

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 706 058**

51 Int. Cl.:

A61K 39/385 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C07K 14/52 (2006.01)
C07K 16/44 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.06.2011 PCT/EP2011/060628**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **29.12.2011 WO11161244**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.06.2011 E 11727190 (8)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2018 EP 2585107**

54 Título: **Constructos de proteínas homodiméricas**

30 Prioridad:

25.06.2010 US 358513 P
25.06.2010 EP 10167291

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.03.2019

73 Titular/es:

VACCIBODY AS (100.0%)
Gaustadalleen 21
0349 Oslo , NO

72 Inventor/es:

RUFFINI, PIER ADELCHI;
BOGEN, BJARNE y
FREDRIKSEN, AGNETE BRUNSVIK

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 706 058 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

Constructos de proteínas homodiméricas

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a nuevas proteínas de fusión recombinantes, como las moléculas humanas basadas en anticuerpos llamadas vaccicuerpos, que pueden desencadenar una respuesta inmune tanto de células T como de células B. La presente invención también se refiere a un procedimiento para tratar un cáncer o una enfermedad infecciosa, por ejemplo mieloma múltiple o gripe, mediante estas proteínas de fusión específicas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La vacuna de ADN es una forma técnicamente sencilla de inducir respuestas inmunes. Sin embargo, el éxito en animales pequeños aún no se ha reproducido en los ensayos clínicos. En la actualidad se están aplicando varias estrategias para aumentar la eficacia de las vacunas de ADN.

El acceso de antígenos de proteína a células presentadoras de antígeno (APC) puede mejorar las respuestas de células T y células B. Las moléculas de inmunoglobulina (Ig) recombinante son adecuadas para este propósito. Por ejemplo, los epítopos antigénicos cortos pueden sustituir bucles entre cadenas β en los dominios constantes de Ig, mientras que la entrega de antígenos dirigidos se obtiene equipando la Ig recombinante con regiones variables (V) específicas para moléculas superficiales en APC. Sin embargo, dicha estrategia no es adecuada para antígenos más grandes que contienen epítopos no identificados. Además, las moléculas de Ig recombinante con epítopos de células T cortos no provocan anticuerpos contra epítopos conformacionales. Para superar estas limitaciones, se han generado las vacunas de ADN homodiméricas basadas en Ig (vaccicuerpos), que expresan los antígenos infecciosos o tumorales con un tamaño de al menos 550 aa. con mantenimiento de epítopos conformacionales.

La quimiocina (motivo C-C) con ligando 3 (CCL3) es una proteína codificada en humanos por el gen CCL3. CCL3, también conocida como proteína-1a inflamatoria de macrófagos (MIP-1 α), es una citocina que pertenece a la familia de las quimiocinas CC, implicada en el estado inflamatorio agudo en la incorporación y activación de leucocitos polimorfonucleares. Si bien la CCL3 de ratón es un gen de copia única que codifica una quimiocina madura de 69 aminoácidos, su homóloga humana se ha duplicado y mutado para generar dos variantes no alélicas, LD78 α (CCL3) y LD78 β (CCL3-L1), que muestran una homología del 74 % con la CCL3 de ratón.

Por el momento no se ha aprobado ninguna vacuna de ADN para uso humano debido a su falta de eficacia. Tampoco hay ninguna vacuna efectiva disponible para varias enfermedades infecciosas. En particular, no se ha aprobado ninguna vacuna de ADN terapéutica contra el cáncer para uso humano.

WO 2004/076489 se refiere a moléculas humanas recombinantes basadas en anticuerpos llamadas vaccicuerpos, que pueden desencadenar una respuesta inmune tanto de células T como de células B.

US20070298051 se refiere al uso de MIP-1-alfa para mejorar la respuesta inmune a un inmunógeno en un mamífero.

EP920522 se refiere a una vacuna de vector polinucleótido que comprende un cADN diana producto que comprende una secuencia de nucleótido que codifica una citocina o una quimiocina.

Fredriksen AB y col. (Mol Ther 2006;13:776-85) se refiere a vacunas de ADN que marcan antígenos tumorales a células presentadoras de antígenos.

Fredriksen AB y Bogen B (Blood 2007;110: 1797-805) se refiere a vacunas de ADN de fusión de quimiotipo e idiotipo de ratón.

OBJETIVO DE LA INVENCION

Es un objetivo de realizaciones de la invención el proporcionar proteínas de fusión, que pueden desencadenar una respuesta inmune eficiente incluso para antígenos débiles, como antígenos idiotípicos derivados por ejemplo de células de mieloma.

Además, es un objetivo de realizaciones de la invención el proporcionar polinucleótidos, como polinucleótido de ADN, que codifican una proteína de fusión que puede desencadenar una respuesta inmune eficiente incluso contra

antígenos débiles, como antígenos idiotípicos derivados por ejemplo de células de mieloma. Estos polinucleótidos se pueden usar como composición inmunoestimulante o vacuna contra un cáncer o una enfermedad infecciosa, caracterizada por un antígeno específico de una enfermedad o asociado a ella.

5 RESUMEN DE LA INVENCION

El(Los) presente(s) inventor(es) ha(n) comprobado que la quimiocina humana LD78 β , tanto la versión completa como la versión truncada de la misma, es adecuada para su uso como unidades de marcaje que marcan epítomos antigénicos a la superficie de APC. La quimiocina, o su versión truncada, se unen a receptores de quimiocina en la superficie de APC en forma de un constructo de proteínas homodiméricas que facilita que dos quimiocinas idénticas se unan para proporcionar un marcado y señalización más eficientes. El constructo homodimérico permite proporcionar dos epítomos antigénicos idénticos que se entregan a la APC que a su vez los presenta a las células T. Incluso con el tamaño relativamente grande de los constructos de proteínas homodiméricas, las células pueden producir y exportar moléculas intactas.

15 Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a una proteína homodimérica de dos cadenas idénticas de aminoácidos, cada cadena de aminoácidos comprende una unidad de marcaje que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 98 % de identidad con la secuencia de aminoácidos 5-70 de SEQ ID NO:1, y una unidad antigénica. La unidad de marcaje y la unidad antigénica se conectan a través de un motivo de dimerización.

20 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a una proteína homodimérica de dos cadenas idénticas de aminoácidos, cada cadena de aminoácidos comprende una unidad de marcaje que comprende los aminoácidos 3-70 de SEQ ID NO:1, y una unidad antigénica. La unidad de marcaje y la unidad antigénica se conectan a través de un motivo de dimerización.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína monomérica que puede formar una proteína homodimérica de acuerdo con la invención.

30 En otro aspecto adicional, la presente invención se refiere a una proteína homodimérica de acuerdo con la invención; para su uso como medicamento.

35 En otro aspecto adicional, la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína monomérica que puede formar una proteína homodimérica de acuerdo con la invención; para su uso como medicamento.

En otro aspecto adicional, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una proteína homodimérica de acuerdo con la invención.

40 En otro aspecto adicional, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína monomérica que puede formar una proteína homodimérica de acuerdo con la invención.

45 En otro aspecto adicional, la presente invención se refiere a una célula huésped que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína monomérica que puede formar una proteína homodimérica de acuerdo con la invención.

En otro aspecto adicional, la presente invención se refiere a un procedimiento para preparar una proteína homodimérica de acuerdo con la invención, procedimiento que comprende

- 50
- a) transfectar la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención en una población celular;
 - b) cultivar la población celular;
 - c) recoger y purificar la proteína homodimérica expresada de la población celular.

55 En otro aspecto adicional la presente invención se refiere a una vacuna contra un cáncer o una enfermedad infecciosa que comprende una cantidad efectiva inmunológicamente de una proteína homodimérica de acuerdo con la invención o molécula de ácido nucleico que codifica la proteína monomérica que puede formar la proteína homodimérica de acuerdo con la invención, donde dicha vacuna puede desencadenar una respuesta inmune tanto de células T como de células B y donde dicha proteína homodimérica contiene una unidad antigénica relacionada con dicho cáncer o enfermedad infecciosa.

60

En otro aspecto adicional la presente invención se refiere a una composición inmunomodulante o inmunoestimulante contra un cáncer o una enfermedad infecciosa que comprende una cantidad efectiva inmunológicamente de una proteína homodimérica de acuerdo con la invención o molécula de ácido nucleico que codifica la proteína monomérica que puede formar la proteína homodimérica de acuerdo con la invención, donde dicha composición inmunomodulante o inmunoestimulante puede desencadenar una respuesta inmune tanto de células T como de células B y donde dicha proteína homodimérica contiene una unidad antigénica relacionada con dicho cáncer o enfermedad infecciosa.

En otro aspecto adicional la presente invención se refiere a un procedimiento para tratar un cáncer o una enfermedad infecciosa en un paciente, procedimiento que comprende administrar al paciente que necesita de la misma una proteína homodimérica de acuerdo con la invención, o la molécula de ácido nucleico que codifica la proteína monomérica que puede formar la proteína homodimérica de acuerdo con la invención, donde dicha proteína homodimérica contiene una unidad antigénica relacionada con dicho cáncer o enfermedad infecciosa.

15 LEYENDAS DE LAS FIGURAS

Figura 1. Vacunas de fusión usadas en este estudio. (A) Estructura esquemática de una proteína de fusión de quimiocinas y antígenos homodimérica (vaccicuerpo). Las unidades de marcaje, dimerización y antigénicas están indicadas, como las fracciones expresadas en las diversas unidades. En todos los constructos, la unidad de dimerización y de bisagra se derivan de la IgG3 humana. Un conector G₃S₂G₃SG conecta los exones bisagra h1+h4 al dominio de CH3. Un conector GLSGL conecta CH3 y la unidad antigénica, mientras que un conector (G₄S)₃ conecta V_Hy V_Len la unidad antigénica. (B) Secuencias NH₂-terminales (aa. 1-12) de isoformas humanas CCL3, y su control de mutación puntual (C11S, indicado en negrita). La barra indica delección. (C) La mutación genética C11S destruye putativamente un puente disulfuro en la estructura de la quimiocina (derecha).

Figura 2. Caracterización de vaccicuerpos que expresan LD78β por ELISA y Western blot. Los sobrenadantes de células 293E transfectadas temporalmente recogidas el día 5 se probaron en ELISA mediante anticuerpos monoclonales específicos para diferentes componentes de las moléculas de vaccicuerpo. (A), los vaccicuerpos que codifican scFv³¹⁵ con unidades de marcaje indicadas se evaluaron mediante unión con la cubierta del complejo DNP-BSA (une scFv³¹⁵) y detección con HP6017 biotinilado (une motivo de dimerización de CH3). (B), los vaccicuerpos que codifican CkCk, con las unidades de marcaje indicadas, se evaluaron mediante unión con la cubierta de anticuerpo monoclonal 187,1 (une Ck de ratón) y detección con anticuerpo monoclonal 187,1 biotinilado, (C), los vaccicuerpos que codifican HA, con las unidades de marcaje indicadas, se evaluaron mediante unión con MCA878-G (motivo de dimerización anti-CH3) y detección con anticuerpo monoclonal anti-HA H36-4-52 biotinilado (D), Western blot de vaccicuerpos analizado con HP6017 biotinilado en condiciones no reductoras. De izquierda a derecha, (LD78βFv³¹⁵)₂, (LD78βC11SFv³¹⁵)₂ y (LD78β-2Fv³¹⁵)₂.

Figura 3. Las proteínas de vaccicuerpo LD78β unen receptores de quimiocina en células humanas. Las proteínas de vaccicuerpo homodiméricas indicadas en 25 μg/mL se mezclaron con células HEK 293 transfectadas de forma estable con CCR5 humana (A, B) o CCR1 humana (C, D). Las proteínas de vaccicuerpo unidas se detectaron mediante anticuerpo monoclonal Ab2.1-4 biotinilado específico para la unidad antigénica scFv³¹⁵, seguido por estreptavidina-PE. Líneas en negrita: Vaccicuerpos (LD78βFv³¹⁵)₂ (A, C) y (LD78β-2Fv³¹⁵)₂ (B, D). Línea de puntos en (A): (LD78β(C11S)Fv³¹⁵)₂. Histograma sombreado: anticuerpo monoclonal Ab2.1-4 biotinilado y estreptavidina-PE solo.

Figura 4. Las proteínas de vaccicuerpos LD78β unen receptores de quimiocina de ratón y provocan la quimiotaxis de células de murinos. Vaccicuerpo (LD78βFv³¹⁵)₂ (histograma abierto), pero no la variante C11S (histograma sombreado), se une a esplenocitos CD11b+ BALB/c (A) y muestra actividad quimiotáctica en células linfocíticas Esb/MP (B).

Figura 5. El vaccicuerpo con unidad de marcaje LD78β entrega de forma eficiente los antígenos a las APC de ratón (A) y humanas (B) para la presentación restringida a CMH de clase II de células T CD4+. (A) Se mezclaron diferentes cantidades de vaccicuerpos purificados con scFv³¹⁵ como unidad antigénica con esplenocitos irradiados (8 gy) BALB/c, seguido de adición de células T Th2 específicas de Id(λ2³¹⁵) de ratones transgénicos TCR. Tras 48 horas los cultivos se pulsaron con 3H de timidina durante 24 horas. (B) Diferentes cantidades de sobrenadantes de vaccicuerpos de ratón que contienen Ck (expresados como concentración molar (M) de CkCk) de células 293E transfectadas temporalmente se mezclaron con PBMC DR4*01 que fueron irradiadas y mezcladas con células T T18 específicas de Ck de ratón. Después de 48 horas la placa se pulsó con 3H de timidina durante 24 horas.

