. La expresión "no infecciosa", como se usa en este documento, se refiere a que es incapaz de ingresar a la célula
15 huésped.

[0047] Una partícula similar a un virus de acuerdo con la invención es no replicativa y/o no infecciosa, ya que carece preferentemente de todo o parte de la función del genoma o genoma viral. En una realización, una partícula similar a un virus es una partícula de virus, en la que el genoma viral ha sido inactivado física o químicamente.
20 Típicamente, y más preferentemente, una partícula similar a virus carece de todos o parte de los componentes replicativos e infecciosos del genoma viral. Una partícula similar a un virus de acuerdo con la invención puede contener ácido nucleico distinto de su genoma. Una realización típica y preferida de una partícula similar a virus de acuerdo con la presente invención es una cápside viral tal como la cápside viral del virus correspondiente, bacteriófago, preferentemente bacteriófago de ARN. Los términos "cápside viral" o "cápside", se refieren a un conjunto
25 macromolecular compuesto por subunidades de proteínas virales. Típicamente, hay 60, 120, 180, 240, 300, 360 y más de 360 subunidades de proteínas virales. Típicamente y preferentemente, las interacciones de estas subunidades conducen a la formación de la cápside viral o estructura similar a la cápside viral con una organización repetitiva inherente, en la que dicha estructura es, típicamente, esférica o tubular. Por ejemplo, las cápsides de los bacteriófagos de ARN o HBcAgs tienen una forma esférica de simetría icosaédrica. La expresión "estructura similar a la cápside",
30 como se usa en este documento, se refiere a un conjunto macromolecular compuesto por subunidades de proteínas virales que se asemejan a la morfología de la cápside en el sentido definido anteriormente, pero que se desvían del conjunto simétrico típico mientras mantienen un grado suficiente de orden y repetición.

[0048] Una característica común de las partículas virales y de las partículas similares a virus es la disposición
35 altamente ordenada y repetitiva de sus subunidades. Partícula similar a un virus de un bacteriófago de ARN: como se usa en este documento, la expresión "partícula similar a un virus de un bacteriófago de ARN" se refiere a una partícula similar a un virus que comprende, o que preferentemente consiste esencialmente o que consiste en proteínas de cubierta, mutantes o fragmentos de las mismas, de un bacteriófago ARN. Además, las partículas similares a virus de un bacteriófago de ARN que se asemejan a la estructura de un bacteriófago de ARN, que no son replicativas y/o no
40 infecciosas, y que carecen de al menos el gen o los genes que codifican la maquinaria de replicación del bacteriófago de ARN, y que típicamente también carecen del gen o los genes que codifican la proteína o proteínas responsables de la unión viral o la entrada en el huésped. Esta definición, sin embargo, también debería abarcar partículas similares a virus de bacteriófagos de ARN, en las que el gen o genes mencionados anteriormente todavía están presentes pero inactivos y, por lo tanto, que también conducen a partículas similares a virus no replicativas y/o no infecciosas de un
45 bacteriófago de ARN.

[0049] Las PSV preferidas derivadas de bacteriófagos de ARN muestran una simetría icosaédrica y consisten en 180 subunidades (monómeros). Los procedimientos preferidos para hacer que una partícula similar a un virus de un bacteriófago ARN no sea replicativo y/o no infeccioso es mediante inactivación física o química, como la radiación
50 UV, el tratamiento con formaldehído, típicamente y preferentemente mediante manipulación genética.

[0050] Típicamente, las partículas similares a virus son heterólogas ya que contienen como proteína heteróloga extraña al menos un antígeno diana que se presenta (se muestra) por la PSV en su superficie al anticuerpo que es capaz de unirse a dicho antígeno diana. La PSV actúa como un portador que muestra la entidad antigénica objetivo.
55

[0051] Los antígenos objetivo en forma de partículas de acuerdo con la invención que están en forma de PSV generalmente comprenden diferentes proteínas esenciales y una o más proteínas opcionales adicionales. En una realización, al menos las proteínas esenciales son proteínas de la cápside interna mayor del virus, una de dichas proteínas esenciales es una proteína de la cápside externa mayor del virus, y las proteínas opcionales se seleccionan
60 de entre proteínas de la cápside interna menor y proteínas de la cápside externa mayor. Preferentemente, las PSV no comprenden ninguna, o una proteína de la cápside externa mayor del virus opcional adicional y/o ninguna, una, dos o

tres proteínas más de la cápside interna menor del virus opcional adicional.

[0052] Las proteínas mencionadas anteriormente son quiméricas y comprenden una secuencia de aminoácidos derivada de una proteína extraña distinta o idéntica a dichas proteínas nativas en las que dicha secuencia de aminoácidos quimérica o nativa forma la secuencia de aminoácidos objetivo para la unión de los anticuerpos biespecíficos trifuncionales de la invención.

[0053] Por lo tanto, al menos una de cualquiera de las proteínas mencionadas anteriormente es quimérica y comprende una secuencia de aminoácidos derivada de una proteína extraña distinta de las proteínas nativas.

[0054] Los antígenos de la invención se pueden producir con al menos una de las proteínas en forma nativa y la misma proteína o proteínas que están además en forma quimérica, es decir, que incorporan secuencias de aminoácidos de una proteína extraña. Los antígenos quiméricos en forma de partículas se pueden producir de acuerdo con la invención en los que la secuencia de aminoácidos derivada de la proteína extraña incluye un epítipo que es reconocido por un anticuerpo biespecífico trifuncional para la proteína extraña. Por ejemplo, la proteína extraña es una proteína de un organismo productor de enfermedad y el antígeno en forma de partículas es capaz de generar anticuerpos protectores (por ejemplo, neutralizantes) y/o una respuesta inmunitaria celular en un organismo susceptible a la enfermedad. Los antígenos usados en la invención encuentran una utilidad especial en la formulación de vacunas.

[0055] Las PSV quiméricas pueden incluir una o más de las principales proteínas estructurales incorporadas en forma quimérica. Las PSV pueden incluir al menos una o dos o más proteínas de virus diferentes en forma nativa, y al menos una proteína en forma quimérica que comprende una secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos derivada de una proteína extraña.

[0056] Las PSV quiméricas que comprenden al menos una proteína no nativa se producen de acuerdo con la invención al ensamblar las PSV a partir de una pluralidad de proteínas diferentes, que incluyen proteínas de virus nativos y la proteína no nativa. La proteína no nativa comprende una secuencia de aminoácidos derivada de una proteína extraña y una secuencia de aminoácidos derivada de una proteína de virus nativa. La secuencia de aminoácidos derivada de una proteína extraña puede ubicarse en el extremo N-terminal de la proteína quimérica, aunque también se contemplan otras disposiciones de acuerdo con la invención, por ejemplo, en la que la secuencia de aminoácidos derivada de una proteína extraña se inserta dentro de secuencia de la proteína nativa, o se ubica en el extremo C-terminal. Se ha descubierto que la ubicación de la secuencia de aminoácidos derivada de una proteína extraña en el extremo N-terminal de la proteína quimérica, permite que el epítipo extraño sea inmunogénico en la PSV.

[0057] Pueden emplearse técnicas convencionales de mutagénesis dirigida al sitio y empalme de genes con el fin de construir secuencias de ADN capaces de expresarse como la proteína quimérica incluida como componente de las partículas de antígeno de la invención. De forma similar, las partículas de antígeno se pueden ensamblar a partir de sus componentes constituyentes en una variedad de formas. Así, por ejemplo, los componentes pueden producirse por separado y luego combinarse simplemente mezclando soluciones de las proteínas constituyentes en un medio adecuado. Sin embargo, se prefiere que las proteínas nativas y quiméricas se expresen juntas de manera que el ensamblaje de las partículas antigénicas pueda tener lugar sin que el polipéptido expresado se degrade, modifique o altere de otro modo.

[0058] En una realización de la invención, el antígeno específico de tumor EpCAM se reticula con una PSV y se administra a un individuo con el fin de inducir una respuesta de células T DC8-IFN gamma y protección contra tumores específicos de EpCAM.

[0059] En realizaciones alternativas adicionales de la invención, el antígeno diana se presenta en forma de una proteína de fusión heteróloga, un polipéptido multiantigénico, un polipéptido multiepítipo o un antígeno proteico unido de forma covalente.

[0060] La expresión "proteína de fusión heteróloga" debe entenderse como una proteína que está compuesta por al menos dos proteínas que son diferentes entre sí y que están unidas de forma covalente (es decir, fusionadas) entre sí. Al menos un componente de dicha proteína de fusión actúa como el antígeno diana, mientras que el otro es un antígeno adicional contra el cual se va a inmunizar al individuo. Debe observarse que el antígeno diana es generalmente dicho antígeno contra el cual se va a inmunizar al individuo.

[0061] El término "polipéptido multiantigénico" debe entenderse como un polipéptido que está compuesto por al menos dos polipéptidos que son diferentes entre sí y que están unidos preferentemente de forma covalente (es

decir, fusionados). Al menos un componente de dicho polipéptido actúa como el antígeno diana, mientras que el otro se define como "uno o más antígenos adicionales" contra los cuales se va a inmunizar al individuo. Debe observarse que el antígeno diana es generalmente dicho antígeno contra el cual se va a inmunizar al individuo.

5 **[0062]** El término "polipéptido multiepitopo" debe entenderse como un polipéptido que está compuesto por al menos dos péptidos que definen epítomos que son diferentes entre sí y que están unidos preferentemente de forma covalente. Al menos un epítomo de dicho polipéptido actúa como el antígeno diana, mientras que el otro se define como "uno o más antígenos adicionales" contra los cuales se va a inmunizar al individuo. Debe observarse que el antígeno diana es generalmente dicho antígeno contra el cual se va a inmunizar al individuo.

10

[0063] La expresión "antígeno proteico unido de forma covalente" debe entenderse como un antígeno proteico que está unido de forma covalente a cualquier entidad, por ejemplo, una partícula similar a un virus, un bacteriófago, un portador, etc.

15 **[0064]** Se enfatiza que el antígeno diana y el uno o más antígenos adicionales contra los cuales se inmuniza el sujeto mamífero no están presentes en forma de células, específicamente no están en forma de células completas. Cualquier portador al que se une el antígeno diana está presente en un tamaño que está dentro de un diámetro medio de aproximadamente 10 nm a 1 µm. Contrariamente a esto, las terapias mediadas por anticuerpos de la técnica anterior hicieron uso de células completas cuyo tamaño está en el intervalo de aproximadamente 10-30 µm, es decir, mucho más grandes que el tamaño del antígeno diana usado en la invención.

[0065] "Forma particulada" debe entenderse como cualquier partícula de cualquier forma con un diámetro medio de aproximadamente 10 a 1000 nm. Ejemplos específicos son partículas similares a virus, bacteriófagos, partículas artificiales, por ejemplo, partículas poliméricas, etc.

25

Anticuerpos

[0066] De acuerdo con la invención, se usan anticuerpos biespecíficos y/o triespecíficos trifuncionales intactos heterólogos (actr) en una realización específica y preferida de la invención. Estos anticuerpos están intactos, es decir, tienen una porción Fc funcional, y deben ser de naturaleza heteróloga, es decir, deben consistir en cadenas pesadas de inmunoglobulina de diferentes subclases (combinaciones de subclases, también fragmentos) y/u origen (especies).

[0067] Estos anticuerpos biespecíficos y/o triespecíficos trifuncionales heterólogos intactos se seleccionarán para que tengan además las siguientes propiedades: a) unión a una célula T; b) unión a al menos un antígeno en una célula tumoral; c) unión, mediante su porción Fc (en el caso de los anticuerpos biespecíficos), o mediante una tercera especificidad (en el caso de los anticuerpos triespecíficos) a células positivas para el receptor Fc. Preferentemente, también inician las respuestas de las células T sesgadas por TH1 acompañadas de interferón gamma y las respuestas inmunitarias humorales.

40 **[0068]** La activación de las células positivas para el receptor Fc por el actr depende de la subclase o combinación de subclases, respectivamente, del actr. Como se demostró en experimentos *in vitro*, por ejemplo, los actr de la subclase de combinación IgG2a de ratón/IgG2b de rata son capaces de unirse y activar simultáneamente las células positivas para el receptor Fc, lo que conduce a la regulación positiva y a la formación (expresión), respectivamente, de antígenos coestimulantes, como CD40, CD80 o CD86, en la superficie celular de dichas células.

45 A diferencia, los acbs de la subclase de combinación IgG1/IgG2b de ratón son capaces de unirse a las células positivas para el receptor Fc (1), pero claramente son incapaces de activar estas células en una medida comparable (2).

[0069] Si bien los actr al mismo tiempo se unen y activan las células T a través de uno de los brazos de unión (por ejemplo, a CD3 o CD2), las señales coestimulantes derivadas de las células positivas para el receptor Fc unidas a la porción Fc del actr pueden transferirse a la célula T. Es decir, solo la combinación de la activación de las células T a través de un brazo de unión del actr y la transferencia simultánea de señales coestimulantes de la célula positiva para el receptor de Fc a las células T da como resultado una activación efectiva de las células T.

[0070] Otro aspecto importante en la inducción de inmunidad antitumoral es la posibilidad de fagocitosis, procesamiento y presentación de componentes tumorales por células accesorias (monocitos/macrófagos, células dendríticas y células "asesinas naturales" NK) que se han dirigido y activado por el acbs. Mediante este mecanismo clásico de presentación de antígeno, se pueden generar células CD4 específicas del tumor, así como células CD8 positivas. Además, las células CD4 específicas de tumores desempeñan un papel importante en la inducción de una reacción inmunitaria humoral en el contexto de la cooperación de las células T-B.

60

[0071] Los anticuerpos biespecíficos y triespecíficos trifuncionales son capaces de unirse al complejo receptor

de células T de la célula T mediante un brazo de unión y a los antígenos asociados al tumor mediante el segundo brazo de unión. De este modo, activan las células T que destruyen las células tumorales mediante la liberación de citoquinas o mecanismos mediadores de apoptosis. Además, en el contexto de su activación por anticuerpos biespecíficos, es claramente posible que las células T reconozcan antígenos específicos de tumores a través de su receptor, por lo que se inicia una inmunización de larga duración. En este sentido, la porción Fc intacta del anticuerpo biespecífico o trispecífico es de particular importancia al mediar la unión a células accesorias como los monocitos/macrófagos y las células dendríticas y al inducir a estas células a convertirse en citotóxicas y/o transferir simultáneamente importantes señales coestimulantes a la célula T. De esta manera, parece posible que una reacción de células T pueda inducirse también contra péptidos específicos de tumores hasta ahora desconocidos.

[0072] La redirección de células T específicas del tumor posiblemente anergizadas a células tumorales por medio de anticuerpos biespecíficos y/o trispecíficos y la coestimulación simultánea de dichas células T por células accesorias unidas a la porción Fc del anticuerpo biespecífico o trispecífico podría actuar para revertir la anergia de células T citotóxicas (CTL); es decir, usando anticuerpos biespecíficos y/o trispecíficos heterólogos intactos, se puede neutralizar una tolerancia de células T existente en el paciente contra el tumor y, por lo tanto, se puede inducir una inmunidad antitumoral de larga duración.

[0073] Los anticuerpos usados de acuerdo con la invención son preferentemente capaces de reactivar células T específicas de tumores que están en un estado anérgico. Además, son capaces de inducir, por ejemplo, anticuerpos de unión al complemento reactivo al tumor y, por lo tanto, una reacción inmunitaria humoral.

[0074] La unión de los actr tiene lugar preferentemente a través de CD3, CD2, CD4, CD5, CD6, CD8, CD28 y/o CD44 a la célula T, lo más preferente a través de CD3. Las células positivas para el receptor Fc tienen al menos un receptor de Fc gamma I, IIa, IIb o III.

[0075] Los anticuerpos empleados de acuerdo con la invención pueden unirse a monocitos, macrófagos, células dendríticas, células "asesinas naturales" (células NK) y/o neutrófilos activados, siendo todas células positivas para el receptor Fc gamma I.

[0076] Los anticuerpos usados de acuerdo con la invención conducen a una inducción o a un aumento en la expresión de CD40, CD80, CD86, ICAM-1 y/o LFA-3 como antígenos coestimulantes y/o secreción de citoquinas por la célula positiva para el receptor Fc. Las citoquinas son preferentemente IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-12 y/o TNF- α .

[0077] La unión a la célula T tiene lugar a través del complejo receptor de células T de la célula T.

[0078] Los anticuerpos biespecíficos trifuncionales usados de acuerdo con la invención son, preferentemente, un anticuerpo de antígeno antitumoral asociado a anti-CD3 X y/o un anticuerpo de antígeno antitumoral asociado a anti-CD4 X y/o un anticuerpo de antígeno antitumoral asociado a anti-CD5 X y/o un anticuerpo de antígeno antitumoral asociado a anti-CD6 X y/o un anticuerpo de antígeno antitumoral asociado a anti-CD8X y/o un anticuerpo de antígeno antitumoral asociado a anti-CD2 X y/o un anticuerpo de antígeno antitumoral asociado a anti-CD28 X y/o un anticuerpo de antígeno antitumoral asociado a anti-CD44 X. Se prefiere particularmente un anticuerpo antígeno antitumoral asociado a anti-CD3 X

[0079] Se prefieren los anticuerpos trifuncionales con el siguiente grupo de combinaciones de isotipos en su región Fc:

IgG2b de rata/IgG2a de ratón,
IgG2b de rata/IgG2b de ratón
IgG2b de rata/IgG1 humana,

[VH-CH1, VL-CL]de ratón-IgG1 humana/[VH-CH1, VL-CL] de rata-IgG1humana-[bisagra]-Ig3*-CH2-CH3] humana en los que * = alotipos caucásicos G3m (b+g)= sin unión a la proteína A.

[0080] Se prefiere particularmente IgG2b de rata/IgG2a de ratón, más preferido en combinación con anti-CD3. Preferentemente, dicho anticuerpo biespecífico trifuncional es un anticuerpo antígeno antiobjetivo x anti-CD3 que se une a los receptores Fc γ tipo I/II/III con la combinación de isotipos IgG2b de rata/IgG2a de ratón.

[0081] Los anticuerpos son anticuerpos intactos monoclonales, quiméricos, recombinantes, sintéticos, semisintéticos o modificados químicamente que tienen, por ejemplo, fragmentos Fv, Fab, scFv o F(ab)2.

[0082] La preparación de anticuerpos monoclonales que se originan preferentemente en mamíferos, por ejemplo, procedimientos, como por ejemplo, los descritos en Köhler y Milstein (Nature 256 (1975), 495), en Harlow y

Lane (Antibodies, A Laboratory Manual (1988), Cold Spring Harbor) o en Galfré (Meth. Enzymol. 73 (1981), 3). Además, es posible preparar los anticuerpos descritos mediante tecnología de ADN recombinante de acuerdo con técnicas obvias para el experto en la materia (véase Kurucz y col. J. Immunol. 154 (1995), 4576; Hollinger y col., Proc. Natl. Acad. Sc. EE.UU. 90 (1993), 6444). Los anticuerpos usados en el presente procedimiento pueden diseñarse y fabricarse por un experto en la materia sin una carga indebida; por ejemplo, Greenwood y col. describen el intercambio de dominios de inmunoglobulina individuales (por ejemplo, CH₂) mediante una técnica de clonación adecuada. Usando estas técnicas de clonación, las combinaciones de anticuerpo como [VH-CH1, VL-CL] de ratón-IgG1 humana/[VH-CH1, VL-CL] de rata-IgG1 humana-[bisagra]-Ig3*-[CH2-CH3] humana: en los que * = alotipos caucásicos G3m (b+g)= sin unión a la proteína A.

10

[0083] Por un lado, la preparación de anticuerpos biespecíficos trifuncionales se puede realizar usando tecnología de ADN recombinante o mediante una técnica de fusión híbrido-híbrido (véase por ejemplo Milstein y col., Nature 305 (1983), 537). Mediante esta técnica, se fusionan líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos, teniendo cada una de las cuales una de las especificidades deseadas, y se identifican y aíslan líneas celulares recombinantes que producen anticuerpos con ambas especificidades.

15

[0084] La preparación de anticuerpos que tienen tres especificidades, los llamados anticuerpos triespecíficos, puede llevarse a cabo mediante el acoplamiento a una de las cadenas de IgG pesadas de un anticuerpo biespecífico, teniendo un tercer sitio de unión a antígeno otra especificidad, por ejemplo, en forma de "fragmentos variables de cadena única" (scFv). El scFv puede estar unido, por ejemplo, a una de las cadenas pesadas a través de un enlazador -S-S (G4S)nD-I (S = serina, G = glicina, D = aspartato, I = isoleucina). De manera análoga, se pueden preparar construcciones F (ab)₂ triespecíficas sustituyendo las regiones CH2-CH3 de la cadena pesada de una especificidad de un anticuerpo biespecífico por un scFv de una tercera especificidad mientras que las regiones CH2-CH3 de la cadena pesada de la otra especificidad se eliminan, por ejemplo, mediante la introducción de un codón de parada (al final de la región "bisagra") en el gen de codificación, por ejemplo, mediante recombinación homóloga. Para la preparación de construcciones scFv triespecíficas, tres regiones VH-VL que representan tres especificidades diferentes se disponen en serie. Por el bien de la descripción completa, se hace referencia, por ejemplo, al documento US6994853.

20

25

[0085] El problema subyacente de la invención puede resolverse tanto mediante preferentemente anticuerpos biespecíficos trifuncionales como triespecíficos en la medida en que muestran las características y actividades caracterizadas en la reivindicación 1. A continuación, se describe con más detalle la preparación de anticuerpos que tienen dos y tres especificidades. Proporcionar dichos anticuerpos biespecíficos y triespecíficos trifuncionales pertenece al estado de la técnica. La preparación de anticuerpos que tienen tres especificidades, los llamados anticuerpos triespecíficos, que también son adecuados para resolver el problema fundamental de la invención, puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante el acoplamiento a una de las cadenas pesadas de IgG de un anticuerpo biespecífico de un tercer sitio de unión al antígeno que tiene otra especificidad, por ejemplo en forma de "fragmentos variables de cadena única" (scFv). El scFv puede estar unido, por ejemplo, a una de las cadenas pesadas a través de un enlazador S-S (G4S)nD-I (S = serina, G = glicina, D = aspartato, I = isoleucina). De manera análoga, se pueden preparar construcciones F (ab)₂ triespecíficas sustituyendo las regiones CH2-CH3 de la cadena pesada de una especificidad de un anticuerpo biespecífico por un scFv de una tercera especificidad mientras que las regiones CH2-CH3 de la cadena pesada de la otra especificidad se eliminan, por ejemplo, mediante la introducción de un codón de parada (al final de la región "bisagra") en el gen de codificación, por ejemplo, mediante recombinación homóloga. También es posible preparar construcciones scFv triespecíficas. En este caso, tres regiones VH-VL que representan tres especificidades diferentes se disponen en serie.

35

40

45

[0086] De acuerdo con la invención, se usan, por ejemplo, anticuerpos biespecíficos trifuncionales intactos. Los anticuerpos biespecíficos intactos son una combinación de dos semimoléculas de anticuerpo (cada una de una cadena de inmunoglobulina H y L), representando cada una especificidad y, al igual que los anticuerpos normales, tiene además una porción Fc que realiza las funciones efectoras bien conocidas. Preferentemente, se preparan mediante tecnología de quadromas. Este procedimiento de preparación se describe de manera representativa en el documento DE4419399.

50

[0087] Los expertos en la materia conocen los procedimientos para producir anticuerpos policlonales y monoclonales, y hay muchos anticuerpos disponibles. Véase, por ejemplo, Coligan, Current Protocols in Immunology Wiley/Greene, NY, 1991; y Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Guide Manual, Cold Spring Harbor Press, NY, 1989; Stites y col., (Eds.) Basic and Clinical Immunology (4ª ed.) Lange Medical Publications, Los Altos, CA, y las referencias citadas en el mismo; Goding Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (2ª ed.) Academic Press, Nueva York, NY 1986; y Köhler y Milstein, Nature 256: 495-497, 1975. Otras técnicas adecuadas para la preparación de anticuerpos incluyen la selección de bibliotecas de anticuerpos recombinantes en fagos o vectores similares. Véase, Huse y col., Science 246:1275-1281, 1989; y Ward y col., Nature 341:544-546, 1989. Anticuerpos monoclonales y

55

60

policlonales "específicos" y antisueros (antisuero) se unirán con una KD de al menos aproximadamente 0,1µM, preferentemente de al menos aproximadamente 0,01 µM o más, y lo más típico y preferente de aproximadamente 0,001 µM o más.

5 **[0088]** Las inmunoglobulinas y determinadas variantes de las mismas son conocidas y muchas se han preparado en cultivos de células recombinantes (por ejemplo, véase la patente de los Estados Unidos n.º 4.745.055; la patente de los Estados Unidos n.º 4.444.487; el documento WO 88/03565; el documento EP 256.654; el documento EP 120.694; el documento EP 125.023; Faulkner y col., Nature 298:286, 1982; Morrison, J. Immunol. 123:793, 1979; Morrison y col., Ann. Rev. Immunol. 2:239, 1984). Los procedimientos detallados para la preparación de anticuerpos
10 quiméricos (humanizados) se pueden encontrar en la patente de los Estados Unidos 5.482.856. Los detalles adicionales sobre la humanización y otras técnicas de producción de anticuerpos e ingeniería se pueden encontrar en Borrebaeck (ed.), Antibody Engineering, 2^a Edition Freeman and Company, NY, 1995; McCafferty y col., Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL en Oxford Press, Oxford, Inglaterra, 1996, y Paul Antibody Engineering Protocols Humana Press, Towata, NJ, 1995.