Figura 6. Respuestas inmunes anti-Id³¹⁵ en ratones inmunizados con ADN de vaccicuerpos LD78βFv³¹⁵. Los ratones fueron inmunizados mediante administración intradermal de ADN seguida de inmediato por electroporación del lugar de la inyección. Los tipos de vaccicuerpos y controles están indicados. Los sueros obtenidos 3 semanas después se examinaron para comprobar la presencia de anticuerpos anti-Id IgG1 (A) o IgG2a (B) que unen la proteína de mieloma M315. Se muestra una media de hasta 7 ratones por grupo. Los valores p se refieren a los vaccicuerpos LD78β vs LD78β (C11S) (*), y LD78β vs (FvNIP)2 (**) en la semana 4.

Figura 7. Provocación de respuestas de célula T específica de hemaglutinina de la gripe CD4+ y CD8+ por los

vaccicuerpos LD78β. Los ratones (n=3) fueron inmunizados mediante administración intradérmica de ADN seguida de inmediato por electroporación del lugar de la inyección (Dermavax, Cytopulse, EE. UU.). Los tipos de vaccicuerpos y controles están indicados. Se sacrificaron los ratones 3 semanas después y las suspensiones de esplenocitos individuales usadas en ensayos ELISPOT con los péptidos sintéticos HA restringidos a clase I y clase II MHC, o péptidos irrelevantes. Se evaluaron las respuestas IFNγ. Los valores p se refieren a LD78β vs LD78βC11S y LD78β vs 0,9 % NaCl (*), y a LD78βC11S vs 0,9 % NaCl (**).

Figura 8. Los vaccicuerpos LD78β unen CCR5 de macaco Rhesus. Se mezclaron las proteínas de vaccicuerpo a 25 μg/ml con HEK 293 transfectadas de forma estable con CCR5 de macaco Rhesus. Las proteínas de vaccicuerpo unidas se detectaron mediante anticuerpo monoclonal Ab2.1-4 biotinilado específico para la unidad antigénica scFv³¹⁵, seguido por estreptavidina-PE. La línea en negrita indica los vaccicuerpos (LD78βFv³¹⁵)₂ en (A) y (LD78β-2Fv³¹⁵)₂ en (B). La línea de puntos en (A) indica vaccicuerpo (LD7/β(C11S)Fv³¹⁵)₂. Tanto en A como en B los histogramas sombreados indican anticuerpo monoclonal Ab2.1-4 biotinilado y estreptavidina-PE solo.

Figura 9. Protección contra una exposición letal a la gripe. Los ratones Balb/c fueron inmunizados una vez de forma intradérmica con 25 μg de ADN en combinación con electroporación (DermaVax), y expuestos después de 14 días (n=6/grupo) con una dosis letal de virus de la gripe PR8 (H1N1).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Se debe aumentar la eficacia de las vacunas de ADN. Una estrategia prometedora en ratones es construir ADN que codifica una proteína de fusión que marca antígenos a células presentadoras de antígenos (APC) mediante receptores de quimiocina. Es esencial extender esta estrategia para vacunas de ADN mejoradas para animales grandes y humanos. De acuerdo con la presente invención, las quimiocinas humanas MIP-1α se pueden fusionar con diferentes unidades antigénicas. Las proteínas de fusión retienen la actividad funcional y exactitud conformacional de las unidades de marcaje y antigénicas, respectivamente. Las proteínas de fusión pueden mejorar las respuestas de células humanas T CD4+ clonadas. Además, puesto que las proteínas de fusión LD78β unen receptores de quimiocina de ratón, las vacunas de ADN humano se pueden probar en ratones. Las vacunas de fusión de ADN LD78β de acuerdo con la presente invención provocaron respuestas mejoradas de las células T y anticuerpos en ratones tras inyección de plásmido y electroporación de la piel. Las respuestas de las células T CD8+ se mejoran particularmente, lo que indica una presentación cruzada eficiente. Los presentes inventores han demostrado que una versión truncada de dos aminoácidos NH₂ de LD78β tiene una fijación superior a las células de ratón comparada con la LD78β entera *in vitro*. Sorprendentemente, la versión entera de LD78β ha mostrado un efecto superior en un modelo de ratón *in vivo*. Los inventores de la presente invención han comprobado que las proteínas de la vacuna LD78β unen CCR5 de macaco Rhesus, lo que sienta las bases para la inmunización por ADN dirigida en primates no humanos.

Los vaccicuerpos de acuerdo con la presente invención pueden ser vacunas homodiméricas basadas en Ig recombinante, cada cadena compuesta de una unidad de marcaje fijada directamente a la Ig bisagra y CH3, cuya combinación provoca homodimerización covalente (Fig. 1A).

Si bien la CCL3 de ratón es un gen de copia única que codifica una quimiocina madura de 69 aa., su homóloga humana se ha duplicado y mutado para generar dos variantes no alélicas, LD78α (CCL3) y LD78β (CCL3-L1), que muestran una homología del 74 % con la CCL3 de ratón. Las dos variantes comparten un 96 % de homología, las diferencias son S o P en posición 2 y un cambio entre G y S en las posiciones 39 y 47.

De acuerdo con la presente invención, las variantes de CCL3 humano y las diferentes unidades antigénicas se pueden construir y expresar como proteínas funcionales. En particular, la presente invención se refiere a la utilización de LD78β y sus isoformas naturales en vacunas de fusión para marcar la entrega de antígenos a APC.

Los vaccicuerpos de acuerdo con la presente invención tienen como objetivo mejorar la inmunogenicidad de las vacunas (composiciones inmunoestimulantes). En la presente invención se incluyen vacunas de ADN que codifican una proteína de fusión que marca la entrega de antígenos a receptores LD78β en APC profesionales.

Los inventores de la presente invención comprobaron que los vaccicuerpos equipados con LD78β o versiones de NH₂ truncadas del mismo unen células que expresan CCR1 y/o CCR5 de murinos o de macaco Rhesus o humanos (receptores de LD78β) *in vitro* y permitían la entrega de antígenos *in vitro*, así como aumentaban las respuestas inmunitarias humorales y celulares *in vivo* tras la inyección de ADN y la electroporación, en comparación con los vaccicuerpos no dirigidos y de control.

Las proteínas recombinantes de acuerdo con la presente invención pueden ser moléculas humanas similares a los anticuerpos, útiles para el tratamiento de varios tipos de cáncer o enfermedades infecciosas, incluido el mieloma múltiple. Estas moléculas, también denominadas vaccicuerpos, unen APC y pueden desencadenar una respuesta

- inmunitaria tanto de células T como de células B. Además, los vaccicuerpos se unen de forma divalente a APC para favorecer una provocación más eficiente de respuesta inmunológica fuerte. Los vaccicuerpos comprenden un dímero de una unidad monomérica que consiste en una unidad de marcaje con especificidad para una molécula superficial en APC, conectada a través de un motivo de dimerización, como una región bisagra y un dominio Cy3, a una unidad
- 5 antigénica, esta última en el extremo COOH terminal o de NH₂ terminal. La presente invención también se refiere a una secuencia de ADN que codifica para esta proteína recombinante, a vectores de expresión que comprenden estas secuencias de ADN, a líneas celulares que comprenden dichos vectores de expresión, a tratamiento de mamíferos preferentemente mediante inmunización mediante ADN de vaccicuerpo, ARN de vaccicuerpo o proteína de vaccicuerpo, y finalmente a fármacos y a un kit que comprenden dichas moléculas.
- 10 El motivo de dimerización en las proteínas de acuerdo con la presente invención se puede construir para incluir una región bisagra y un dominio de inmunoglobulina (por ejemplo dominio Cy3), por ejemplo dominio carboxi-terminal (dominio C_H3), o una secuencia substancialmente homóloga a dicho dominio C. La región bisagra puede derivar de la Ig y contribuye a la dimerización a través de, la formación de uniones covalentes entre cadena(s), por ejemplo, puente(s) disulfuro(s). Además, funciona como espaciador flexible entre los dominios y permite a las dos unidades de
- 15 marcaje unirse simultáneamente a dos moléculas diana en APC expresadas con distancias variables. Los dominios de inmunoglobulina contribuyen a la homodimerización a través de interacciones no covalentes, por ejemplo, interacciones hidrofóbicas. En una realización preferida el dominio de C_H3 se deriva de IgG. Estos motivos de dimerización se pueden intercambiar con otros grupos de multimerización (por ejemplo de otros isotipos o subclases de Ig). Preferiblemente, el motivo de dimerización se deriva de proteínas humanas nativas, como IgG humana.
- 20 Se entenderá que el motivo de dimerización puede tener cualquier orientación con respecto a la unidad antigénica y a la unidad de marcaje. En una realización la unidad antigénica es el extremo COOH terminal del motivo de dimerización con la unidad de marcaje en el extremo N terminal del motivo de dimerización. En otra realización la unidad antigénica es el extremo N terminal del motivo de dimerización con la unidad de marcaje en el extremo COOH terminal del motivo de dimerización.
- 25 La solicitud internacional WO 2004/076489 describe las secuencias y los vectores de ácido nucleico, que se pueden usar de acuerdo con la presente invención. Las proteínas de acuerdo con la presente invención pueden ser adecuadas para provocar una respuesta inmunológica contra cualquier polipéptido de cualquier origen. Cualquier secuencia antigénica de longitud suficiente que incluya un
- 30 epítipo específico se puede usar como unidad antigénica en las proteínas de acuerdo con la invención. La longitud mínima de dicha unidad antigénica puede estar alrededor de 9 aminoácidos. Por lo tanto, en ciertas realizaciones la unidad antigénica comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 9 aminoácidos que corresponde a al menos alrededor de 27 nucleótidos en una secuencia de ácidos nucleicos que codifican dicha unidad antigénica. Una secuencia antigénica así puede derivar de proteínas de cáncer o agentes infecciosos. Algunos ejemplos de dichas
- 35 secuencias de cáncer son la telomerasa, más específicamente hTERT, la tirosinasa, antígeno de melanoma TRP-1/TRP-2, antígeno específico de la próstata e idiotipos. Los agentes infecciosos pueden ser de origen bacteriano, por ejemplo antígenos de tuberculosis y OMP31 de brucelosis, o viral, más específicamente secuencias derivadas de VIH como por ejemplo secuencias derivadas de gp120, glicoproteína D de HSV-2 y antígenos del virus de la gripe como hemaglutinina, nucleoproteína y M2. La inserción de dichas secuencias en un formato de vaccicuerpo también puede
- 40 provocar la activación de ambos brazos de la respuesta inmunitaria. De forma alternativa, la unidad antigénica puede ser anticuerpos o fragmentos de los mismos, como scFv de extremo C terminal derivado de la Ig monoclonal producida por células de mieloma o linfoma, también llamadas componente M de mieloma/linfoma en pacientes con linfoma de célula B o mieloma múltiple. Dicho scFv representa un antígeno idiotípico.
- 45 En una realización particular, también utilizada en los ejemplos descritos aquí, la unidad antigénica de la proteína de acuerdo con la presente invención es el scFv de la proteína de mieloma M315 derivada del plasmacytoma MOPC315.4 de BALB/c. La cadena ligera λ²³¹⁵ de M315 alberga tres mutaciones somáticas definidas en el bucle CDR3 y funciona como epítipo de célula T idiotípica modelo en un sistema bien definido (Bogen, Malissen y col. 1986; Bogen y Lambris 1989).
- 50 La inmunización mediante proteína de vaccicuerpo, ADN de vaccicuerpo o ARN de vaccicuerpo, las últimas ejecutadas por ejemplo por inyección intramuscular o intradérmica con o sin electroporación posterior, son procedimientos posibles.
- La unidad de marcaje de las proteínas de acuerdo con la invención marca la proteína en APC a través de su unión
- 55 con receptores de quimiocina.
- Las proteínas de acuerdo con la presente invención pueden construirse genéticamente, y el ADN se puede transfectar en una célula huésped adecuada, como células NS0, células 293E, células CHO o células COS-7. Los transfectantes producen y segregan las proteínas recombinantes.
- 60

La presente invención se refiere a un fármaco que comprende las proteínas recombinantes ya descritas, secuencias de ADN/ARN o vectores de expresión de acuerdo con la invención. Si procede, este fármaco comprende adicionalmente un vehículo farmacológicamente compatible. Los expertos en la materia conocen los vehículos adecuados y la formulación de dichos fármacos. Algunos vehículos adecuados son por ejemplo soluciones comunes de tampón fosfato salino, agua, emulsiones, por ejemplo emulsiones de agua o aceite, agentes humectantes, soluciones estériles, etc. Los fármacos se pueden administrar por vía oral o parenteral. Los procedimientos de administración parenteral comprenden la administración tópica, intraarterial, intramuscular, subcutánea, intramedular, intratecal, intraventricular, intravenosa, intraperitoneal o intranasal. El médico competente determina la dosis adecuada, que depende de diferentes factores, por ejemplo, la edad, el sexo y el peso del paciente, el tipo de administración, etc. Además, la presente invención se refiere a una composición de vacuna o composiciones inmunoestimulantes contra el cáncer o enfermedades infecciosas que comprenden una cantidad inmunológicamente efectiva del ácido nucleico que codifica la molécula de la invención o degenera variantes de la misma, donde dicha composición puede desencadenar una respuesta inmunitaria tanto de célula T como de célula B. La presente invención también se refiere a un kit que comprende ADN, ARN o proteína de vaccicuerpo para uso diagnóstico, médico o científico.