15 **[0089]** También se pueden emplear otros procedimientos de preparación siempre que den como resultado los anticuerpos biespecíficos trifuncionales intactos definidos anteriormente.

Preparaciones farmacéuticas

20 **[0090]** La preparación farmacéutica que contiene uno o más del antígeno diana y los anticuerpos trifuncionales se puede administrar por vía oral en cualquier forma de dosificación aceptable, como cápsulas, comprimidos, suspensiones acuosas, soluciones o similares. La preparación también se puede administrar por vía parenteral. Esto es a través de las siguientes vías de administración: inyección subcutánea, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular,
25 intraarticular, intrasinoval, intraesternal, intranasal, tópica, intratecal, intrahepática, intratumoral, intralesional e intracraneal o técnicas de infusión. En general, las preparaciones se proporcionarán como una inyección o infusión intravenosa.

[0091] Los anticuerpos y el(los) antígeno(s) objetivo pueden administrarse solos o preferentemente con un
30 portador farmacéuticamente aceptable, que incluye adyuvantes, vehículos y excipientes aceptables. Todos estos son familiares para los expertos en la materia. Se prefiere, por ejemplo, solución salina fisiológicamente aceptable.

[0092] La dosis efectiva dependerá de una diversidad de factores y está bien dentro del ámbito de un médico experto ajustar la dosis para un paciente determinado de acuerdo con diversos parámetros, como el peso corporal, el
35 objetivo del tratamiento, la dosis más alta tolerada, la formulación específica usada, la vía de administración, la respuesta del paciente y similares.

[0093] Los actr empleados de acuerdo con la presente invención se administran preferentemente en una cantidad de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 µg, se prefieren adicionalmente aproximadamente 2 a
40 aproximadamente 8 µg, aproximadamente 3 a aproximadamente 7 µg, o de 1 a aproximadamente 5 µg, cada uno por administración. Las cantidades óptimas pueden ser determinadas por el experto en la materia por medio de experimentación.

[0094] El antígeno diana se aplica en una cantidad de aproximadamente 0,1 a 500 µg, adicionalmente
45 opcionalmente en una cantidad de aproximadamente 0,1 a 400 µg, de aproximadamente 0,1 a 300 µg, de aproximadamente 0,1 a 200 µg, de aproximadamente 0,1 a 100 µg, de aproximadamente 0,1 a 50 µg, de aproximadamente 0,1 a 10 µg, o aproximadamente 0,1 a 1 µg.

[0095] El médico puede seleccionar el número de administraciones de la preparación farmacéutica de la
50 invención de acuerdo con la necesidad del paciente, particularmente la gravedad de la enfermedad, la respuesta del paciente, la dosis aplicada y otros diversos factores conocidos en la técnica. Opcionalmente dicha administración se repite dos o tres veces.

[0096] Dicha composición farmacéutica puede estar en forma de un kit de partes en el que dicho antígeno
55 diana, dichos otros antígenos adicionales y dicho anticuerpo se incluyen en al menos dos recipientes espacialmente distintos y se administran por separado, o en el que dicho anticuerpo está contenido en un recipiente separado y se administra por separado del antígeno diana y el uno o más antígenos adicionales.

[0097] El portador usado en las composiciones farmacéuticas de la invención se puede seleccionar de entre:

60 • PSV (por ejemplo, vacunas contra el VHB: Engerix-B, Twinrix; vacunas contra el VPH: Gardasil, Cervarix)

- PSV quiméricas con antígenos proteicos unidos covalentemente o asociados como los descritos por

Michel y col., Vaccine 2007: epítomos HIV-1-CTL epitopes inserted in HBV-VLPs (HBsAg); o

- Reichel y col., Current Nanoscience 2006: Polyoma VLPs with associated/packaged target antigens as antigen delivery vehicles; or Jennings y Bachmann, Biol. Chem. 2008 y Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2009: VLPs (e.g., QB-bacteriophages) associated with CpG (Toll-like receptor 9 agonist) and/or crosslinked epitopes or antigens for immune intervention.

- La vacuna contra la malaria RTS, S candidata es una proteína recombinante que fusiona una parte de la proteína circumsporozoite de *P. falciparum* con el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B. Combinada con un sistema adyuvante GSK patentado, RTS, S induce la producción de anticuerpos y células T que se cree que disminuyen la capacidad del parásito de la malaria para infectar, desarrollar y sobrevivir en el hígado humano. (Hoja de datos de RTSS de GSK-Fact (GSK, comunicado de prensa, 2010)).

- antígenos de proteína única

Vantomme y col., J. Immunother. 2004: MAGE-3 combined with AS02B adjuvant for therapeutic vaccination of patients with solid metastatic MAGE-3 positive tumors.

- polipéptidos multi-antígeno

Bull y col., PlosOne 2007:

- A vaccine comprising a fusion construct designated HAV containing components of two secreted and two cell surface Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis proteins was developed. HAV was transformed into DNA, human Adenovirus 5 (Ad5) and Modified Vaccinia Ankara (MVA) delivery vectors.

- proteínas de fusión heterólogas

- Olsen y col., Infect. Immun. 2001, 2004; Langermans y col., Vaccine 2005: The fusion protein antigen Ag85B-ESAT6 of Mycobacterium tuberculosis is a highly efficient vaccine against tuberculosis.

Ejemplo 1

- [0098]** Como antígeno portador único para fines de inmunización con anticuerpos activadores anti-CD3 trifuncionales, se seleccionó la proteína EpCAM humana (Strnad y col., 1989). Basándose en los datos de publicación descritos anteriormente, diferentes entidades de proteínas unidas covalentemente o proteínas de fusión se comportan como una unidad [portador más antígeno(s) huésped(es)] con resultados de inmunización comparables. En otras palabras, si en un experimento de inmunización dado, EpCAM será inmunogénico en términos de inducir respuestas inmunitarias humores y mediadas por células, entonces al mismo tiempo, un antígeno de elección conjugado o fusionado con EpCAM provocaría efectos inmunológicos similares. A nivel molecular y celular, esta reactividad similar hacia diferentes especies de proteínas se refleja simplemente por la estructura agregada originada a partir de entidades proteicas unidas covalentemente o asociadas que se fagocita, se procesa y presenta a las células T a través de una única CPA en el contexto de un determinado entorno inmunoestimulador. A diferencia de las proteínas enlazadas, es más improbable que las proteínas individuales no conjugadas se procesen y se presenten por la misma CPA, por lo que nuevamente puede subrayar el carácter innovador de esta invención. Solo la activación de anti-CD3 y el acoplamiento del receptor Fc-gamma activador por medio de anticuerpos biespecíficos o trispecíficos trifuncionales pueden crear dichos estímulos localmente limitados ("huella inmunoestimuladora") que hace que la totalidad de las respuestas inmunitarias sea comparable entre 2 proteínas diferentes unidas covalentemente o asociadas en términos de previsibilidad, inicio, duración y fuerza.

- [0099]** En resumen, para estudiar las respuestas inmunitarias humores suscitadas contra el antígeno de la proteína EpCAM humana recombinante, se inmunizaron por vía subcutánea (sc) tres ratones BALB/c hembra por grupo como se describe en la **Tabla I**. Además, para evaluar el título de anticuerpos anti-EpCAM se tomaron muestras de sangre adecuadas en los momentos indicados y los títulos de anticuerpos anti-EpCAM se determinaron como se describe en este documento. El grupo B solo mostró títulos de anticuerpos anti-EpCAM de ratón notablemente mejorados en los días 61 y 105, mientras que todos los demás grupos de inmunización generalmente no indujeron respuestas de anticuerpos anti-EpCAM (**Figura 2**). Este hecho es especialmente importante para el grupo D con la cantidad de EpCAM idéntica en comparación con la configuración del grupo B.

- [0100]** El procedimiento ELISA usado en los presentes ejemplos se realizó de la siguiente manera.

[0101] Siguiendo el cronograma, los sueros de ratones inmunizados se recogieron y se mantuvieron a -20 °C. Para realizar ELISA de anticuerpo anti-EpCAM de ratón, se recubrieron placas de 96 pocillos (Greiner, Alemania) a 4 °C durante la noche con 1 µg/ml de EpCAM IMAC recombinante en PBS (lote del 13 de noviembre de 2008, c = 1,1 mg/ml). Posteriormente, las placas se bloquearon a temperatura ambiente durante 1 h con ASB al 4 % en PBS. Cada muestra de suero de cada ratón por grupo se diluyó 1:30 y luego se diluyó en serie 1/2 8 veces en tampón de dilución cruzada baja (Candor Bioscience GmbH, Alemania). Como control positivo se usó el anticuerpo anti-EpCAM HO-3 (Ruf y col., Br J Cancer 97 (3):315, 2007). Después de 1 h de incubación a temperatura ambiente, las muestras se lavaron tres veces con tampón Tris/HCl (pH 7,9-8,19). Como anticuerpos de detección secundaria, se usaron los siguientes anticuerpos biotinilados en volúmenes equivalentes y se diluyeron a 1:5.000 en tampón de dilución cruzada: (i) IgG2a antiratón de rata (ATCC n.º HB-90), (ii) IgG1/IgG2a/IgG2b/IgG3 antiratón de rata (ATCC n.º HB-128) y (iii) IgG1 antiratón de rata (obtenido del Dr. E. Kremmer, Helmholtz-Zentrum Munich, Alemania). Posteriormente, después de 1 h de incubación a temperatura ambiente, las placas se lavaron de nuevo tres veces con tampón Tris/HCl (pH 7,9-8,1) y el conjugado de estreptavidina/3-galactosidasa (comprado en Roche Diagnostics, Alemania) diluido a 1:2.500 en tampón de dilución cruzada baja se añadió a las muestras. Después de 30-60 minutos de incubación y tres etapas de lavado posteriores con tampón Tris/HCl (pH 7,9-8,1), se determinó la DO a 570 nm (DO570) con un lector VersaMax ELISA (Molecular Devices, EE. UU.).

Tabla I. Programa de inmunización contra los efectos adyuvantes de los anticuerpos trifuncionales (Experimento 1)

Grupo (n)	Programa de inmunización	Muestras de sangre
A (3)	0,4 µg BiLu ¹ + 0,1 µg EpCAM ² /100 µl PBS sc el día 0, 21, 49 y 98	50 µl (1 parte alícuota, -80 °C) el día 7, 28, 61 y 105
B (3)	2 µg BiLu + 0,5 µg EpCAM/100 µl PBS sc el día 0, 21, 49 y 98	50 µl (1 parte alícuota, -80 °C) el día 7, 28, 61 y 105
C (3)	0,1 µg EpCAM/100 µl PBS sc el día 0, 21, 49 y 98	50 µl (1 parte alícuota, -80 °C) el día 7, 28, 61 y 105
D (3)	0,5 µg EpCAM/100 µl PBS sc el día 0, 21, 49 y 98	50 µl (1 parte alícuota, -80 °C) el día 7, 28, 61 y 105
¹ BiLu: Lote KA 150208 (EpCAM antihumano x CD3 antimurino); ² EpCAM humana recombinante (lote: EpCAM IMAC del 13 de noviembre de 2008; 1,1 mg/ml. Abreviatura: sc, por vía subcutánea.		

Ejemplo 2

[0102] En resumen, para estudiar las respuestas inmunitarias humores suscitadas contra el antígeno de la proteína EpCAM humana recombinante en un análisis comparativo (anticuerpo trifuncional anti-EpCAM x anti-CD3 BiLu vs. Alhydrogel, un adyuvante convencional), se inmunizaron sc 10 ratones BALB/c hembra por grupo como se indica en la **Tabla II**. Cabe destacar que la compra de Alhydrogel de Sigma es una suspensión de gel húmedo de hidróxido de aluminio esterilizado que se ha probado sin pirogenicidad. Para evaluar el título de anticuerpos anti-EpCAM del ratón, se tomaron muestras de sangre adecuadas en los momentos indicados y los títulos de anticuerpos anti-EpCAM del ratón se determinaron como se describe anteriormente en el capítulo de "Procedimientos".

Tabla II. Programa de inmunización contra los efectos adyuvantes de los anticuerpos trifuncionales (Experimento 2)

Grupo (número de ratones)	Programa de inmunización	Muestras de sangre
A (n=10)	0,5 µg EpCAM/200 µl PBS sc el día 0, 7, 28, 56	100 µl (2 partes alícuotas, -80 °C) el día 5, 26, 54 y 68
B (n=10)	0,5 µg EpCAM + 2 µg BiLu¹/200 µl PBS sc el día 0, 7, 28, 56	100 µl (2 partes alícuotas, -80 °C) el día 5, 26, 54 y 68
C (n=10)	0,5 µg EpCAM + 20 µl ³Alhydrogel/200 µl PBS sc el día 0, 7, 28, 56	100 µl (2 partes alícuotas, -80 °C) el día 5, 26, 54 y 68
D (n=10)	2 µg BiLu/200 µl PBS sc el día 0, 7, 28, 56	100 µl (2 partes alícuotas, -80 °C) el día 5, 26, 54 y 68
¹ BiLu: Lote KA 150208 (EpCAM antihumano x CD3 antimurino); ² EpCAM humana recombinante (lote: EpCAM IMAC del 13 de noviembre de 2008; 1,1 mg/ml); ³ Alhydrogel (Sigma A8222-250 ml; almacenado a -80 °C); Abreviatura: sc, por vía subcutánea.		

[0103] Para evaluar los títulos de anticuerpos específicos de EpCAM respectivos, se tomaron muestras de sangre adecuadas en los momentos indicados y los títulos de anticuerpos se determinaron por medio de lectura de ELISA como se describe brevemente en el capítulo de "Procedimientos". Los resultados de la inmunización en términos de respuestas inmunitarias humorales anti-EpCAM (mediana de los títulos de anticuerpos presentados en la **Tabla III.**) se pueden resumir de la siguiente manera:

- 10 Solo el grupo de inmunización B mostró títulos de anticuerpos anti-EpCAM de ratón notablemente mejorados en los días 54 y 68, mientras que los grupos de inmunización A y D generalmente no indujeron respuestas de anticuerpos anti-EpCAM (**Tabla III**). Curiosamente, el programa de inmunización con la formulación de antígeno convencional, EpCAM recombinante más Alhydrogel adyuvante (grupo C), realizado en dosis de antígeno EpCAM idénticas al grupo B, condujo solo a títulos bajos de anticuerpos anti-EpCAM de ratón el día 68 después de la inmunización. Por lo tanto,
- 15 la formulación de anticuerpos trifuncionales (es decir, anti-EpCAM x anti-CD3, BiLu) junto con el antígeno diana (EpCAM) es muy superior a las formulaciones de antígenos convencionales en dosis equivalentes usando, por ejemplo, Alhydrogel (sal de aluminio) como adyuvante.

Tabla III. Títulos de anticuerpos anti-EpCAM de ratón inducidos por diferentes formulaciones de EpCAM recombinantes, incluido el anticuerpo anti-EpCAM x anti-CD3 BiLu oAlhydrogel

Grupo (número de ratones)	Programa de inmunización	Títulos antiEpCAM de ratón (mediana)
A (n=10)	0,5 µg EpCAM/200 µl PBS sc el día 0, 7, 28, 56	Día 54: 30 Día 68: 30
B (n=10)	0,5 µg EpCAM + 2 µg BiLu¹/200 µl PBS sc el día 0, 7, 28, 56	Día 5: 30 Día 26: 90 Día 54: 15,360 Día 68: 61,440
C (n=10)	0,5 µg EpCAM + 20 µl ³Alhydrogel/200 µl PBS sc el día 0, 7, 28, 56	Día 5: 30 Día 26: 30 Día 54: 30 Día 68: 300
D (n=10)	2 µg BiLu/200 µl PBS sc el día 0, 7, 28, 56	Día 5: 30 Día 26: 30 Día 54: 30 Día 68: 30
¹ BiLu: Lote KA 150208 (EpCAM antihumano x CD3 antimurino); ² EpCAM humana recombinante (lote: EpCAM IMAC del 13 de noviembre de 2008; 1,1 mg/ml); ³ Alhydrogel (Sigma A8222-250 ml; almacenado a -80 °C); Abreviatura: sc, por vía subcutánea.		

Ejemplo 3

- [0104]** Para evaluar, además de las respuestas inmunitarias humorales también las mediadas por células, se realizó el siguiente estudio experimental en ratones. Para el análisis comparativo de diferentes mezclas de inmunización, se inmunizaron sc ocho ratones BALB/c hembra contra la proteína EpCAM y se extrajeron muestras de sangre como se describe en la **Tabla IV** y la **Figura 3**. El día 32, los grupos experimentales se separaron: cinco ratones por grupo se desafiaron con células de tumor CT26 transfectadas con EpCAM para evaluar la protección del tumor inducida por inmunización *in vivo*. Los tres animales residuales por grupo se sacrificaron el día 33 por preparaciones

de células de bazo y ganglios linfáticos para analizar las respuestas inmunitarias celulares específicas de EpCAM *in vitro*.

Tabla IV. Programa de inmunización para inducir los efectos adyuvantes de los anticuerpos trispecíficos (Ejemplo 3)

Grupo (n)	Programa de inmunización	Muestras de sangre
A (8)	0,5 µg EpCAM ² /200 µl PBS sc los días 0 y 21	100 µl (1 parte alícuota, -80 °C) los días 7, 14, 28 y 42
B (8)	0,5 µg EpCAM + 2 µg BiLu ¹ /200 µl PBS sc los días 0 y 21	100 µl (1 parte alícuota, -80 °C) los días 7, 14, 28 y 42
C (8)	0,5 µg PSV-EpCAM ³ /200 µl PBS sc los días 0 y 21	100 µl (1 parte alícuota, -80 °C) los días 7, 14, 28 y 42
D (8)	0,5 µg PSV-EpCAM ³ + 2 µg BiLu ¹ /200 µl PBS sc los días 0 y 21	100 µl (1 parte alícuota, -80 °C) los días 7, 14, 28 y 42
E (8)	0,5 µg PSV ⁴ + 2 µg BiLu/200 µl PBS sc los días 0 y 21	100 µl (2 partes alícuotas, -80 °C) los días 12, 26, 54 y 68

¹ EpCAM antihumano x CD3 antimurino BiLu: Lote KA 150208; ²EpCAM humana recombinante (Lote: EpCAM IMAC de 13 de noviembre de 2008; 1,1 mg/ml); ³proteínaEpCAM conjugada con partículas similares a virus (PSV, TRION Research, lote 12.08.11, divididas en alícuotas y almacenadas en glicerol al 50 % a -20 °C); ⁴ partículas similares a virus de la proteína VP1 del virus del polinoma murino (Universidad de Vilnius, Instituto de biotecnología, Vilnius, Lituania, partes alícuotas y almacenadas en glicerol al 50 % a -20 °C); (Abbing y col., Virology 279: 27410, 2004; Gedvilaitė y col., Virology 354: 252, 2006)

1. Evaluación de las respuestas inmunitarias humores:

[0105] Para evaluar los títulos de anticuerpos específicos de EpCAM y PSV, se tomaron muestras de sangre adecuadas en los momentos indicados y los títulos de anticuerpos adecuados se determinaron por medio de ELISA. Los títulos anti-EpCAM se midieron como se describe en el ejemplo I. Para la determinación de los títulos anti-PSV, se modificó el ELISA mediante el recubrimiento de 1µg/ml de PSV recombinante en lugar de la proteína EpCAM recombinante. Como control positivo, se usó 1µg/ml de anticuerpo específico anti-VP1 murino (Abeam, # Ab34755).

[0106] Los resultados de la inmunización en términos de respuestas inmunitarias humores se pueden resumir de la siguiente manera (**Tabla V**):

I. Respuesta anti-EpCam:

[0107] Los títulos más altos se observaron en el grupo B que comenzó el día 28 y alcanzó su punto máximo el día 42, 10 días después del desafío con células de tumor CT26 transfectadas con EpCAM. Los títulos intermedios se midieron para los grupos C y D, los títulos más bajos para los grupos A y E. Por lo tanto, la formulación de anticuerpo trifuncional junto con el antígeno soluble EpCAM (grupo B) fue más eficiente en la generación de una respuesta inmunitaria humoral.

II. Respuesta anti-PSV:

[0108] Los anticuerpos específicos de PSV se pudieron detectar en todos los grupos que se inmunizaron con preparaciones de PSV. La respuesta inmunitaria humoral comenzó temprano en el día 7, aumentó aún más en el día 14 y finalmente alcanzó su punto máximo en el día 28, una semana después de la inmunización con refuerzo sc. Los títulos altos de anticuerpos fueron inducidos tanto por PSV como por las preparaciones de conjugado PSV-EpCAM. Curiosamente, la adición del anticuerpo BiLu aumentó significativamente la producción de títulos de 5 a 8 veces en la mediana en los días 14 y 28, respectivamente. Por lo tanto, el anticuerpo trifuncional BiLu no solo fomentó la producción de anticuerpos contra el antígeno diana EpCAM, sino también contra las proteínas PSV conjugadas.

Tabla V. Títulos de anticuerpos anti-EpCAM/PSV de ratón inducidos por diferentes formulaciones de EpCAM recombinantes, que incluyen el anticuerpo anti-EpCAM x anti-CD3 BiLu y PSV

Grupo (número de ratones)	Programa de inmunización	Títulos anti-EpCAM (mediana)	Títulos anti-PSV (mediana)
A (8: días 7, 14, 28, 5: día 42)	0,5 µg EpCAM ² /200 µl PBS sc los días 0 y 21	Día 14: 30 Día 28: 30 Día 42: 480	-
B	0,5 µg EpCAM ² + 2 µg BiLu ¹ /200 µl	Día 14: 30	

(8: días 7, 14, 28, 5: día 42)	PBS sc los días 0 y 21	Día 28: 30 Día 42: 61,440	-
C (8: días 7, 14, 28, 5: día 42)	0,5 µg PSV-EpCAM ³ /200 µl PBS sc los días 0 y 21	Día 14: 30 Día 28: 30 Día 42: 3,840	Día 7: 60 Día 14: 11,520 Día 28: 184,320
D (8: días 7, 14, 28, 5: día 42)	0,5 µg PSV-EpCAM ³ + 2 µg BiLu¹ /200 µl PBS sc los días 0 y 21	Día 14: 30 Día 28: 30 Día 42: 7,680	Día 7: 90 Día 14: 61,440 Día 28: 1,474560
E (8: días 7, 14, 28, 5: día 42)	0,5 µg PSV ⁴ + 2 µg BiLu /200 µl PBS sc los días 0 y 21	Día 14: 30 Día 28: 30 Día 42: 120	-

2. Evaluación de las respuestas inmunitarias celulares:

[0109] Para el análisis de las respuestas inmunitarias celulares específicas de EpCAM, se sacrificaron 3 ratones por grupo el día 33, 11 días después de la inmunización con refuerzo. Como control adicional se incluyeron ratones no tratados previamente y no inmunizados: las células del bazo y del nódulo linfático (NL) inguinal y mesenterial se prepararon y reestimularon durante 7 días ya sea con 1 µg/ml de proteína EpCAM recombinante (TRION Research, lote: EpCAM IMAC del 13 de noviembre de 2008; 1,1 mg/ml) o con 10 µg/ml del péptido derivado de EpCAM 225 (metabion, secuencia de aminoácidos: LHF SKK MDL). Por lo tanto, se usaron 7,5 x 10⁶ células del bazo irradiadas (30 Gy) de un ratón Balb/c donante no tratado previamente como células presentadoras de antígeno (CPA) y se cargaron durante la noche con la proteína EpCAM. Posteriormente, se añadieron 7,5 x 10⁶ células de preparaciones celulares de ratones inmunizados. Como alternativa, las CPA se cargaron con el péptido EpCAM 225 una hora antes de la adición de las preparaciones celulares. Todos los enfoques se realizaron en placas de 24 pocillos con 15 x 10⁶ células por pocillo, se suspendieron en medio de reestimulación compuesto por medio RPMI complementado con suero de ternera fetal al 10 %, tampón HEPES 10 mM, L-glutamina 2 mM, 1x penicilina/estreptomicina, β-mercaptoetanol 50 µM, y 60 unidades/ml de IL-2 de ratón recombinante (Miltenyi Biotech, # 130-094-055). Las células se incubaron a continuación a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 7 días y finalmente se recogieron de los pocillos, se lavaron una vez con el medio descrito anteriormente, se contaron y se usaron para ensayos ELISPOT IFN-g y de tinción intracelular de IFN-g.

[0110] Para la tinción de IFN-g intracelular se incubaron 10⁶ células/96 pocillos durante 4 horas en medio de reestimulación suplementado con 1 µg/ml de PMA, 1 µg/ml de ionomicina y 1 x brefeldina A (200 µl de volumen final) para la estimulación y acumulación de IFN-g intracelular. A continuación, las células se lavaron y se tiñeron en la superficie con anticuerpos anti CD3, CD4 y CD8 (Becton Dickinson) de ratón conjugados con PE (Becton Dickinson), se lavaron y se fijaron con tampón de fijación IC (eBioscience, # 00-8222-49), se lavaron nuevamente y se trataron dos veces con tampón de permeabilización (eBioscience, # 00-8333-56). Las células se tiñeron luego intracelularmente con el anticuerpo IFN-g antirratón conjugado con CPA (Biozol Diagnostic, # BLD-505810) o con el control del isotipo IgG1/kappa de rata conjugado con CPA (Biozol Diagnostic, # BLD-400412), se lavaron y se volvieron a suspender en tampón FACS (PBS, SFB al 0,1 %). Se tiñeron 10⁶ células por muestra y se midieron con un citómetro de flujo FACS Calibur (Becton Dickinson).