La invención se refiere adicionalmente a un procedimiento para preparar la molécula recombinante de la invención que transfecta el vector que comprende la molécula de la invención en una población celular, cultiva la población celular, recoge la proteína recombinante expresada por la población celular y purifica la proteína expresada.

Es preferible insertar las secuencias de nucleótidos ya descritas en un vector adecuado para terapia génica, por ejemplo, bajo el control de un promotor específico, e introducido en las células. En una realización preferida el vector que comprende dicha secuencia de ADN es un virus, por ejemplo, un acenovirus, vaccinia virus o virus adenoasociado. Se prefieren los retrovirus en particular. Algunos ejemplos de retrovirus adecuados son MoMuLV o HaMuSV. Para la terapia génica, las secuencias de ADN/ARN de acuerdo con la invención también se pueden transportar a las células diana en forma de dispersiones coloidales. Comprenden por ejemplo liposomas o lipoplexos.

La presente descripción también abarca el uso de polipéptidos o dominios o motivos dentro de los polipéptidos que tienen un grado de identidad de secuencia u homología de secuencia con la(s) secuencia(s) de aminoácidos definida(s) aquí o con un polipéptido que tiene las propiedades específicas definidas aquí. La presente descripción abarca, en particular, los péptidos que tienen un grado de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1, u homólogos del mismo. Aquí, el término «homólogo» significa entidad que tiene identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos objeto o las secuencias de nucleótidos objeto, donde la secuencia de aminoácidos objeto es preferiblemente SEQ ID NO: 1.

En un aspecto de la descripción, la secuencia de aminoácidos o la secuencia de nucleótidos homóloga debe proporcionar o codificar un polipéptido que retiene la actividad funcional o mejora la actividad de un polipéptido de SEQ ID NO: 1.

En la presente descripción, se coge una secuencia homóloga para incluir una secuencia de aminoácidos que sea al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la secuencia objeto. Típicamente, los homólogos comprenden los mismos sitios activos etc. que la secuencia de aminoácidos objeto. Aunque la homología puede considerarse también en términos de similitud (es decir, residuos aminoacídicos que tienen similares propiedades/funciones químicas), en el contexto de la presente invención se prefiere expresar la homología en términos de identidad de secuencia.

Las comparaciones de identidad de secuencia se pueden llevar a cabo por examen visual o, más comúnmente, con ayuda de programas de comparación de secuencias de fácil acceso. Estos programas de ordenador disponibles en el mercado usan algoritmos complejos de comparación para alinear las dos o más secuencias que reflejan mejor los eventos evolutivos que podrían haber provocado la(s) diferencia(s) entre las dos o más secuencias. Por lo tanto, estos algoritmos operan con un sistema de puntuación que recompensa la alineación de aminoácidos idénticos o similares y penaliza la inserción de intervalos, extensiones de intervalos y alineación de aminoácidos no similares. El sistema de puntuación de los algoritmos de comparación incluye:

- i) asignación de una penalización cada vez que se inserta un intervalo (penalización por intervalo),
- ii) asignación de una penalización cada vez que un intervalo existente se extienda con una posición extra (penalización por extensión),
- iii) asignación de puntuaciones altas por alineación de aminoácidos idénticos, y
- iv) asignación de puntuaciones variables por alineación de aminoácidos no idénticos.

La mayoría de los programas de alineación permiten modificar las penalizaciones por intervalo. Sin embargo, es preferible usar los valores predeterminados cuando se usa dicho software para comparar las secuencias.

La puntuación por alineación de aminoácidos no idénticos se asigna de acuerdo con una matriz de calificación, también llamada matriz de sustitución. Los puntos proporcionados en dichas matrices de sustitución reflejan el hecho de que la probabilidad de que un aminoácido sea sustituido por otro durante la evolución varía y depende en la naturaleza física o química del aminoácido que se sustituye. Por ejemplo, la probabilidad de que un aminoácido polar sea sustituido por otro aminoácido polar es mayor comparada con la de que sea sustituido por un aminoácido hidrofóbico. Por lo tanto, la matriz de calificación asignará la puntuación más alta para los aminoácidos idénticos, una puntuación más baja para aminoácidos no idénticos pero similares y otra puntuación más baja incluso para los aminoácidos no idénticos y no similares. Las matrices de calificación más usadas son las matrices PAM (Dayhoff y col. (1978), Jones y col. (1992)), las matrices BLOSUM (Henikoff y Henikoff (1992)) y la matriz Gonnet (Gonnet y col. (1992)).

Entre los programas informáticos adecuados para llevar a cabo dicha alineación se incluyen, entre otros, Vector NTI (Invitrogen Corp.) y los programas ClustalV, ClustalW y ClustalW2 (Higgins DG & Sharp PM (1988), Higgins y col. (1992), Thompson y col. (1994), Larkin y col. (2007)). Una selección de diferentes herramientas de alineación se encuentra disponible en el servidor de ExpASY Proteomics en www.expasy.org. Otro ejemplo de software que puede llevar a cabo alineamiento de secuencias es BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), que se encuentra disponible en la página web del National Center for Biotechnology Information que actualmente se encuentra en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> y que se describió por primera vez en Altschul y col. (1990) J. Mol. Biol. 215, 403-410.

Una vez que el software ha producido un alineamiento, es posible calcular el % de similitud y el % de identidad de secuencia. Típicamente, el software hace esto como parte de la comparación de secuencias y genera un resultado numérico.

En una representación, se prefiere usar el software ClustalW para llevar a cabo alineamientos de secuencia. Preferiblemente, el alineamiento con ClustalW se lleva a cabo con los siguientes parámetros para el alineamiento por pares:

Matriz de sustitución:	Gonnet 250
Penalización por intervalo abierto:	20
Penalización por extensión de intervalo:	0,2
Penalización por final de intervalo:	Ninguna

Por ejemplo, ClustalW2 está disponible en internet gracias al European Bioinformatics Institute en la página web de EMBL-EBI www.ebi.ac.uk en herramientas - análisis de secuencias - ClustalW2. En la actualidad, la dirección exacta de la herramienta ClustalW2 es www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2.

En otra representación, se prefiere usar el programa Align X en Vector NTI (Invitrogen) para llevar a cabo alineamientos de secuencia. En una representación, Exp10 se puede usar con la configuración predeterminada:

Penalización por intervalo abierto: 10
 Penalización por extensión de intervalo: 0,05
 Rango de penalización por separación de intervalo: 8
 Matriz de calificación: blosum62mt2

Así, la presente descripción también comprende el uso de variantes, homólogos y derivados de cualquier secuencia de aminoácidos de una proteína, polipéptido, motivo o dominio como se definen aquí, particularmente los de SEQ ID NO: 1.

Las secuencias, particularmente aquellas de variantes, homólogos y derivados de SEQ ID NO: 1, también pueden tener deleciones, inserciones o sustituciones de residuos de aminoácidos que producen un cambio silencioso y resultan en una sustancia funcionalmente equivalente. Las sustituciones de aminoácidos deliberadas se pueden realizar sobre la base de la similitud en la polaridad, carga, solubilidad, hidrofobia, hidrofilia o la naturaleza anfipática de los residuos mientras se retenga la actividad de unión secundaria de la sustancia. Por ejemplo, los aminoácidos con una carga negativa incluyen ácido aspártico y ácido glutámico; los aminoácidos con una carga positiva incluyen lisina y arginina; y los aminoácidos con grupos de cabeza polar sin carga que tienen valores de hidrofiliidad similares incluyen leucina, isoleucina, valina, glicina, alanina, asparagina, glutamina, serina, treonina, fenilalanina y tirosina.

La presente descripción también abarca la sustitución conservadora que puede ocurrir, es decir, una sustitución de tipo similar, como básico por básico, ácido por ácido, polar por polar, etc. La sustitución no conservadora también puede ocurrir, es decir, de una clase de residuo a otra o, de forma alternativa, implica la inclusión de aminoácidos no naturales como la ornitina (en lo sucesivo denominada Z), la ornitina de ácido diaminobutírico (en lo sucesivo denominada B), norleucina ornitina (en lo sucesivo denominada O), mepiramina, fenilalanina, naftilalanina y

fenilglicina.

Las sustituciones conservadoras que se pueden hacer son, por ejemplo, dentro de los grupos de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos alifáticos (alanina, valina, leucina, isoleucina), aminoácidos polares (glutamina, asparagina, serina, treonina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina), hidroxilaminoácidos (serina, treonina), aminoácidos grandes (fenilalanina y triptófano) y aminoácidos pequeños (glicina, alanina).

Las sustituciones también se pueden llevar a cabo mediante aminoácidos no naturales incluidos los aminoácidos alfa * y alfa-disustituidos *, aminoácidos N-alquilo *, ácido láctico *, haluros de aminoácidos naturales tales como trifluorotirosina *, p-Cl-fenilalanina *, p-Br-fenilalanina *, pl-fenilalanina *, L-alilglicina *, β-alanina *, ácido L-α-amino butírico *, ácido L-γ-amino butírico *, ácido L-α-amino isobutírico *, ácido L-ε-amino caproico #, 7 ácido amino heptanoico *, L-metionina sulfona **, L-norleucina *, L-norvalina *, p-nitro-L-fenilalanina *, L-hidroxiprolina #, L-tioprolina *, derivados metílicos de fenilalanina (Phe) tales como 4-metil-Phe *, pentametil-Phe *, L-Phe (4-amino) #, L-Tyr (metilo) *, L-Phe (4-isopropil) *, L-Tic (1,2,3) , Ácido 4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxilo) *, ácido L-diaminopropiónico # y L-Phe (4-bencilo) *. La notación * se ha utilizado para la discusión anterior (relativa a la sustitución homóloga o no conservadora), para indicar la naturaleza hidrofóbica de la derivativa mientras que # se ha utilizado para indicar la naturaleza hidrofílica de la derivativa, #* indica características anfipáticas.

Las secuencias de aminoácidos variantes pueden incluir grupos de espaciadores que se pueden insertar entre dos residuos de aminoácidos incluidos los grupos de alquilo, tales como grupos metilo, etilo o propilo, además de espaciadores de aminoácidos, tales como residuos de glicina o β-alanina. Los expertos en la materia reconocerán una forma adicional de variación que implica la presencia de uno o más residuos de aminoácidos en forma peptoide. Para evitar toda duda, «la forma peptoide» se utiliza para referirse a los residuos de aminoácidos variantes donde el grupo sustituyente α-carbono está en el átomo de nitrógeno del residuo en lugar del carbono α. Los procesos para preparar péptidos en forma peptoide son conocidos en la materia, por ejemplo Simon RJy col.(1992), Horwell DC. (1995).

En una realización, la unidad de marcaje variante usada en la proteína homodimérica de acuerdo con la presente invención es una variante que tiene la secuencia de aminoácidos 5-70 de SEQ ID NO:1 y tiene al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia de aminoácido con la misma.

En un aspecto, la proteína o secuencia usada en la presente invención es preferiblemente una forma purificada. El término «purificado» significa que un determinado componente está presente en un alto nivel. El componente es, de forma deseable, el componente activo predominante presente en una composición.

Una «variante» o «variantes» se refiere a proteínas, polipéptidos, unidades, motivos, dominios o ácidos nucleicos. El término «variante» se puede intercambiar con el término «mutante». Las variantes incluyen inserciones, sustituciones, transversiones, truncamientos o inversiones en una o más ubicaciones en la secuencia de aminoácidos o nucleótidos, respectivamente. Las frases «polipéptido variante», «polipéptido», «variante» y «encima variante» significan un polipéptido/proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que ha sido modificada de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1. Los polipéptidos variantes incluyen un polipéptido que tiene un determinado porcentaje, por ejemplo 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1, y al menos 98 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos 5-70 de SEQ ID NO:1.

«Ácidos nucleicos variantes» pueden incluir secuencias complementarias a las secuencias capaces de hibridar a las secuencias de nucleótidos presentadas aquí. Por ejemplo, una secuencia variante es complementaria a las secuencias capaces de hibridar bajo condiciones rigurosas, por ejemplo 50°C y 0.2X SSC (1X SSC = 0,15 M NaCl, 0,015 M citrato de sodio, pH 7,0), a las secuencias de nucleótidos presentadas aquí. De forma más particular, el término variante comprende secuencias que son complementarias a secuencias capaces de hibridar bajo condiciones muy rigurosas, por ejemplo 65°C y 0.1X SSC, a las secuencias de nucleótidos presentadas aquí. El punto de fusión (Tm) de un ácido nucleico variante puede ser alrededor de 1, 2 o 3°C más bajo que el Tm del ácido nucleico tipo silvestre. Los ácidos nucleicos variantes incluyen un polinucleótido que tiene un determinado porcentaje, por ejemplo 80%, 85%, 90%, 95% o 99% de identidad de secuencia con el ácido nucleico que codifica SEQ ID NO: 1 y al menos 98% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos 5-70 de SEQ ID NO:1 o codifica la proteína monomérica que puede formar la proteína homodimérica de acuerdo con la invención.