[0111] Para el ensayo IFN-g ELISPOT, las células reestimuladas con la proteína EpCAM o el péptido 225 de EpCAM se transfirieron a una placa IFN-g ELISPOT de 96 pocillos (Becton Dickinson, kit IFN-g de ratón ELISPOT # 552569) y se incubaron durante 20-22 horas a 37 °C y 5 % de CO₂. Se analizaron 100.000 células por pocillo y cada muestra se midió por cuadruplicado. Las placas ELISPOT se desarrollaron de acuerdo con las recomendaciones de los fabricantes. La adquisición de manchas de IFN-g fue realizada por CTL Europe GmbH aplicando el software ImmunoSpot 5.0.40.

[0112] Como se muestra en la **Figura 4**, hubo un aumento significativo en la producción de manchas IFN-g en ratones inmunizados con EpCAM (grupo A), EpCAM + BiLu (grupo B) o PSV-EpCAM + BiLu (grupo D) en comparación con los ratones de control no tratados previamente. Los valores medios de las manchas aumentaron de 4,75 (control) a 27,75 (A), a 39 (B) y a 32,5 (D). Cabe destacar que la diferencia entre el grupo C (PSV-EpCAM) y D (PSV-EpCAM + BiLu) también fue estadísticamente significativa (12,75 versus 32,5, ensayo t de dos colas para muestras no relacionadas, p < 0,0023). Esto demuestra que la adición del anticuerpo trifuncional BiLu a la preparación del antígeno PSV-EpCAM aumentó significativamente la respuesta inmunitaria celular inducida contra el antígeno EpCAM medida por IFN-g ELISPOT.

[0113] Como lo muestra el análisis de FACS intracelular (**Figuras 5 A + B**), las células T positivas para CD8 produjeron IFN-g, mientras que las células T positivas para CD4 contribuyeron en mucho menor grado. Esto indica

que se generaron linfocitos T citotóxicos (CTL) dirigidos contra la proteína EpCAM y que su número aumentó en ratones vacunados con el anticuerpo trifuncional BiLu en combinación con la proteína EpCAM. Con el fin de evaluar la especificidad de antígeno exacta de la respuesta CTL, se realizó un ensayo IFN- γ ELISPOT con células inmunes reestimuladas con el péptido 225 derivado de EpCAM. Este péptido noámero con la secuencia de aminoácidos LFH SKK MDL fue elegido como un supuesto epítipo CTL específico de EpCAM humano para la unión de MHC de clase I murino. Un análisis de búsqueda con un software de predicción de epítopos (<http://www.svfpeithi.de/Scripts/MHCServer.dll/EpitopePrediction.htm>) dio como resultado una buena puntuación de 20 para la unión del péptido 225 con el haplotipo MHC de clase I H2-K^d. Curiosamente, la secuencia peptídica difiere en cuatro aminoácidos (44 %) del péptido EpCAM de ratón homólogo. Por lo tanto, el péptido 225 debe ser reconocido como extraño por el sistema inmune del ratón que evita la inducción de tolerancia.

[0114] De hecho, como se muestra en la **Figura 6**, se midió un aumento significativo de la producción de IFN- γ para el grupo de inmunización D que recibió el anticuerpo PSV-EpCAM más el anticuerpo BiLu. El número medio de manchas en comparación con el grupo de control C (PSV-EpCAM sin BiLu) y el control no tratado previamente fue de 15,25 frente a 4, respectivamente 5 (ensayo t de dos colas para muestras no relacionadas, $p = 0,0089$). Esto demuestra que el uso del anticuerpo BiLu en combinación con conjugados PSV-EpCAM fomentó el desarrollo de CTL específicos para el péptido 225 derivado de EpCAM.

3. Evaluación de la protección del tumor in vivo:

[0115] Para evaluar si las respuestas inmunitarias humorales y celulares inducidas condujeron a la protección del tumor contra células de adenocarcinoma de ratón CT26 que expresan EpCAM (CT26-EpCAM), se desafiaron cinco ratones por grupo de inmunización por vía intraperitoneal (ip) el día 32 con una dosis letal de 5×10^5 células tumorales. Como se representa en la **Figura 7A-C**, los ratones que recibieron el anticuerpo BiLu además de la preparación de la vacuna proteica EpCAM tuvieron una supervivencia prolongada significativa en comparación con los grupos de control respectivos sin el anticuerpo BiLu. En ambas configuraciones de inmunización, ya sea con la proteína EpCAM soluble o con la proteína EpCAM conjugada con PSV, la adición del anticuerpo trifuncional BiLu dio como resultado una mayor protección contra las células tumorales que expresan EpCAM. Cabe destacar que la supervivencia de los ratones se correlacionó directamente con los resultados del ensayo ELISPOT específico de IFN- γ para monitorizar las células T CD8 específicas para EpCAM restringidas por MHC de clase I (Figura 4). Estos resultados subrayan la importancia destacada de las respuestas inmunitarias mediadas por células para la defensa del tumor.

4. Conclusiones

[0116] Los hallazgos experimentales del **Ejemplo 3** respaldan claramente la prominente capacidad adyuvante de los anticuerpos trifuncionales en términos de inducción de inmunidad humoral y mediada por células. Tomados en conjunto, EpCAM soluble o EpCAM conjugado con las PSV y dirigidos por el anticuerpo trifuncional anti-EpCAM x CD3 antimurino BiLu a linfocitos T y células accesorias (como células dendríticas, macrófagos/monocitos o linfocitos B) conducen a

- (i) un aumento de más de 120 veces del título anti-EpCAM (**Tabla V**) en comparación con el grupo de control sin actr BiLu,
- (ii) un aumento de más de 6 veces de los anticuerpos anti-PSV (**Tabla V**) en comparación con el grupo de control sin actr BiLu (solo un aumento de 2 veces de los títulos de anticuerpos anti-EpCAM debido a la menor densidad de superficie de EpCAM en las PSV),
- (iii) un aumento específico de EpCAM de células T secretoras de IFN- γ (es decir, predominantemente células T CD8⁺) reestimuladas con proteína EpCAM recombinante en comparación con el control sin actr BiLu (**Figura 4** y **Figura 5A**),
- (iv) un aumento significativo de células T secretoras de IFN- γ específicas de EpCAM (es decir, predominantemente de células TCD8⁺) de ratones inmunizados con PSV-EpCAM/BiLu reestimulados con un péptido EpCAM restringido a MHC de clase I en comparación con el control sin actr BiLu (**Figura 6**),
- (v) diferencias significativas en la supervivencia entre los ratones inmunizados con EpCAM/BiLu y el grupo de control sin actr o entre los ratones inmunizados con PSV-EpCAM/BiLu y el grupo de control sin actr BiLu en el desafío tumoral CT26-EpCAM (**Figura 7A** y **7B**)

[0117] Se debe enfatizar que la concentración de EpCAM del conjugado PSV-EpCAM aplicada para la inmunización de ratones se redujo considerablemente en aproximadamente un 70 % en comparación con la formulación de la vacuna con proteína EpCAM recombinante sola. Cabe destacar que la formulación de la vacuna EpCAM/BiLu o PSV-EpCAM/BiLu pareció estimular predominantemente a las células T CD8⁺ mediante el uso de vías alternativas de procesamiento/presentación de antígeno MHC de clase I (**Figura 4** y **Figura 5A**), que eran diferentes de las vías de tráfico de antígenos de proteínas externas solubles dentro de las células presentadoras de antígenos.

Generalmente, estas proteínas externas fueron presentadas predominantemente por las moléculas MHC de clase I a las células T CD4⁺ que no fueron estimuladas por todas las formulaciones de vacunas usadas, especialmente no por los compuestos PSV-EpCAM/BiLu o EpCAM/BiLu que tienen potencial adyuvante.

- 5 [0118] Sin embargo, la falta de estimulación de células TCD4⁺ suscitadas por las inmunizaciones de control de EpCAM o PSV-EpCAM podría explicarse mejor por la baja cantidad de antígeno EpCAM usada para la vacunación de animales en ausencia de un adyuvante adecuado. Lo más importante es que la reestimulación *in vitro* de esplenocitos de ratones inmunizados con EpCAM/BiLu- o PSV-EpCAM/BiLu con proteína EpCAM recombinante activó predominantemente a las células TCD8⁺.

10

Referencias

[0119]

- 15 Dietrich, J. , C. Aagaard , R. Leah , A.W. Olsen , A. Stryhn , T.M. Doherty , and P. Andersen. 2005. Exchanging ESAT6 with TB10.4 in an Ag85B fusion molecule- based tuberculosis subunit vaccine: efficient protection and ESAT6-based sensitive monitoring of vaccine efficacy. J. Immunol. 174:6332.
Garcea, R.L, and L. Gissmann. 2004. Virus-like-particles as vaccines and vessels for the delivery of small molecules. Curr. Opin. Biotechnol. 15:513.
- 20 Glenn and O'Hagan. 2007. Adjuvants: progress, regress and pandemic preparedness. Expert Rev. Vaccines 6(5):651.
Jennings, G.T., and M.F. Bachmann. 2009. Immunodrugs: therapeutic VLP-based vaccines for chronic diseases. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 49: 303.
Jennings, G.T., and M.F. Bachmann. 2008. The coming of age of virus-like particle vaccines. Biol. Chem. 389:521
- 25 Langermans, J. A., T. M. Doherty, R. A. Vervenne, T. Laan, K. Lyashchenko, R. Greenwald, E. M. Agger, C. Aagaard, H. Weiler, D. Soolingen, et al. 2005. Protection of macaques against Mycobacterium tuberculosis infection by a subunit vaccine based on a fusion protein of antigen 85B and ESAT-6. Vaccine 23:2740.
- Michel M , Y.C. Lone , M. Centlivre , P. Roux , S. Wain-Hobson , and M. Sala. 2007. Optimisation of secretion of recombinant HBsAg virus-like particles: Impact on the development of HIV-1 /HBV bivalent vaccines. Vaccine 25:1901.
- 30 Olsen, A. W., A. Williams, L. M. Okkels, G. Hatch, and P. Andersen. 2004. Protective effect of a tuberculosis subunit vaccine based on a fusion of antigen 85B and ESAT- 6 in the aerosol guinea pig model. Infect. Immun. 72:6148.
- Olsen, A. W., L. A. van Pinxteren, L. M. Okkels, P. B. Rasmussen, and P. Andersen. 2001 . Protection of mice with a tuberculosis subunit vaccine based on a fusion protein of antigen 85b and esat-6. Infect. Immun. 69:2773.
- Reichel, C, Brinkman, M., Ruehland, C, Reiser, C.O.A. and J. Hess. 2006. Heterologous virus-like-particles: recombinant nanosystems as versatile antigen delivery devices for immune intervention. Current Nanoscience 2:295.
- 35 Ruf, P., and H. Lindhofer. 2001 . Induction of along-lasting antitumor immunity by a trifunctional bispecific antibody. Blood 98:2526.
- Snider, D. P., A. Kaubisch, and D. M. Segal. 1990. Enhanced antigen immunogenicity induced by bispecific antibodies. J. Exp. Med. 171:1957.
- Strnad, J., Hamilton A.E., Beavers L.S., Gamboa G.C., Apeltgren L.D., Taber L.D., Sportsman J.R., Bumol T.F., Sharp J.D., R.A. Gadski. 1989. Molecular cloning and characterization of a human adenocarcinoma/epithelial cell surface antigen complementary DNA. Cancer Res. 49:314.
- 40 Tissot, A.C., R. Renhofa, N. Schmitz, J. Cielens, and E. Meijerink, et al. 2010. Versatile virus-like particle carrier for epitope based vaccines. PLoS ONE 5: e9809.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende:

5 • una cantidad farmacéuticamente efectiva de un anticuerpo biespecífico y/o triespecífico trifuncional que tiene las siguientes propiedades:

(a) unión a una célula T a través de CD3 y activación de dicha célula T;

10 (b) unión a un antígeno diana aislado que está separado de su contexto natural, por ejemplo, una célula, un virus, una bacteria, un protozoo, o un hongo y que no está asociado o es parte de dicho contexto natural;

(c) unión a través de su porción Fc o por una tercera especificidad (en el caso de los anticuerpos triespecíficos) a células positivas para receptores Fc-γ de tipo I, II y/o III e inicio de la producción de citoquinas o la regulación positiva de señales coestimulantes o una combinación de los mismos y la activación por lo tanto de las células T;

15 (d) inicio de las respuestas de las células T sesgadas por TH1 acompañadas de interferón gamma y las respuestas inmunitarias humorales;

y

20 • una cantidad inmunológicamente efectiva de dicho antígeno diana aislado y opcionalmente uno o más antígenos adicionales aislados en una cantidad inmunológicamente efectiva, en la que dichos antígenos están presentes aislados de su contexto natural, por ejemplo, una célula, un virus, una bacteria, un protozoo o un hongo y que no está asociado o es parte de dicho contexto natural, y un portador farmacéuticamente aceptable,

25 para su uso en un procedimiento de inmunización de un sujeto mamífero que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad farmacéuticamente efectiva de dicha composición farmacéutica para suscitar una respuesta inmunitaria mediada por células o humoral o una combinación de las mismas contra dicho antígeno diana y dichos opcionalmente uno o más antígenos adicionales para inmunizar dicho sujeto mamífero de dicho uno o más antígenos.