El término «proteína homodimérica» tal y como se usa aquí se refiere a una proteína que comprende dos cadenas individuales idénticas de aminoácidos, o subunidades unidas como una única proteína dimérica, ya sea mediante enlaces de hidrógeno, interacciones iónicas (cargadas), enlaces disulfuro covalentes reales o una combinación de estas interacciones.

El término «motivo de dimerización», como se usa aquí, se refiere a la secuencia de aminoácidos entre la unidad

antigénica y la unidad de direccionamiento que comprende la región bisagra y el segundo dominio opcional que puede contribuir a la dimerización. Este segundo dominio puede ser un dominio de inmunoglobulina, y de forma opcional la región bisagra y el segundo dominio están conectados a través de un conector. Por lo tanto, el motivo de dimerización sirve para conectar la unidad antigénica y la unidad de marcaje, pero también contiene la región bisagra que facilita la dimerización de las dos proteínas monoméricas en una proteína homodimérica de acuerdo con la invención.

El término «unidad de marcaje» como se usa aquí se refiere a una unidad que entrega la proteína con su antígeno a APC de ratón o humanas para presentación restringida de clase II MHC para células T CD4+ o para proporcionar una presentación cruzada de células T CD8+ mediante restricción de clase I MHC.

El término «unidad antigénica» como se usa aquí se refiere a cualquier molécula, como un péptido, que puede ser reconocida específicamente por un anticuerpo u otro componente del sistema inmunológico, como un receptor de superficie en células T. En esta definición también se incluyen los inmunógenos que pueden inducir una respuesta inmune, como los inmunógenos de idiotipo de anticuerpos. Los términos «epítipo» o «epítipo antigénico» se usan para referirse a una superficie molecular distinta, como una superficie molecular proporcionada por una secuencia péptida corta dentro de una unidad antigénica. En algunas representaciones la unidad antigénica comprende dos o más epítipos antigénicos.

El término «región bisagra» se refiere a la secuencia péptida de la proteína homodimérica que facilita la dimerización, como a través de la formación de uniones covalentes entre cadenas, por ejemplo puentes disulfuros. La región bisagra puede derivar de Ig, como exones bisagra h1+h4 de una Ig, como IgG3.

El término «composición inmunoestimulante» como se usa aquí se refiere a cualquier composición terapéutica capaz de activar el sistema inmune, por ejemplo al activar o inhibir funciones de linfocito, en particular funciones de célula T como activación de célula T.

Realizaciones específicas de la invención

En algunas realizaciones la unidad antigénica es un antígeno asociado con el cáncer o específico del cáncer.

El término «antígeno asociado con el cáncer» se refiere a cualquier antígeno, que no es necesariamente específico de un cáncer concreto, pero se sobreexpresa en la superficie de las células cancerígenas de este cáncer. El término se puede intercambiar con el término «antígenos de cáncer».

En ciertas realizaciones la unidad antigénica es un scFv antigénico. En ciertas realizaciones un conector, como un conector (G₄S)₃, conecta V_H y V_L en el scFv antigénico. En ciertas realizaciones el scFv antigénico se deriva de una Ig monoclonal producida por células de mieloma o linfoma.

En ciertas realizaciones la unidad antigénica es una telomerasa, o una parte funcional de la misma. En ciertas realizaciones la telomerasa es hTERT.

En ciertas realizaciones la unidad antigénica es un antígeno de melanoma. En ciertas realizaciones el antígeno de melanoma es tirosinasa, TRP-1 o TRP-2.

En ciertas realizaciones la unidad antigénica es un antígeno de cáncer de próstata. En ciertas realizaciones el antígeno de cáncer de próstata es PSA.

En ciertas realizaciones la unidad antigénica es un antígeno de cáncer de cuello uterino. En ciertas realizaciones el antígeno de cáncer de cuello uterino se selecciona de entre la lista constituida por virus del papiloma humano E1, E2, E4, E6 y E7.

En ciertas realizaciones la unidad antigénica se deriva de una bacteria.

En ciertas realizaciones la unidad antigénica derivada de una bacteria es un antígeno de tuberculosis.

En ciertas realizaciones la unidad antigénica derivada de una bacteria es un antígeno de brucelosis.

En ciertas realizaciones la unidad antigénica se deriva de un virus.

En ciertas realizaciones la unidad antigénica derivada de un virus se deriva de VIH. En ciertas realizaciones la unidad

antigénica derivada de VIH se deriva de gp120 o Gag.

5 En ciertas realizaciones la unidad antigénica se selecciona de entre la lista constituida por HA, nucleoproteína y antígeno M2; glicoproteína D de antígeno de herpes simple 2; y un antígeno de virus del papiloma humano, como cualquiera seleccionado de entre la lista que consiste en E1, E2, E6, E7, L1 y L2.

En ciertas realizaciones el motivo de dimerización comprende una región bisagra y de forma opcional otro dominio que facilita la dimerización, como un dominio de inmunoglobulina, conectado opcionalmente a través de un conector.

10 En ciertas realizaciones la región bisagra se deriva de la Ig, como derivada de IgG3.

En ciertas realizaciones la región bisagra tiene la habilidad de formar uno, dos o varios enlaces covalentes. En ciertas realizaciones el enlace covalente es un puente disulfuro.

15 En ciertas realizaciones el dominio de inmunoglobulina del motivo de dimerización es un dominio carboxi-terminal C, o una secuencia sustancialmente homóloga a dicho dominio C. En ciertas realizaciones el dominio carboxi-terminal C se deriva de IgG.

20 En ciertas realizaciones el dominio de inmunoglobulina del motivo de dimerización tiene la habilidad de homodimerizar.

En ciertas realizaciones el dominio de inmunoglobulina del motivo de dimerización tiene la habilidad de homodimerizar mediante interacciones no covalentes. En ciertas realizaciones las interacciones no covalentes son interacciones hidrofóbicas.

25 En ciertas realizaciones el dominio de dimerización no comprende el dominio CH2.

En ciertas realizaciones el motivo de dimerización consiste en exones bisagra h1 y h4 conectados a través de un conector a un dominio C_{H3} de IgG3 humana.

30 En ciertas realizaciones el conector que conecta la región bisagra y otro dominio que facilita la dimerización, como un dominio de inmunoglobulina, es un conector G₃S₂G₃SG.

En ciertas realizaciones la unidad antigénica y el motivo de dimerización están conectados a través de un conector, como un conector GLSGL.

35 En ciertas realizaciones la unidad de marcaje comprende los aminoácidos 3-70 de SEQ ID NO:1.

En ciertas realizaciones la unidad de marcaje consiste en aminoácidos 5-70 de SEQ ID NO:1.

40 En ciertas realizaciones la unidad de marcaje consiste en aminoácidos 3-70 de SEQ ID NO:1.

En ciertas realizaciones la unidad de marcaje consiste en aminoácidos 1-70 de SEQ ID NO:1.

En ciertas realizaciones la proteína homodimérica no comprende los aminoácidos 1-70 de SEQ ID NO:1.

45 En ciertas realizaciones de la descripción la unidad de marcaje comprende los aminoácidos 3-70 de SEQ ID NO:2.

En ciertas realizaciones de la descripción la unidad de marcaje consiste en los aminoácidos 5-70 de SEQ ID NO:2.

50 En ciertas realizaciones de la descripción la unidad de marcaje consiste en los aminoácidos 3-70 de SEQ ID NO:2.

En ciertas realizaciones de la descripción la unidad de marcaje consiste en los aminoácidos 1-70 de SEQ ID NO:2.

En ciertas realizaciones la proteína homodimérica no comprende los aminoácidos 1-70 de SEQ ID NO:2.

55 En ciertas realizaciones la unidad de marcaje consiste en no más de 68 aminoácidos, como 68, 67 o 66 aminoácidos.

En ciertas realizaciones la unidad de marcaje no contiene la secuencia de aminoácidos AP en las posiciones 1 y 2 de la unidad de marcaje.

60

En ciertas realizaciones la proteína homodimérica es una primera proteína homodimérica que ha aumentado su afinidad en comparación con la afinidad de una segunda proteína homodimérica. La segunda proteína homodimérica solo difiere de dicha primera proteína homodimérica en que tiene una unidad de marcaje, que consiste en los aminoácidos 1-70 de SEQ ID NO:2, y la afinidad aumentada es para cualquier receptor de quimiocina seleccionado de entre CCR1, CCR3 y CCR5. En ciertas realizaciones un vector comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención.

En ciertas realizaciones la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención está formulada para su administración a un paciente para provocar la producción de la proteína homodimérica en dicho paciente.

En ciertas realizaciones la vacuna o composición inmunoestimulante de acuerdo con la invención comprende un vehículo aceptable farmacéuticamente o adyuvante.

En ciertas realizaciones el cáncer tratado mediante una vacuna o composición inmunoestimulante o composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención es un mieloma múltiple o linforma, melanoma maligno, cánceres provocados por el VPH, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovarios o cáncer de hígado.

En ciertas realizaciones la enfermedad infecciosa tratada mediante una vacuna o composición inmunoestimulante o composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención se selecciona de entre la lista que consiste en gripe, herpes, CMV, VPH, HBV, brucelosis, VIH, HSV-2 y tuberculosis.

Realizaciones numeradas de la invención:

1. Una proteína homodimérica de dos cadenas idénticas de aminoácidos, cada cadena de aminoácidos comprende una unidad de marcaje que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 98% de identidad con la secuencia de aminoácidos 5-70 de SEQ ID NO:1, y una unidad antigénica. La unidad de marcaje y la unidad antigénica se conectan a través de un motivo de dimerización.

2. La proteína homodimérica de acuerdo con la realización 1, donde la unidad antigénica es un scFv antigénico.

3. La proteína homodimérica de acuerdo con las realizaciones 1 o 2, donde un conector, como un conector $(G_4S)_3$, conecta V_{H1} y V_{L1} en el scFv antigénico.

4. La proteína homodimérica de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-3, donde el scFv antigénico se deriva de una Ig monoclonal producida por células de mieloma o linfoma.

5. La proteína homodimérica de acuerdo con la realización 1, donde la unidad antigénica es una telomerasa o una parte funcional de la misma.

6. La proteína homodimérica de acuerdo con la realización 5, donde dicha telomerasa es hTERT.

7. La proteína homodimérica de acuerdo con la realización 1, donde la unidad antigénica se deriva de una bacteria.

8. La proteína homodimérica de acuerdo con la realización 7, donde la unidad antigénica derivada de una bacteria se selecciona de entre un antígeno de tuberculosis y un antígeno de brucelosis.

9. La proteína homodimérica de acuerdo con la realización 1, donde la unidad antigénica se deriva de un virus.

10. La proteína homodimérica de acuerdo con la realización 9, donde la unidad antigénica derivada de un virus se deriva de VIH.

11. La proteína homodimérica de acuerdo con la realización 10, donde la unidad antigénica derivada de VIH se deriva de gp120 o Gag.

12. La proteína homodimérica de acuerdo con la realización 9, donde la unidad antigénica se selecciona de entre la lista que consiste en HA, nucleoproteína y antígeno M2, y glicoproteína D de antígeno de herpes simple 2

13. La proteína homodimérica de acuerdo con la realización 1, donde la unidad antigénica es un antígeno asociado al cáncer o específico del cáncer.

14. La proteína homodimérica de acuerdo con la realización 13, donde la unidad antigénica de cáncer es un antígeno de melanoma, como la tirosinasa de antígenos de melanoma, TRP-1 o TRP2.

15. La proteína homodimérica de acuerdo con la realización 13, donde la unidad antigénica de cáncer es un antígeno de cáncer de próstata, como el antígeno de cáncer de próstata PSA.

16. La proteína homodimérica de acuerdo con la realización 13, donde la unidad antigénica de cáncer es un antígeno de cáncer de cuello uterino seleccionado de entre la lista que consiste en E1, E2, E4, E6, E7, L1 y L2.

17. La proteína homodimérica de acuerdo con cualquier realización de 1-16, donde el motivo de dimerización comprende una región bisagra y de forma opcional otro dominio que facilita la dimerización, como un dominio de inmunoglobulina, conectado opcionalmente a través de un conector.

18. La proteína homodimérica de acuerdo con la realización 17, donde la región bisagra se deriva de Ig, como derivada de IgG3.

19. La proteína homodimérica de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 17-18, donde la región bisagra tiene la habilidad de formar uno, dos o varias uniones covalentes.

20. La proteína homodimérica de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 17-19, donde la unión covalente es un puente disulfuro.
21. La proteína homodimérica de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 17-20, donde el dominio de inmunoglobulina del motivo de dimerización es un dominio carboxi-terminal C, o una secuencia sustancialmente homóloga a dicho dominio C.
22. La proteína homodimérica de acuerdo con la realización 21, donde el dominio carboxi-terminal C se deriva de IgG.
23. La proteína homodimérica de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 17-22, donde el dominio de inmunoglobulina del motivo de dimerización tiene la habilidad de homodimerizar.
24. La proteína homodimérica de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 17-23, donde dicho dominio de inmunoglobulina tiene la habilidad de homodimerizar mediante interacciones no covalentes.
25. La proteína homodimérica de acuerdo con la realización 24, donde dichas interacciones no covalentes son interacciones hidrofóbicas.
26. La proteína homodimérica de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-25, donde dicho dominio de dimerización no comprende el dominio CH2.
27. La proteína homodimérica de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-26, donde el motivo de dimerización consiste en exones bisagra h1 y h4 conectados a través de un conector a un dominio C_H3 de IgG3 humana.
28. La proteína homodimérica de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 17-27, donde dicho conector es un conector G₃S₂G₃SG.
29. La proteína homodimérica de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-28, donde dicha unidad antigénica y el motivo de dimerización están conectados a través de un conector, como un conector GLSGL.
30. La proteína homodimérica de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-29, donde dicha unidad de marcaje comprende los aminoácidos 3-70 de SEQ ID NO:1.
31. La proteína homodimérica de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-29, donde dicha unidad de marcaje consiste en los aminoácidos 5-70 de SEQ ID NO:1.
32. La proteína homodimérica de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-29, donde dicha unidad de marcaje consiste en los aminoácidos 3-70 de SEQ ID NO:1.
33. La proteína homodimérica de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-30, donde dicha unidad de marcaje consiste en los aminoácidos 1-70 de SEQ ID NO:1.
34. La proteína homodimérica de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-29, cuya proteína homodimérica no comprende los aminoácidos 1-70 de SEQ ID NO:2.
35. La proteína homodimérica de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-32, 35-37, donde cada unidad de marcaje consiste en no más de 68 aminoácidos, como 68, 67 o 66 aminoácidos.
36. La proteína homodimérica de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-30, 35, donde dicha unidad de marcaje no contiene la secuencia de aminoácidos AP en las posiciones 1 y 2 de la unidad de marcaje.
37. Una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína monomérica que puede formar la proteína homodimérica de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-42.
38. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con la realización 43 comprendida por un vector.
39. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con las realizaciones 43 o 44 formulada para su administración a un paciente para provocar la producción de la proteína homodimérica en dicho paciente.
40. La proteína homodimérica de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-42 o la molécula de ácido nucleico de acuerdo con las realizaciones 43 o 44 para su uso como medicamento.
41. Una composición farmacéutica que comprende la proteína homodimérica de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-42 o la molécula de ácido nucleico de acuerdo con las realizaciones 43 o 44.
42. Una célula huésped que comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con las realizaciones 43 o 44.
43. Un procedimiento para preparar una proteína homodimérica de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-42, procedimiento que comprende
- a) transfectar la molécula de ácido nucleico de acuerdo con las realizaciones 43 o 44 en una población celular;
 - b) cultivar la población celular;
 - c) recoger y purificar la proteína homodimérica expresada de la población celular.
44. Una vacuna contra un cáncer o una enfermedad infecciosa que comprende una cantidad inmunológicamente efectiva de una proteína homodimérica de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-42 o molécula de ácido nucleico de acuerdo con las realizaciones 43 o 44 que codifican la proteína monomérica que puede formar la proteína homodimérica, donde dicha vacuna puede desencadenar una respuesta inmune tanto de células T como de células B y donde dicha proteína homodimérica contiene una unidad antigénica específica para dicho cáncer o enfermedad infecciosa.
45. La vacuna de acuerdo con la realización 50 que comprende además un vehículo o adyuvante farmacéuticamente aceptable.
46. La vacuna de acuerdo con las realizaciones 50 a 51, donde dicho cáncer es mieloma múltiple o linfoma, melanoma maligno, cánceres provocados por el VPH, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovarios o cáncer de hígado.

47. La vacuna de acuerdo con la realización 50 o 51, donde dicha enfermedad infecciosa se selecciona de entre la lista que consiste en tuberculosis, gripe, herpes, CMV, VPH, HBV, brucelosis, VIH o HSV-2.

EJEMPLO 1

5

Ratones y líneas celulares

Se obtuvieron ratones BALB/c de Taconic (Ry, Dinamarca). Se han descrito los ratones transgénicos TCR específicos de $I\delta(\lambda 2^{315})$ (verBogen B y col. Eur J Immunol 1992 Mar;22(3):703-9ySnodgrass HR y col. Eur J Immunol 1992 Aug;22(8):2169-72). El TCR reconoce los aa 91-101 de la cadena ligera $\lambda 2^{315}$, producida por el plasmacitoma de ratón de IgA MOPC315, presentado en las moléculas de clase II I-E^d. Los estudios fueron aprobados por el Comité nacional para los experimentos con animales (Oslo, Noruega). Las células MOPC 315.4 (IgA, $\lambda 2^{315}$), HEK 293 y HEK 293E procedían de ATCC. Las células HEK 293 transfectadas de forma estable con hCCR5 y hCCR1 fueron amablemente proporcionadas por Mario Mellado (Madrid, España) y Zack Howard (Frederick, MD), respectivamente. Las células HEK 293 transfectadas de forma estable con macaco Rhesus (GenBank AF005660) se obtuvieron de Pfizer Inc, (Groton, CT). Las células de linfoma de murinos Esb/MP fueron amablemente proporcionadas por Jo Van Damme (Lovaina, Bélgica).

Clonado de MIP1a/CCL3 (vaccicuerpos que codifican LD78 α o LD78 β)

20

Genes que codifican LD78 α y LD78 β maduros(GenBank NM_002983 y NG_004113, respectivamente) se ampliaron de cADN de monocitos enriquecidos con CD14 derivados de la médula ósea de un donante sano. Cebadores directos (sitio de restricción *BsmI* en cursiva):

25

LD78 α : GGTGTGCATTCCGCATCACTTGCTGCTGAC (SEQ ID NO:3);
LD78 β : GGTGTGCATTCCGCACCACTTGCTGCTGAC (SEQ ID NO:4);
y cebador inverso (sitio de restricción *BsmI/WI* en cursiva) era GACGTACGACTCACCTGCAACTCAGCTCCAGGTC (SEQ ID NO:5). LD78 β -2 de 68 aa. de longitud (3-70) se clonó usando el cebador directo (sitio de restricción *BsmI* en cursiva): GGTGTGCATTCCCTTGCTGCTGACACGCC (SEQ ID NO:6).

30

Las mutaciones puntuales LD78 α y LD78 β que llevan un residuo S en lugar de un residuo C en la posición 11 se generaron mediante PCR de cambio rápido utilizando los siguientes cebadores: CCGACCGCCTCCTGCTTCAG directo (SEQ ID NO: 7) e inverso CTGAAGCAGGAGGCGGTCGG (SEQ ID NO: 8) Los genes de quimiocina amplificados se insertaron en la cassette del constructo de vaccicuerpos llhFpLNOH2 (verFredriksen AB y col. Mol Ther 2006 Abr;13(4):776-85)mediante la utilización de sitios de restricción*BsmI/BsiWI*. El constructo de vaccicuerpo resultante codificado para proteínas homodiméricas con unidades de marcaje derivadas de hCCL3 y scFv MOPC315 en una orientación VH-VL como unidad antigénica, conectada mediante un motivo homodimerizador que consiste en exones bisagra humanos h1 y h4 y domino CH3 de IgG3.

40

La unidad antigénica (scFv³¹⁵) en vaccicuerpos ya descrita se intercambió con dominios emparejados de Ck de murinos (Tunheim G y col. Vaccine 2007 Jun 11;25(24):4723-34) o HA de H1N1 A/Puerto Rico/8/34 (Mt. Sinai) (G. Grødeland, manuscrito en preparación)

Evaluación de producción de proteínas de vacuna

45

Los sobrenadantes de células 293E transfectadas temporalmente se probaron en los siguientes vaccicuerpos de ELISAs. scFv³¹⁵: DNP-BSA (se une a M315) como cubierta y HP6017 monoclonal biotinilado (motivo de dimerización anti-CH3) para detección; vaccicuerpos HA: MCA878G (motivo de dimerización anti-CH3) como cubierta y anticuerpo monoclonal biotinilado H36-4-52 para detección; vaccicuerpos CkCk de ratón: Anticuerpo monoclonal 187,1 (se une a Ck de ratón) como cubierta y 187,1 biotinilado para detección.

50

Producción, purificación, cuantificación y caracterización proteómica de proteínas de vaccicuerpo

Se purificaron por afinidad proteínas de vaccicuerpo que tienen scFv³¹⁵como unidad antigénica de sobrenadantes de células NS0 transfectadas de forma estable en columnas de sefarosa DNP (unidas por M315). Las proteínas purificadas se cargaron en un gel de tris-glicina 4-20 %. Tras la transferencia de membrana, se detectaron proteínas con HP6017 biotinilado o anticuerpos monoclonales Ab2-1,4 (se une a M315) seguidos de HRP de estreptavidina. Las proteínas de vaccicuerpo se cuantificaron mediante Bradford y ELISA utilizando vaccicuerpos BSA y mCCL3 (verFredriksen AB y col. Mol Ther 2006 Apr;13(4):776-85)como estándares, respectivamente. Las bandas de proteína que correspondía a los vaccicuerpos LD78 β y LD78 β -2 con Fv³¹⁵ se extirparon de un gel de poliácridamida teñido de

55

60

Coomassie y sujeto a digestión de gel de tripsina, como ya se ha descrito.

Unión a CCR5 y CCR1 humanas y de murinos

- 5 Se usaron proteínas de vaccicuerpos en concentraciones de 0,2 a 25 µg/ml para teñir células HEK 293 parentales o transfectadas de forma estable o esplenocitos BALB/c (habilitados mediante FSC/SSC y en células CD11b+ CD3-). Las proteínas se detectaron mediante HP6017 biotinilado (se une a CH3 de hlgG3) o anticuerpos monoclonales Ab2-1.4 (se une a M315) seguidos de estreptavidina-PE. Las células se analizaron en FACScalibur.

10 Ensayo de quimiotaxis

Se evaluó la migración celular *in vitro* mediante una placa transwell de 24 pocillos (Corning) como se ha descrito anteriormente. Se usaron membranas de policarbonato poroso de 8 µm o 5 µm para células HEK 293 y Esb / MP, respectivamente. Las quimiocinas recombinantes eran de Peprotech. Los resultados (media ± SE de muestras duplicadas) se presentan como un índice quimiotáctico, definido como el aumento de veces en el número de células que migran en presencia de factores quimiotácticos sobre la migración celular espontánea (es decir, en presencia de medio solo).

Ensayos de estimulación de la célula T

20

Se irradiaron esplenocitos BALB/c (8 Gy) y se mezclaron con proteínas de vaccicuerpo que contenían scFv³¹⁵ en concentraciones de 20 to 0,04 µg/mL antes de añadir células Th2 específicas de Id³¹⁵ polarizadas *in vitro* derivadas de ratones transgénicos TCR. Se usó un péptido Id correspondiente a la secuencia 89-107 de λ2³¹⁵ como control positivo.

- 25 Se mezcló PBMC humano de tres donantes sanos DR4*01 con sobrenadantes de células 293E transfectadas temporalmente, que contenían proteínas de vaccicuerpo con CkCk de ratón como unidad antigénica, antes de la irradiación (20 Gy) y adición del clon de la célula T T18 que reconoce los aa. 40-48 de Ck de murino presentado mediante DR4*01. Después de 48 horas las placas se pulsaron con timidina ³H 24 horas antes de la cosecha.

30 Inmunizaciones de ratón

El ADN de vaccicuerpo se purificó utilizando el sistema de purificación de plásmidos Endofree-mega (Qiagen). Se inyectaron por vía intradérmica 25 µl de solución de 0,5 mg/ml de ADN de vaccicuerpo en NaCl 0,9 % estéril en la parte inferior de la espalda de los ratones, en ambos lados, seguido de electroporación con Dermavax (Cytopulse, Suecia). Los grupos consistían en 3 a 7 ratones.

35

Medida de anticuerpos anti-Id315

Los ratones fueron sangrados tres, cuatro y seis semanas después de una única inmunización. La proteína de mieloma M315 (IgA, λ2) se usó como cobertura y se detectaron anticuerpos anti-Id³¹⁵ en los sueros de ratón mediante IgG1^a anti-ratón biotinilada o IgG2a^a anti-ratón (BD Pharmingen). Se calcularon los títulos del punto final.