30 2. La composición farmacéutica para su uso en un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho antígeno diana se selecciona de entre un grupo de antígenos asociados a enfermedades, preferentemente seleccionados de entre antígenos específicos de tumores, virus, bacterias, hongos, protozoos o un epítipo inmunológicamente activo del mismo, o en la que dicho antígeno diana es una proteína transportadora o un epítipo inmunológicamente activo de la misma.

35 3. La composición farmacéutica para su uso en un procedimiento de acuerdo con una o más de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho antígeno diana y/o uno o más de dichos otros antígenos adicionales están presentes en forma aislada, no conjugada, o dicho antígeno diana está conjugado o asociado con un portador o en la que dicho antígeno diana y dicho uno o más antígenos adicionales están asociados o conjugados entre sí directamente o a través de un portador, opcionalmente en la que dicho antígeno diana se presenta mediante una partícula similar a
40 un virus.

4. La composición farmacéutica para su uso en un procedimiento de acuerdo con una o más de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho anticuerpo trifuncional es un anticuerpo biespecífico de rata/ratón.

45 5. La composición farmacéutica para su uso en un procedimiento de acuerdo con una o más de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho anticuerpo biespecífico o triespecífico trifuncional es un anticuerpo anti-antígeno diana x anti-CD3 que se une a receptores Fcγ tipo I/II/III, en la que dicho anticuerpo biespecífico trifuncional tiene la combinación de isotipos IgG2b de rata/IgG2a de ratón.

50 6. La composición farmacéutica para su uso en un procedimiento de acuerdo con una o más de las reivindicaciones anteriores, en la que dichos anticuerpos biespecíficos o triespecíficos trifuncionales se administran en una cantidad de aproximadamente 1 a 10 µg, opcionalmente en la que dicha administración se repite dos o tres veces.

55 7. La composición farmacéutica para su uso en un procedimiento de acuerdo con una o más de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho antígeno diana se administra en una cantidad de aproximadamente 0,1-500 µg.

60 8. La composición farmacéutica para su uso en un procedimiento de acuerdo con una o más de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho antígeno diana es un antígeno asociado a la enfermedad seleccionado de entre uno o más miembros del grupo que consiste en antígenos asociados a tumores, antígenos fúngicos, antígenos

virales, antígenos de protozoos y bacterianos, y/o en la que dicho antígeno diana es un antígeno específico del portador pero no asociado a la enfermedad en la que el antígeno asociado a la enfermedad está conjugado o asociado con dicho portador, y/o en la que dicho antígeno diana no es un antígeno asociado a ninguna enfermedad conjugado o asociado con uno o más antígenos asociados a la enfermedad, y/o un epítipo inmunológicamente activo de cualquiera de dichos antígenos diana.

9. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente efectiva de un anticuerpo biespecífico y/o trispecífico trifuncional que tiene las siguientes propiedades:

- 10 (a) unión a una célula T a través de CD3 y activación de dicha célula T;
- (b) unión a un antígeno diana aislado que está separado de su contexto natural, por ejemplo, una célula, un virus, una bacteria, un protozoo, o un hongo y que no está asociado o es parte de dicho contexto natural;
- (c) unión a través de su porción Fc o por una tercera especificidad (en el caso de los anticuerpos trispecíficos) a células positivas para receptores Fc-γ de tipo I, II y/o III e inicio de la producción de citoquinas o la regulación positiva de señales coestimulantes o una combinación de los mismos y la activación por lo tanto de las células T;
- 15 (d) inicio de las respuestas de las células T sesgadas por TH1 acompañadas de interferón gamma y las respuestas inmunitarias humorales;

y

- 20 una cantidad inmunológicamente efectiva de dicho antígeno diana aislado y opcionalmente antígenos adicionales aislados que están aislados de su contexto natural, por ejemplo, una célula, un virus, una bacteria, un protozoo, o un hongo y que no está asociado o es parte de dicho contexto natural, y un portador farmacéuticamente aceptable.

- 25 10. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9, en la que dicho antígeno diana es un antígeno diana específico de la enfermedad seleccionado de entre el grupo que consiste en antígenos específicos de tumores, virus, bacterias, hongos y protozoos, o un epítipo inmunológicamente activo de los mismos, o en la que dicho antígeno diana es una proteína portadora o un epítipo inmunológicamente activo de la misma.

- 30 11. La composición farmacéutica de acuerdo con una o más de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición está en forma de una formulación de vacuna.

12. La composición farmacéutica de acuerdo con una o más de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición está en forma de un kit de partes en la que dicho antígeno diana, dichos otros antígenos adicionales

- 35 y dicho anticuerpo se incluyen en al menos dos recipientes espacialmente distintos y se administran por separado, o en la que dicho anticuerpo está contenido en un recipiente separado y se administra por separado del antígeno diana y dicho uno o más antígenos adicionales.

13. La composición farmacéutica de acuerdo con una o más de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho antígeno diana y/o uno o más de dichos otros antígenos adicionales están presentes en forma aislada, no conjugada, o dicho antígeno diana está conjugado o asociado a un portador o en la que dicho antígeno diana y dicho uno o más antígenos adicionales están asociados o conjugados entre sí directamente o a través de un portador, opcionalmente en la que dicho antígeno diana se presenta mediante una partícula similar a un virus.

- 45 14. La composición farmacéutica de acuerdo con una o más de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho antígeno diana es un antígeno específico del portador pero no asociado a la enfermedad en la que el antígeno asociado a la enfermedad está conjugado o asociado con dicho portador.

15. La composición farmacéutica de acuerdo con una o más de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho portador asociado con dicho antígeno diana tiene un diámetro medio de 10-500 nm, y/o en la que dicho anticuerpo biespecífico y/o trispecífico trifuncional está contenido en una cantidad de 1 a 10 µg, y/o en la que dicho antígeno diana está contenido en una cantidad de 0,1 a 500 µg.
- 50

Figura 1

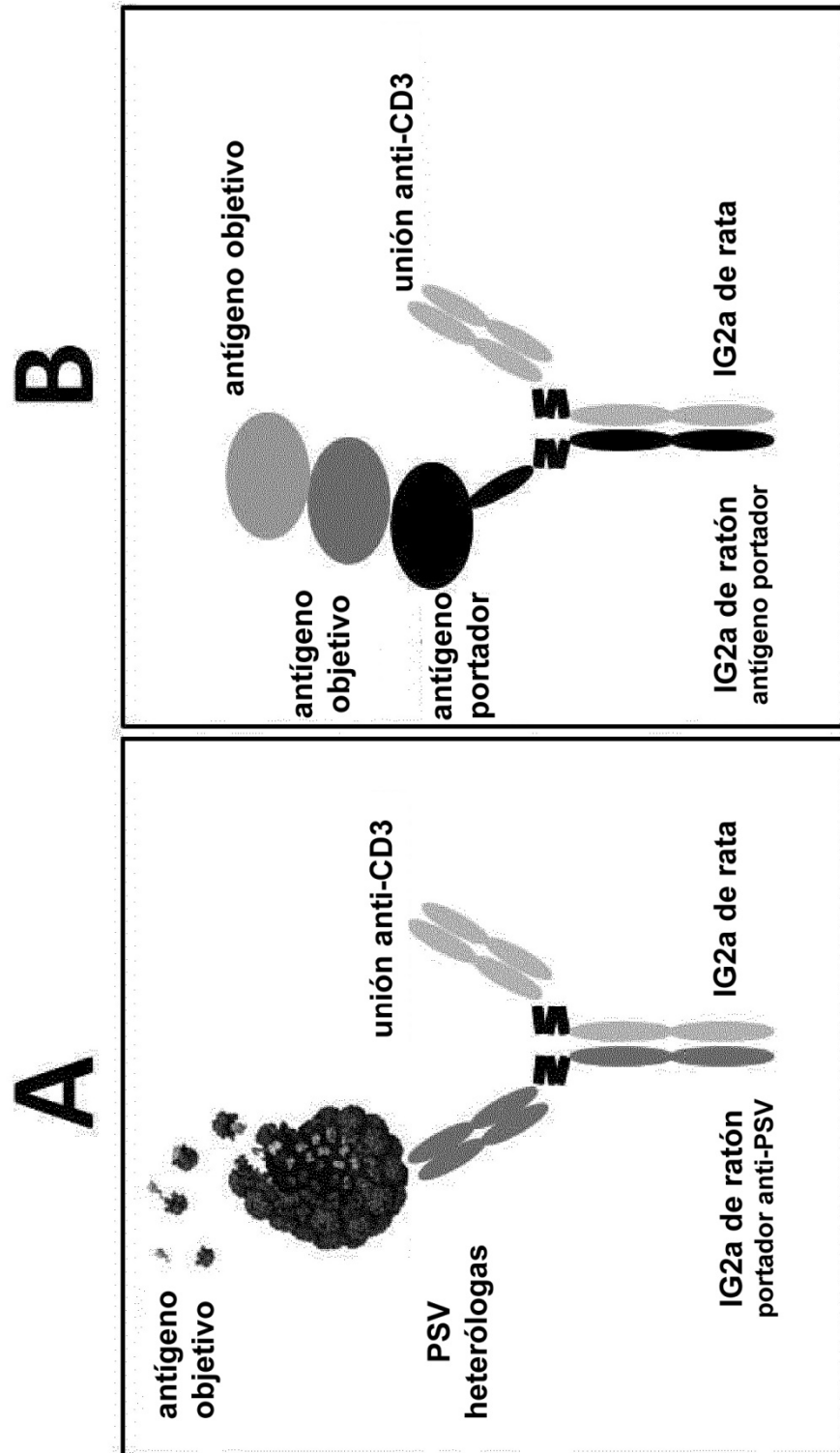


Figura 2

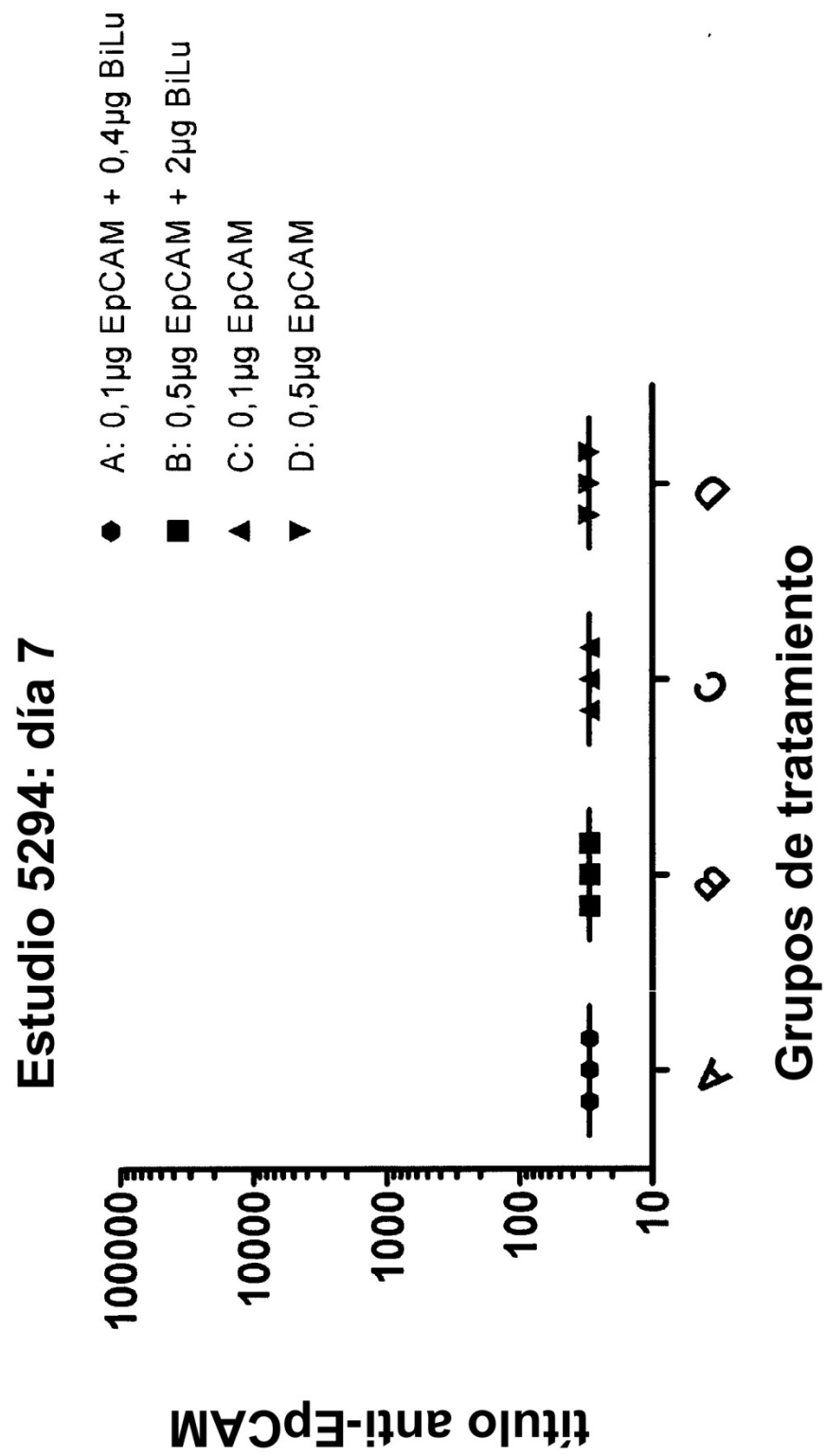


Figura 2 (Cont.)