40

Ensayo Elispot

- 45 Las placas Multiscreen de Millipore (Millipore, Billerica, MA, EE. UU.) se recubrieron con IFNγ anti-ratón (AN18) (12 µg/ml) y después se bloquearon durante 2 h con RPMI-1640 (Invitrogen, NY, EE. UU.) que contenía un 10 % de FCS. Los esplenocitos unicelulares se prepararon de forma individual a partir de ratones vacunados con ADN 3 semanas antes con vaccicuerpos que contenían HA o NaCl, y se incubaron durante la noche a 10⁶, 5x10⁵ y 2,5x10⁵ células/pocillo con uno de los siguientes péptidos derivados de HA de Prolimmune (Oxford, Reino Unido):
- 50 SVSSFERFEIPK (aa. 107-119, restringido a I-E^d), HNTNGVTAACSHEG (aa. 126-138, restringido a I-A^d) o IYSTVASSL (aa. 633-641, restringido a K^d). Las placas se lavaron en PBS y las células adherentes se lisaron mediante una incubación de cinco minutos en agua desionizada antes de la incubación con IFNγ anti-ratón biotinilado (1 µg/ml) (XMG1.2, Pharmingen) y conjugado de fosfatasa alcalina estreptavidina (1:3000) (GE Healthcare, Little Chalfont Buckinghamshire, Reino Unido). Se detectaron células productoras de IFNγ mediante el kit BCIP/NBT (Zymed
- 55 Laboratories Inc, Carlsbad, CA, EE. UU.) y se realizó el recuento con la versión 4.3.56 de KS EliSpot de Zeiss en un sistema de imágenes Zeiss Axioplan 2 (objetivo: Epiplan-Neofluar 5x, 442320).

Vacunación de ratones con constructos de vaccicuerpos HA.

- 60 Se anestesió, afeitó y vacunó intradérmicamente a los ratones con 25 µl de ADN (0,5 mg/ml) en ambos lados de la

zona inferior de la espalda, inmediatamente después se realizó la electroporación en la piel (DermaVax/CytoPulse). 14 días después, se anestesió a los ratones con hypnorm/dormicum y se les expuso a 20 μ l del virus (5xLD50) de la gripe (A/Puerto Rico/8/34 (Mt. Sinai). Tras la exposición, se pesó a los ratones y se los supervisó de cerca en busca de signos clínicos.

5

Construcción y expresión de vaccicuerpos humanos basados en CCL3

Se construyeron vaccicuerpos homodiméricos con varias unidades de marcaje basadas en hCCL3, una unidad de homodimerización humana derivada de Ig y varias unidades antigénicas, como se indica en la Fig. 1A. La secuencia de NH₂ terminal de aa. de los LD78 α , LD78 β , LD78 β -2 y el efecto putativo de la mutación puntual C11S en la estructura de quimiocina LD78 β (C11S) se muestran en las Fig. 1B y 1C, respectivamente. Todos los vaccicuerpos se expresaron a niveles comparables por células 293E transfectadas temporalmente, excepto los vaccicuerpos LD78 β -2 que fueron expresados consistentemente en un grado menor (Fig. 2 A-C).

15 La integridad de las proteínas de vaccicuerpos que tienen scFv³¹⁵ como unidad antigénica se probó mediante SDS-PAGE, donde se observaron bandas únicas de aproximadamente 110 kDa que, después de la transferencia de la membrana, podrían teñirse con anticuerpos monoclonales apropiados (Fig. 2D y datos no mostrados para otros constructos). El tamaño aumentado en apariencia del vaccicuerpo mutado (C11S) se debe probablemente a un aumento en el radio de Stokes debido a la anulación de un enlace S-S (Fig. 1C). Bajo condiciones reductoras, se observaron bandas únicas de alrededor de 55 kDa, correspondientes a monómeros, como se esperaba (datos no mostrados).

La secuencia de NH₂ terminal de aa. de proteínas de vaccicuerpo LD78 β se determinó aún más, ya que las células NS0 o el suero bovino fetal en el cultivo podrían tener actividad de CD26, lo que resultaría en una modificación postraslacional de LD78 β . El análisis de las digestiones tripticas de las proteínas de vaccicuerpos LD78 β 1hF y LD78 β -21hF mediante espectrometría de masas MALDI-TOF mostró señales exclusivas en m/z 1988,89 y m/z 1820,78, que corresponden a los péptidos N terminales APLAADTPTACCFSTSR (SEQ ID NO: 9) y LAADTPTACCFSTSR (SEQ ID NO: 10), respectivamente (datos no mostrados). Así, los vaccicuerpos de LD78 β de longitud completa pura o LD78 β -2 truncados con NH₂ pueden expresarse y purificarse a partir de células NS0 transfectadas de forma estable.

30

Los vaccicuerpos LD78 β y la versión truncada con NH₂ unen receptores de quimiocina humanos y de murinos

Dada la variabilidad en la expresión de CCR5 entre individuos, se usaron HEK 293 transfectadas de forma estable con hCCR5, en lugar de PBMC, para estudios funcionales. El vaccicuerpo LD78 β y LD78 β -2, pero no su homólogo de mutación puntual, se unieron a células HEK 293 transfectadas con hCCR5 (Fig. 3A, B y datos no mostrados). El vaccicuerpo LD78 β -2 truncado con NH₂ mostró una unión más fuerte que el vaccicuerpo de longitud completa LD78 β . El vaccicuerpo de mutación puntual LD78 β (C11S) no unió células transfectadas con hCCR5 (Fig. 3A). Los vaccicuerpos LD78 β -2, pero no los LD78 β , también unieron las células HEK 293 que expresan hCCR1 (Fig. 3C, D y datos no mostrados), lo que concuerda con informes anteriores. No hubo tinción de células HEK 293 no transfectadas y parentales (no mostrado).

40

El vaccicuerpo LD78 β , pero no su homólogo de mutación puntual, unió los esplenocitos CD11b + BALB/c (Fig. 4 A), y la quimiotaxis inducida de células Esb/MP (Fig. 4 B), proporcionando así la justificación para probar vaccicuerpos que expresan LD78 β en ratones.

45

La entrega de antígeno a APC a través de los receptores de quimiocina mejora las respuestas de células T in vitro en sistemas de ratones y humanos

Los esplenocitos BALB/c mezclados con vaccicuerpos de LD78 β que expresan la unidad antigénica scFv³¹⁵ provocaron la proliferación de células Th2 específicas de Id³¹⁵ de ratones transgénicos TCR (Fig. 5 A). Los vaccicuerpos similares en los que se había introducido la mutación C11S tenían una reducción de la capacidad de aproximadamente 100 veces para estimular las células T. Cuando se compararon las concentraciones equimolares del vaccicuerpo LD78 β y un péptido Id que abarca las mutaciones de CDR3, se demostró que el vaccicuerpo era hasta 30 veces más efectivo que el péptido al cargar las APC para la presentación de antígenos (no mostrado).

55

En lo que respecta a las respuestas de células T humanas, los vaccicuerpos LD78 β que expresan CkCk de murino como antígeno modelo se mezclaron con los PBMC de donantes y se clonaron células T T18 CD4+ que reconocen 40-48 aa de Ck de murino en el contexto de DR4*01. La diferencia entre el tipo silvestre y la mutación puntual LD78 β era menos pronunciada que en el sistema del ratón (Fig. 5 B). Además, la entrega dirigida de antígenos queda demostrada mediante la superioridad de LD78 β sobre los vaccicuerpos no dirigidos específicos de NIP (Fig. 5B). De

60

forma importante, los vaccicuerpos LD78 β -2 superaron a los vaccicuerpos LD78 β . Se obtuvieron resultados similares mediante el uso de tres donantes diferentes (no mostrado).

Respuesta humoral anti-Id mejorada provocada en ratones por vaccicuerpos LD78 β que contienen scFv³¹⁵

5 El V_H+ V_LId de la proteína del mieloma M315 es un antígeno muy débil, de hecho se requiere un extenso esquema de inmunización que incluye múltiples inmunizaciones con adyuvante completo e incompleto de Freund para detectar anticuerpos anti-Id. Por lo tanto, comprobamos si los ratones que habían recibido una inyección intradérmica con ADN de vaccicuerpo LD78 β scFv315, combinada con electroporación, desarrollaban anticuerpos anti-Id. Se detectaron
10 respuestas anti-Id³¹⁵IgG1 (Fig. 6A) e IgG2a (Fig. 6B) en ratones que habían sido inmunizados con vaccicuerpos que codifican LD78 β , lo que demuestra además que la integridad conformacional de scFv³¹⁵ se mantiene en el vaccicuerpo de LD78 β (figura 6). Las respuestas de IgG1 se registraron en un grado significativamente menor en ratones que recibieron el vaccicuerpo de mutación puntual C11S, mientras que la diferencia para IgG2a no fue significativa. Además, se observaron respuestas de anticuerpos significativamente menores en términos estadísticos para IgG1 y
15 IgG2a en ratones que habían sido inmunizados con vaccicuerpos de control no marcados (anti-NIP). Este resultado general sugiere que la entrega marcada de antígenos mejora las respuestas de anticuerpos a un antígeno tumoral automodelo débil.

Provocación de respuestas de células T CD4+ y CD8+ específicas de hemaglutinina en ratones después de la administración de vaccicuerpos

Se investigó la provocación de respuestas de células T CD8+ en un modelo de gripe donde la hemaglutinina (HA) servía como antígeno diana. Se sabe que la HA de la cepa A/Puerto Rico/8/34 (Mt.Sinai) (H1N1) expresa tres epítomos a los que responden los ratones BALB/c (H-2^d). Dos de estos son MHC restringidos a clase II, SVSSFERFEIPK (SEQ ID NO:11) (aa. 107-119) restringido por I-E^d y HNTNGVTAACSHEG (SEQ ID NO:12) (aa. 126-138) restringido por I-A^d, respectivamente. El tercer epítomo, IYSTVASSL (SEQ ID NO:13) (aa. 633-641), es MHC restringido a clase I (K^d). Después de una única inmunización y electroporación de ADN de vaccicuerpo LD78 β intradérmico, se observó un aumento significativo de las respuestas de IFN γ al epítomo de clase I para los anticuerpos marcados frente a los no marcados (C11S) y la inmunización simulada (NaCl) (Fig. 7A). Las respuestas a los epítomos se elevaron ligeramente pero el efecto del marcaje no fue significativo (sólo se produjo una inmunización en los presentes experimentos) (Fig. 7 A).
30

El vaccicuerpo LD78 β une CCR5 de macaco Rhesus

35 CCR5 se conserva a través de diferentes especies, incluido el mono. Los genes CCR5 humanos y de macaco tienen una homología de aa. muy parecida (98 %). Igual que los humanos, los macacos tienen dos isoformas CCL3. Los vaccicuerpos LD78 β y LD78 β -2 se unieron de manera dependiente de la dosis a las células HEK 293 que expresan CCR5 de macaco Rhesus, mientras que el LD78 β con mutación puntual C11S no se unió a las mismas células (Fig. 8, y los datos no se muestran). Este resultado indica que los vaccicuerpos con LD78 β y LD78 β -2 destinados al uso humano no sólo se pueden probar en ratones, como ya se ha mencionado, sino también en macacos Rhesus, antes de su aplicación en humanos.

El vaccicuerpo LD78 β -HA protege a los ratones de la gripe, pero no el vaccicuerpo LD78 β -2-HA.

45 Como se muestra en la Fig. 9, los ratones se vacunaron con una de las dos formas de LD78 β , LD78 β o LD78 β -2. La versión entera de LD78 β demostró tener un efecto superior en términos de protección de los ratones de la infección por gripe.

SECUENCIAS:

50 LD78 β (SEQ ID NO:1)
APLAADTPTACCFSYTSRQIPQNFADYFETSSQCCKPSVIFLTKRGRQVCADPSEEWVQKYVSDLELSA
LD78 α (SEQ ID NO:2)
ASLAADTPTACCFSYTSRQIPQNFADYFETSSQCCKP~~G~~VIFLTKR~~S~~RQVCADPSEEWVQKYVSDLELSA
55

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Vaccicuerpo AS
 <120> CONSTRUCTOS DE PROTEÍNA HOMODIMÉRICA
 5 <130> 18314PCT00
 <160> 13
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 70
 10 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1

```

Ala Pro Leu Ala Ala Asp Thr Pro Thr Ala Cys Cys Phe Ser Tyr Thr
1          5          10          15
Ser Arg Gln Ile Pro Gln Asn Phe Ile Ala Asp Tyr Phe Glu Thr Ser
20          25          30
Ser Gln Cys Ser Lys Pro Ser Val Ile Phe Leu Thr Lys Arg Gly Arg
35          40          45
Gln Val Cys Ala Asp Pro Ser Glu Glu Trp Val Gln Lys Tyr Val Ser
50          55          60
Asp Leu Glu Leu Ser Ala
65          70
    
```

15
 <210> 2
 <211> 70
 <212> PRT
 20 <213> Homo sapiens
 <400> 2

```

Ala Ser Leu Ala Ala Asp Thr Pro Thr Ala Cys Cys Phe Ser Tyr Thr
1          5          10          15
Ser Arg Gln Ile Pro Gln Asn Phe Ile Ala Asp Tyr Phe Glu Thr Ser
20          25          30
Ser Gln Cys Ser Lys Pro Gly Val Ile Phe Leu Thr Lys Arg Ser Arg
35          40          45
Gln Val Cys Ala Asp Pro Ser Glu Glu Trp Val Gln Lys Tyr Val Ser
50          55          60
Asp Leu Glu Leu Ser Ala
65          70
    
```