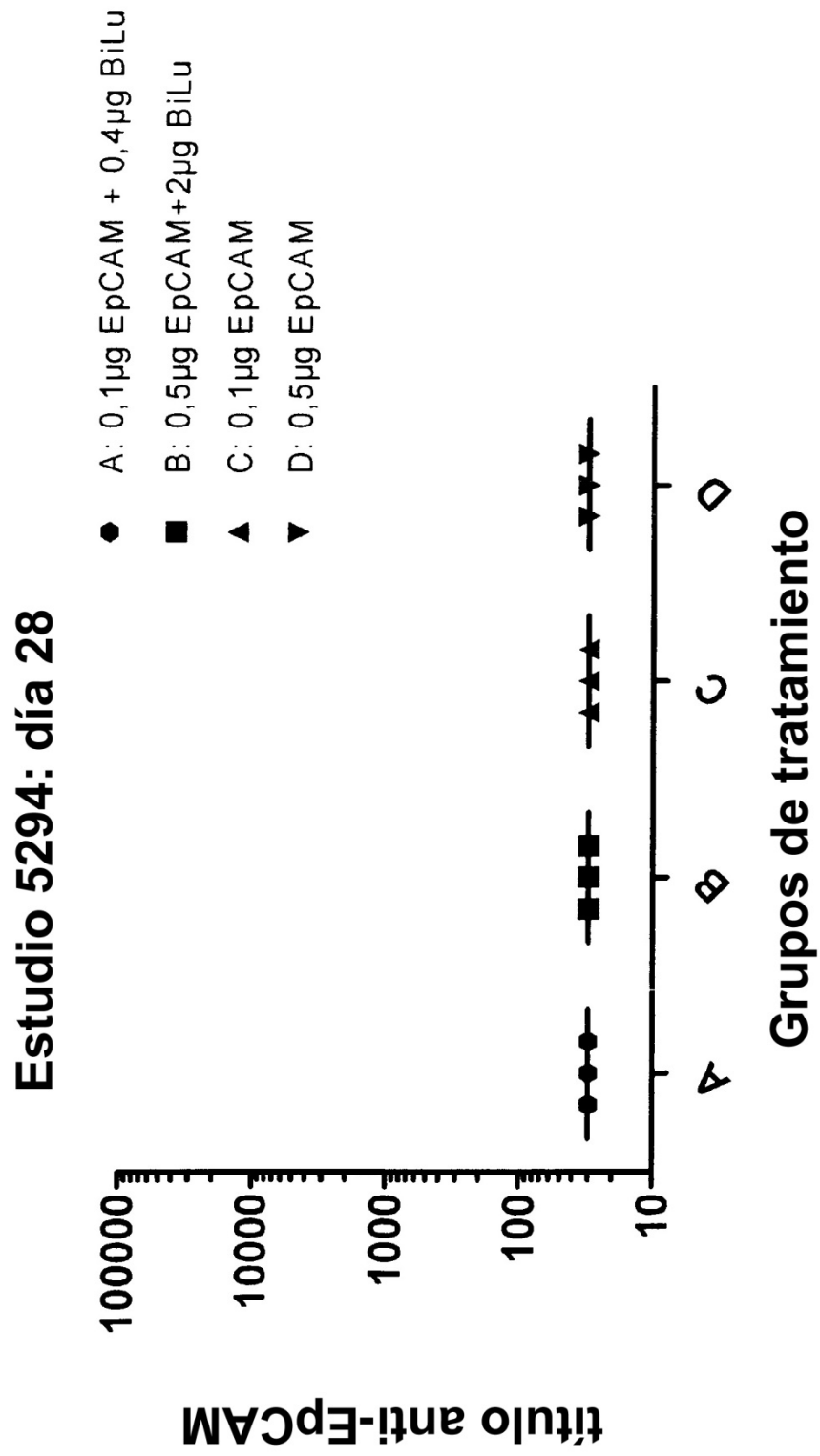


Figura 2 (Cont.)

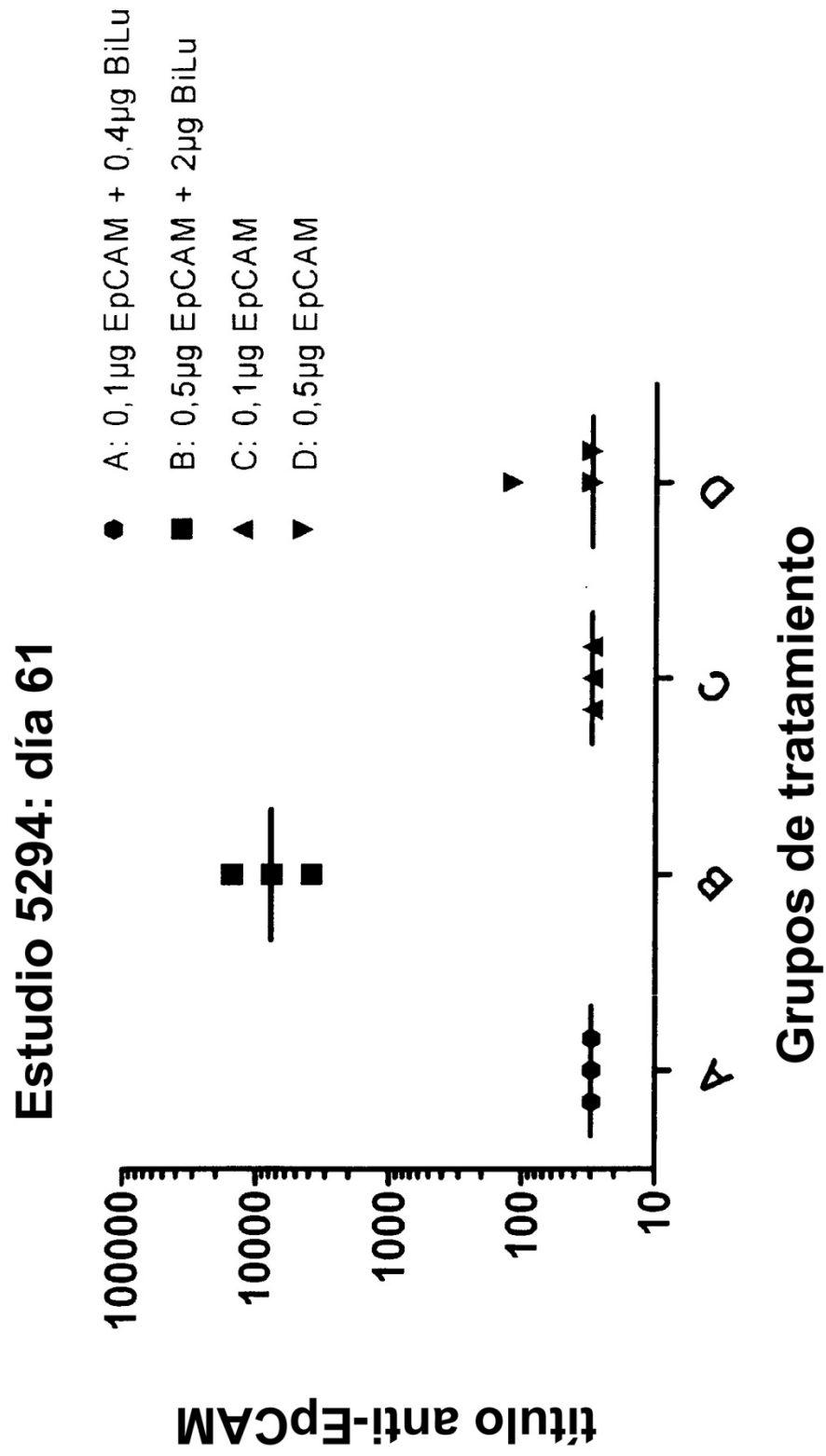


Figura 2 (Cont.)

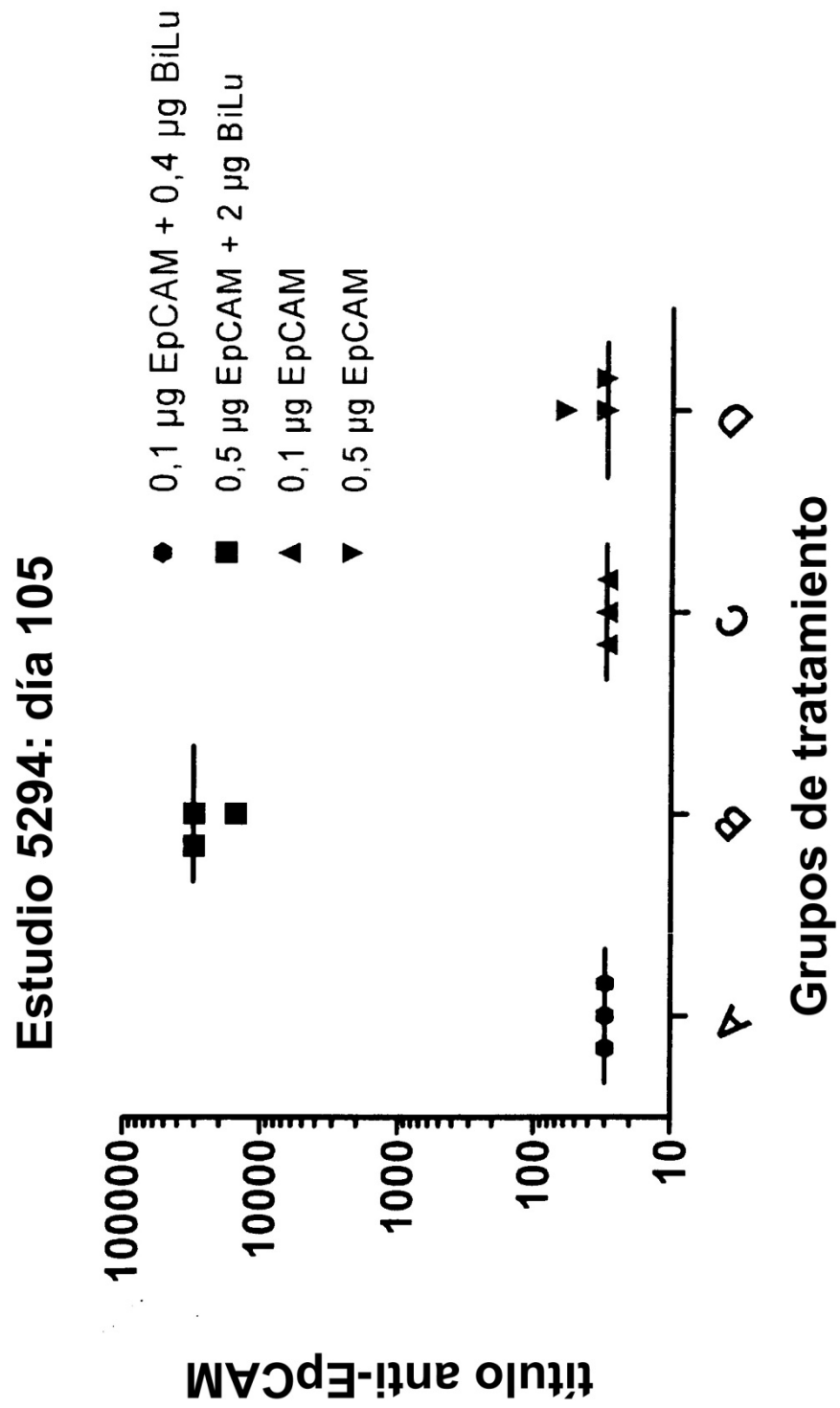


Figura 3:

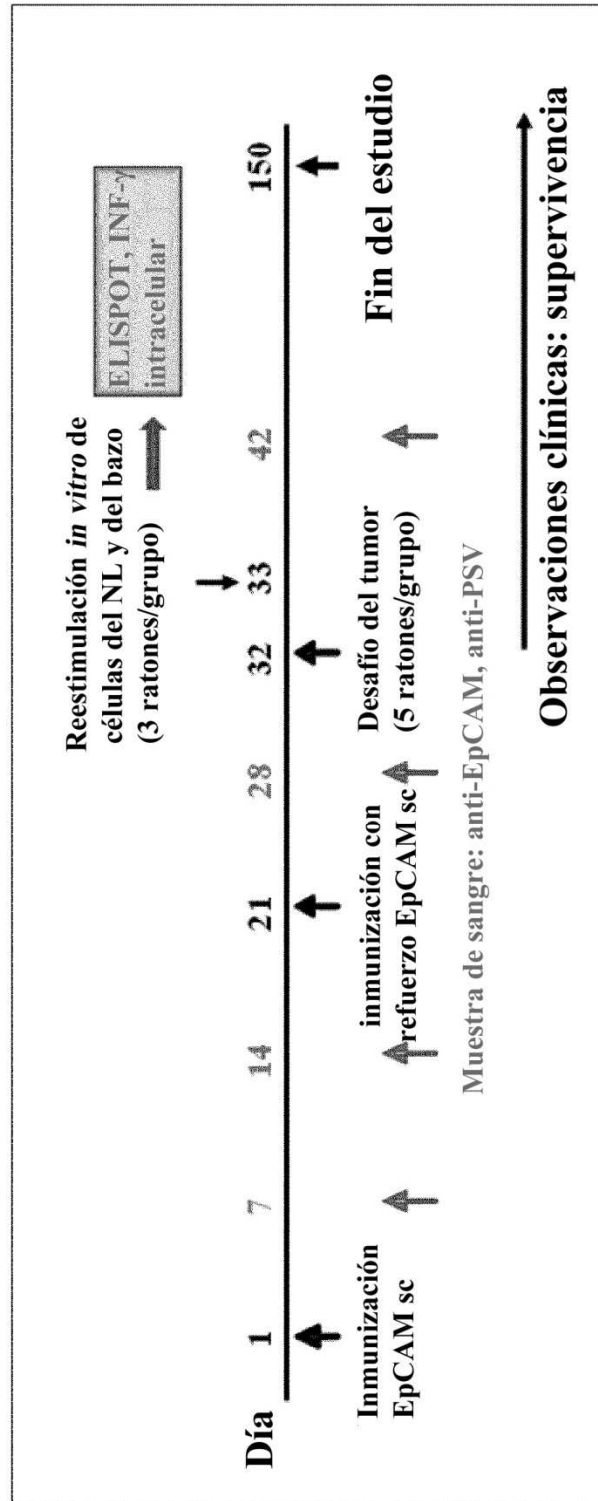


Figura 4:

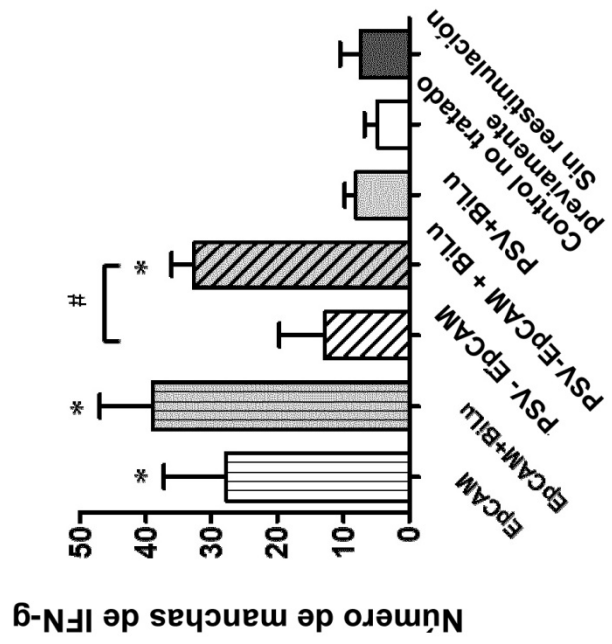


Figura 5A

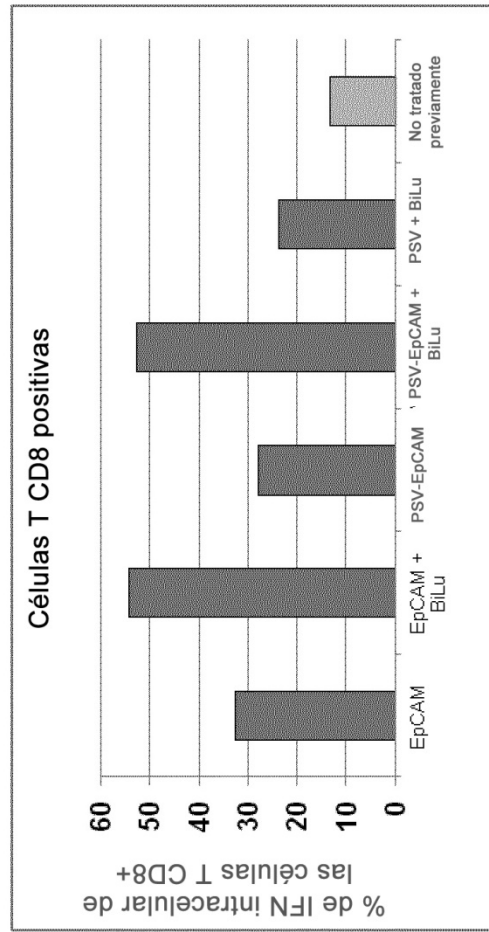
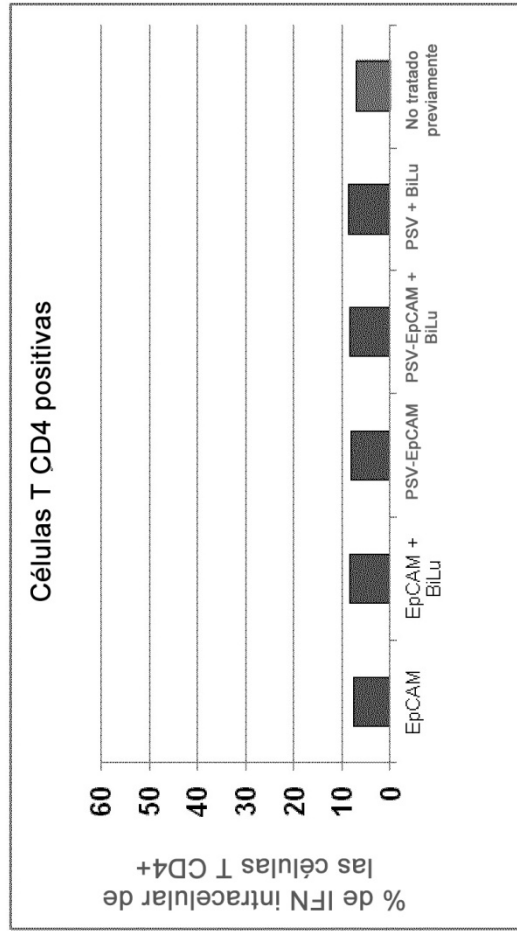


Figura 5B



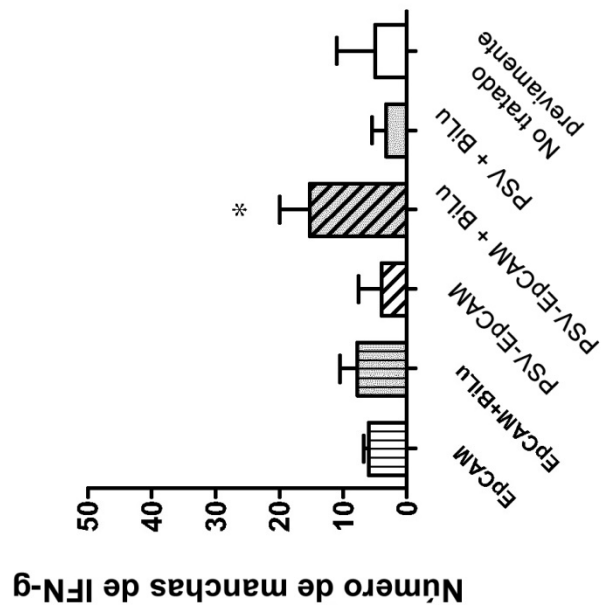


Figura 6

Figura 7A

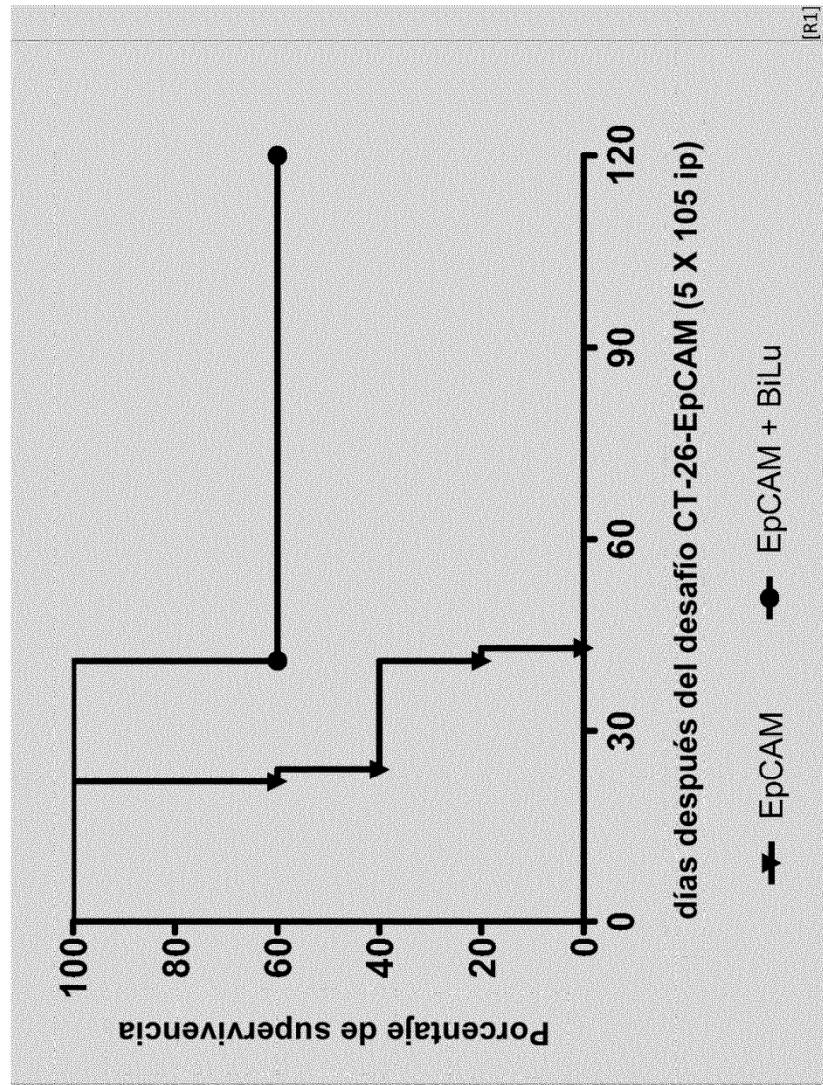


Figura 7B

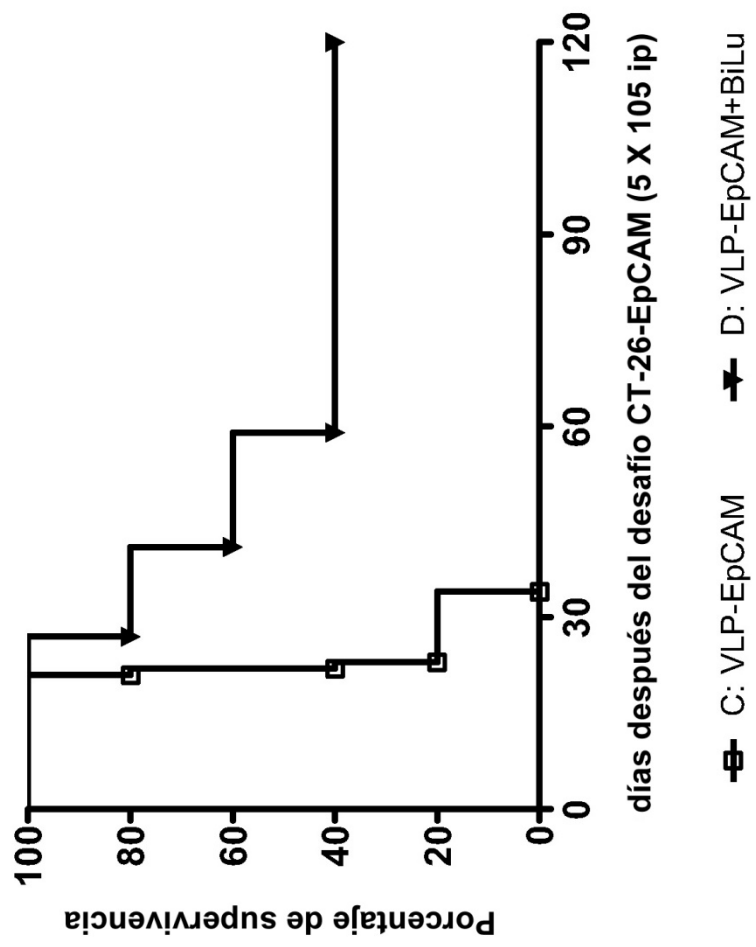


Figura 7C