25
 <210> 3
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador de ADN

 <400> 3
 5 ggtgtgcatt ccgcatcact tgctgctgac 30

 <210> 4
 <211> 30
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de ADN

 <400> 4
 15 ggtgtgcatt ccgcaccact tgctgctgac 30

 <210> 5
 <211> 34
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de ADN

 <400> 5
 25 gacgtacgac tcacctgcaa ctgagctcca ggtc 34

 <210> 6
 <211> 29
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de ADN

 <400> 6
 35 ggtgtgcatt cccttgctgc tgacacgcc 29

 <210> 7
 <211> 20
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de ADN

 <400> 7
 45 ccgaccgcct cctgcttcag 20

 <210> 8
 <211> 20
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de ADN

 <400> 8
 55 ctgaagcagg aggcggtcgg 20

 <210> 9
 <211> 18
 <212> PRT
 60 <213> Homo sapiens

ES 2 706 058 T3

<400> 9

Ala Pro Leu Ala Ala Asp Thr Pro Thr Ala Cys Cys Phe Ser Tyr Thr
1 5 10 15

Ser Arg

5

<210> 10

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 10

Leu Ala Ala Asp Thr Pro Thr Ala Cys Cys Phe Ser Tyr Thr Ser Arg
1 5 10 15

15 <210> 11

<211> 12

<212> PRT

<213> Virus de la grippe A

20 <400> 11

Ser Val Ser Ser Phe Glu Arg Phe Glu Ile Pro Lys
1 5 10

<210> 12

25 <211> 14

<212> PRT

<213> Virus de la grippe A

<400> 12

30

His Asn Thr Asn Gly Val Thr Ala Ala Cys Ser His Glu Gly
1 5 10

<210> 13

<211> 9

35 <212> PRT

<213> Virus de la grippe A

<400> 13

40

Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu
1 5

REIVINDICACIONES

1. Una proteína homodimérica de dos cadenas idénticas de aminoácidos, cada cadena de aminoácidos comprende una unidad de marcaje que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 98 % de identidad con la secuencia de aminoácidos 5-70 de SEQ ID NO:1, y una unidad antigénica. La unidad de marcaje y la unidad antigénica se conectan a través de un motivo de dimerización.
2. La proteína homodimérica de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicha unidad de marcaje comprende los aminoácidos 3-70 de SEQ ID NO:1.
3. La proteína homodimérica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde la unidad antigénica es un scFv antigénico, o una telomerasa, o una parte funcional de la misma, como hTERT.
4. La proteína homodimérica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde la unidad antigénica se deriva de una bacteria, como un antígeno de tuberculosis y un antígeno de brucelosis.
5. La proteína homodimérica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde la unidad antigénica se deriva de un virus, como derivada de VIH, como derivada de gp120 o Gag, o seleccionada de la lista que consiste en virus HA, nucleoproteína, antígeno M2, glicoproteína D de antígeno de herpes simple 2; y un antígeno de virus del papiloma humano, como cualquiera seleccionado de entre la lista que consiste en E1, E2, E6, E7, L1 y L2.
6. La proteína homodimérica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde la unidad antigénica es un antígeno específico de cáncer, como un antígeno de melanoma, como la tirosinasa de antígeno de melanoma, TRP-1 o TRP2, o un antígeno de cáncer de próstata, como el antígeno de cáncer de próstata PSA, o del virus del papiloma humano, como el antígeno de cáncer de cuello de útero seleccionado de entre la lista que consiste en E1, E2, E4, E6 y E7.
7. La proteína homodimérica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde el motivo de dimerización comprende una región bisagra, como una región bisagra derivada de Ig, como derivada de IgG3, y de forma opcional otro dominio que facilita la dimerización, como un dominio de inmunoglobulina, conectado opcionalmente a través de un conector.
8. Una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína monomérica que puede formar la proteína homodimérica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, como una molécula de ácido nucleico comprendida por un vector.
9. La proteína homodimérica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7 o la molécula de ácido nucleico de acuerdo con las la reivindicación 8 para su uso como medicamento.
10. Una composición farmacéutica que comprende la proteína homodimérica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7 o la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 8.
11. Una célula huésped que comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 8.
12. Un procedimiento para preparar una proteína homodimérica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, procedimiento que comprende
 - a) transfectar la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 8 en una población celular;
 - b) cultivar la población celular;
 - c) recoger y purificar la proteína homodimérica expresada de la población celular.
13. Una vacuna contra un cáncer o una enfermedad infecciosa que comprende una cantidad inmunológicamente efectiva de una proteína homodimérica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7 o molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 8 que codifica la proteína monomérica que puede formar la proteína homodimérica, donde dicha vacuna puede desencadenar una respuesta inmune tanto de células T como de células B y donde dicha proteína homodimérica contiene una unidad antigénica específica para dicho cáncer o enfermedad infecciosa.

Figura 1

A

unidad de marcaje:

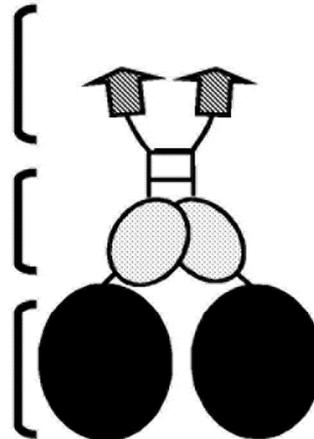
- 1) isoformas hCCL3
- 2) scFv de anticuerpo monoclonal específico de NIP

unidad de dimerización:

exones h1+h4 y hy3 CH3

unidad antigénica:

- 1) scFv de plasmocitoma MOPC315 de ratón
- 2) dominios Ck de ratón emparejados
- 3) hemaglutinina de gripe



B

LD78 α	ASLAADTPTACC
LD78 β	AP.....
LD78 β -2	- - LA.....
LD78 β (C11S)	APLAADTPTASC

C

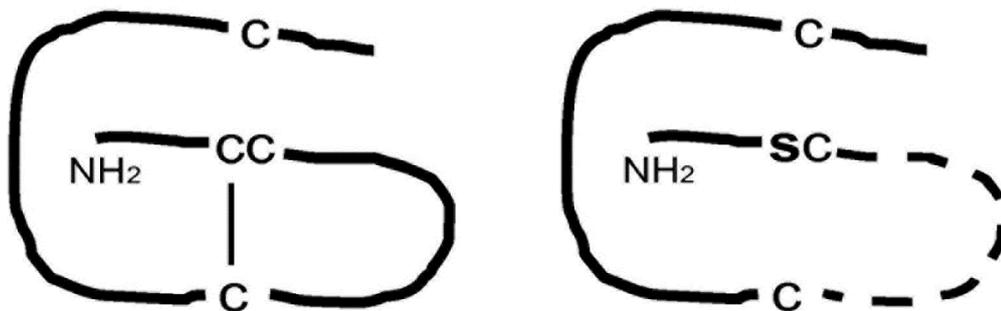
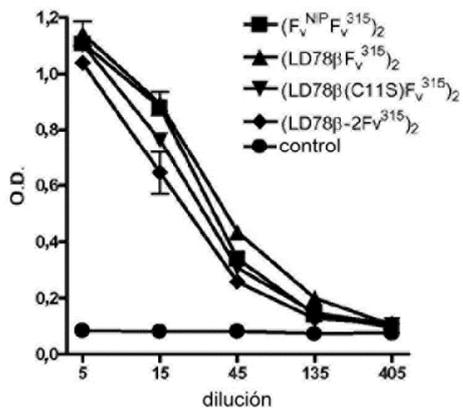
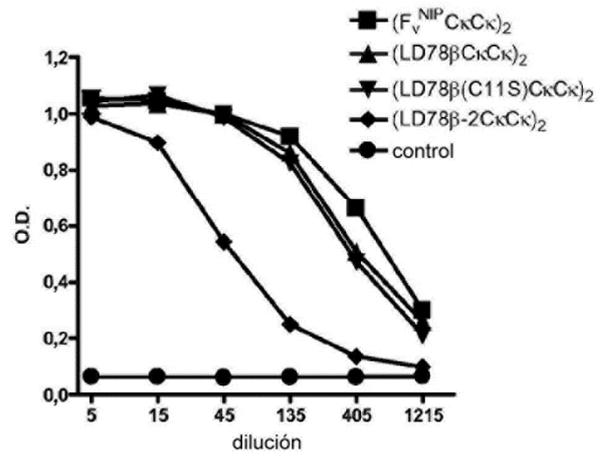


Figura 2

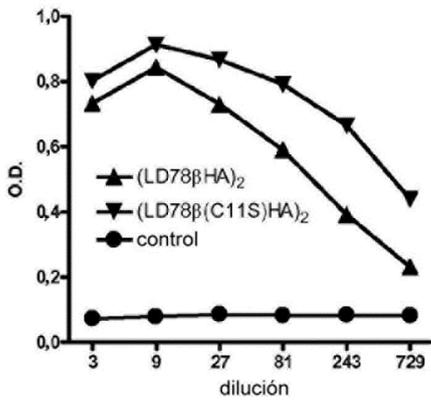
A



B



C



D

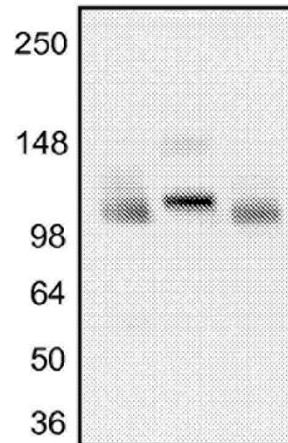


Figura 3

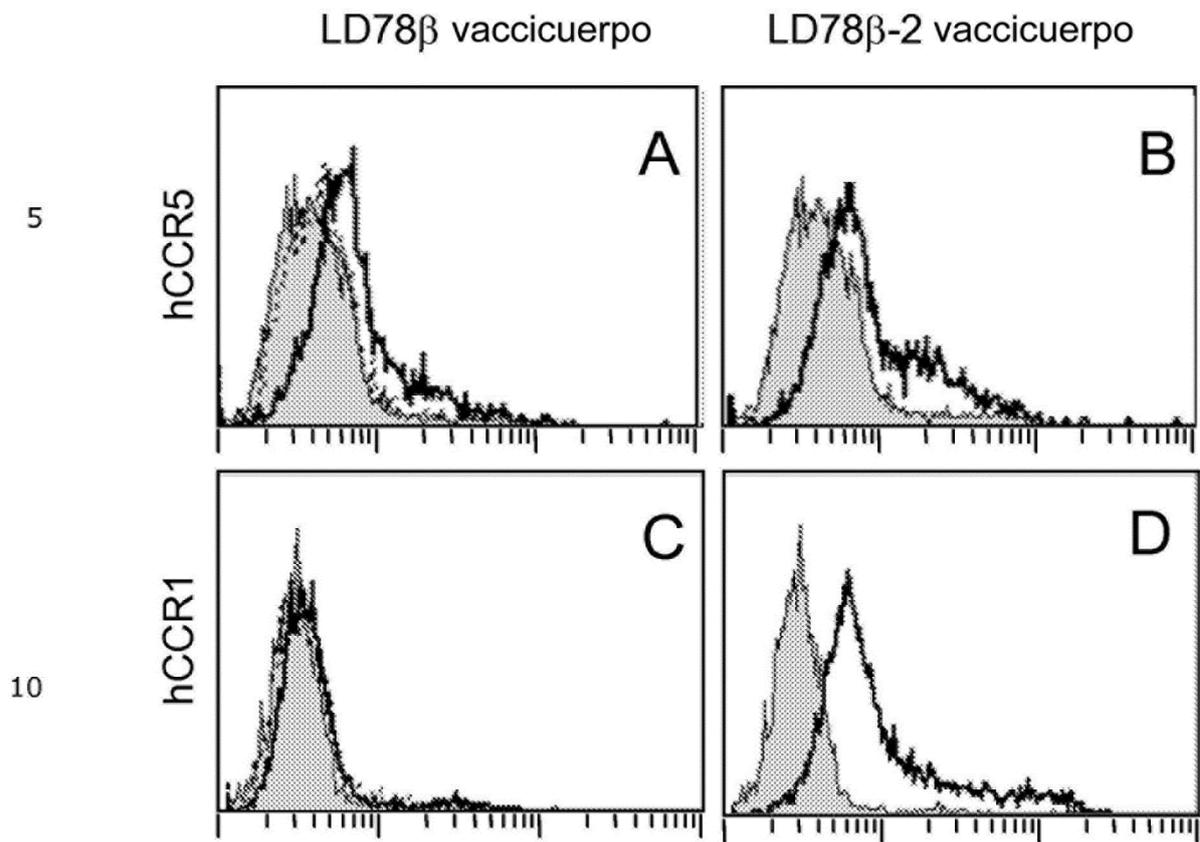
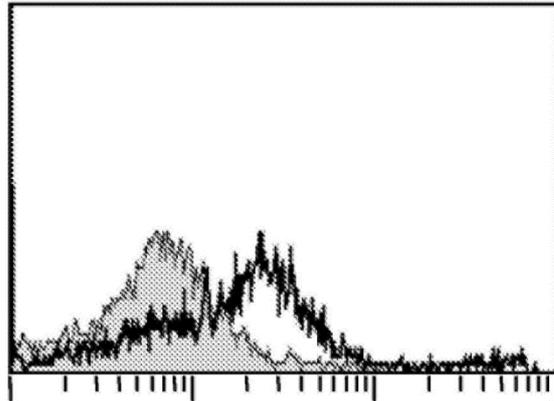


Figura 4

A



B

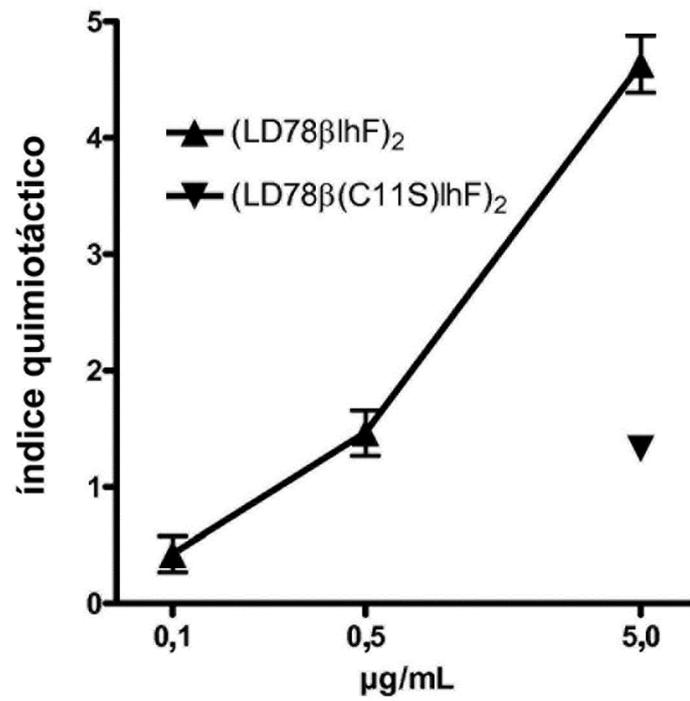


Figura 5

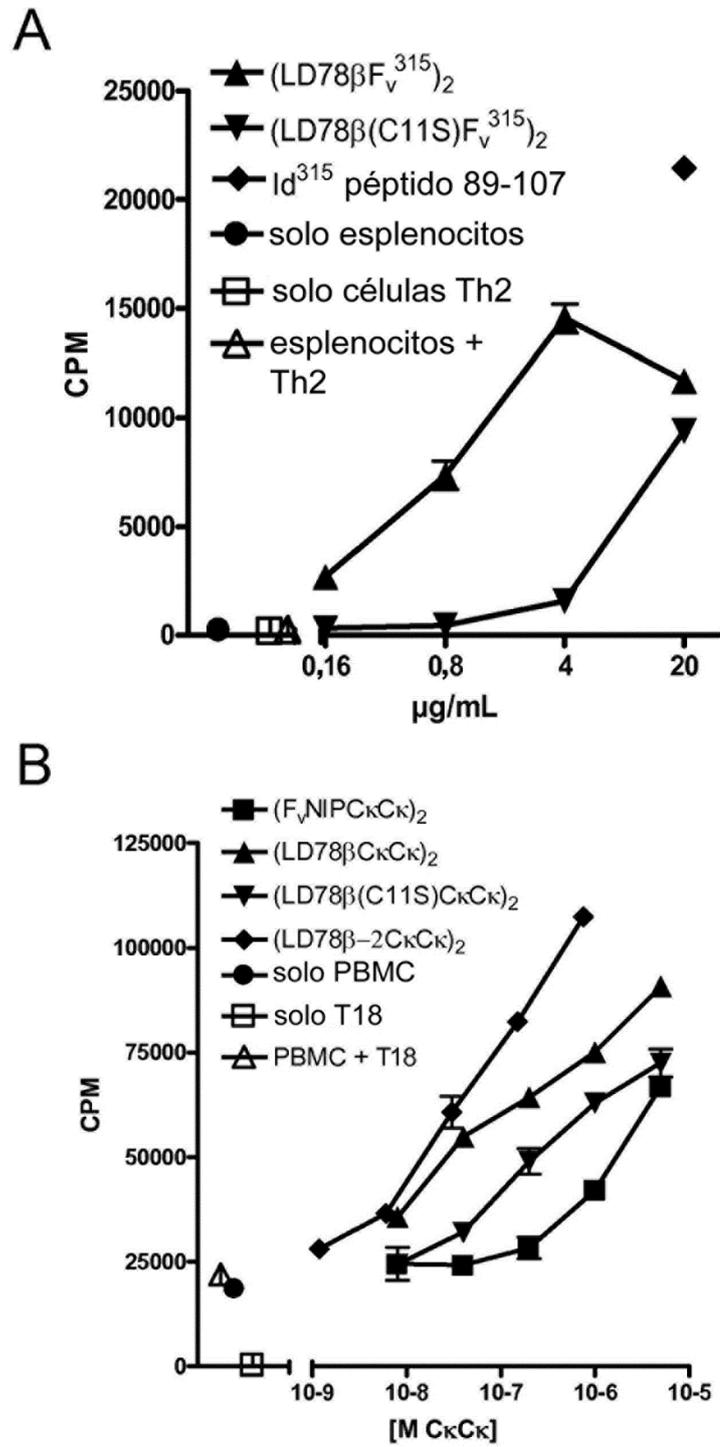


Figura 6

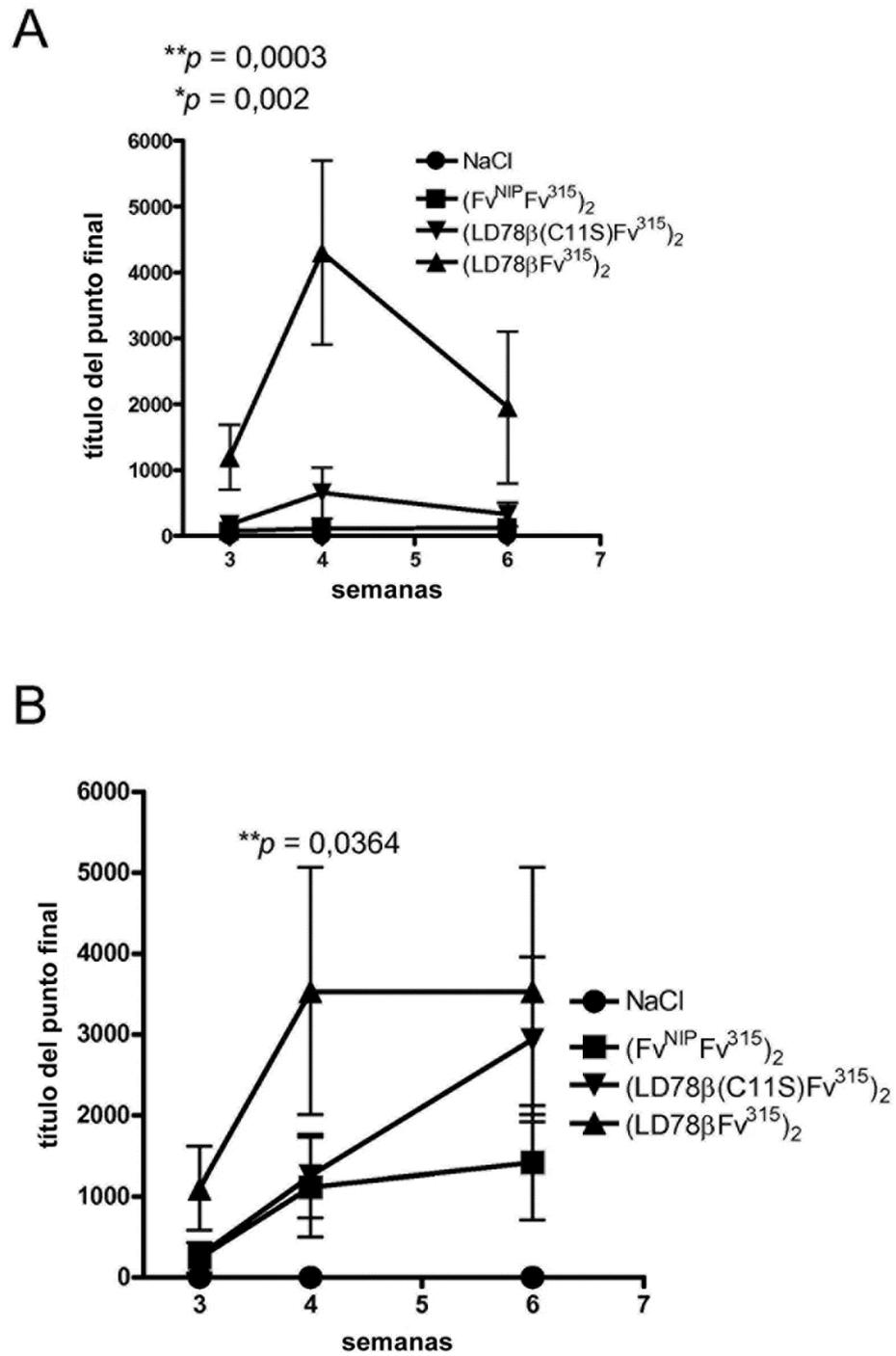


Figura 7

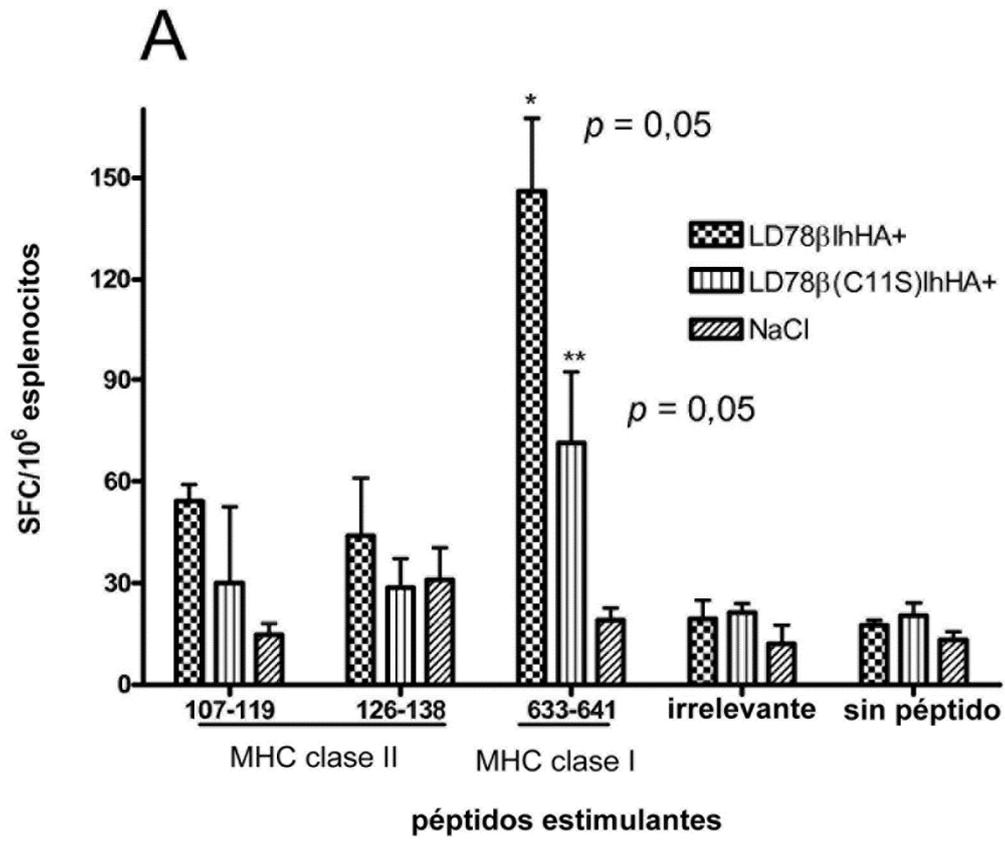


Figura 8

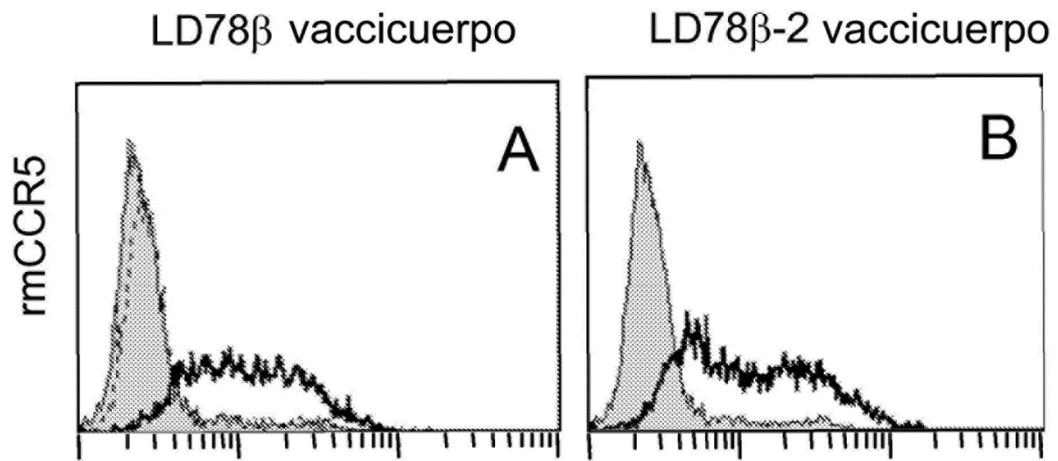


Figura 9

